

JERUSA MARIA DE OLIVEIRA

**ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS EM MORCEGOS FRUGÍVOROS  
(*Artibeus lituratus*) EXPOSTOS À FORMULAÇÃO COMERCIAL DO  
INSETICIDA DELTAMETRINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

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

T

O48a  
2017  
Oliveira, Jerusa Maria de, 1988-  
Alterações morfofisiológicas em morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*) expostos à formulação comercial do inseticida Deltamitrina /  
Jerusa Maria de Oliveira. - Viçosa, MG, 2017.  
x, 103f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Leandro Licursi de Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Morcegos. 2. Pesticidas e vida selvagem. 3. Pesticidas -  
Avaliação de riscos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento  
de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e  
Estrutural. II. Título.

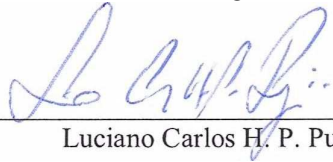
CDD 22 ed. 599.4

JERUSA MARIA DE OLIVEIRA

**ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS EM MORCEGOS FRUGÍVOROS  
(*Artibeus lituratus*) EXPOSTOS À FORMULAÇÃO COMERCIAL DO  
INSETICIDA DELTAMETRINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

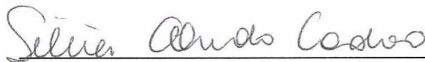
APROVADA: 14 de agosto de 2017




Luciano Carlos H. P. Puga



Jener Alexandre S. Zuanon



Silvia Almeida Cardoso



Eduardo de Almeida M. da Silva



Leandro Licursi de Oliveira  
(Orientador)

***“Onde há pensamento devem existir especulações, fantasia, desejo e todos os processos subjetivos envolvidos na criatividade do pesquisador como sujeito”***  
*Fernando Gonzalez Rey*

*A Deus, minha família, meu esposo e aos meus amigos, companheiros de todos os momentos da minha vida...*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder saúde, persistência, coragem, tranquilidade, uma família maravilhosa e amigos...

À minha família, meus pais Regina e Jurandir e meus irmãos Matheus e Carolina, por acreditarem, investirem e me apoiarem. Obrigada, pelo amor incondicional, e por entenderem a minha ausência. O amor e apoio de vocês foram essenciais para conseguir finalizar esse desafio.

Ao meu esposo Philipe Amorim, que me esperou e está sempre ao meu lado. Obrigada por ser meu companheiro caminhando ao meu lado e me apoiando em todos os momentos. Obrigada pela paciência, amor e por me passar tranquilidade.

À toda família Oliveira, Tios, Tias e Primos pelo incentivo apoio, carinho e momentos de descontração.

À Universidade Federal de Viçosa, juntamente com o programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de cursar o doutorado e pela infraestrutura fornecida para a execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento e Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos laboratórios de Biologia Estrutural, ao Museu de Zoologia João Moojen, ao laboratório de Fisiologia Aplicada a Piscicultura, ao Núcleo de Biomoléculas e ao Laboratório de Sistemática Molecular- Beagle da Universidade Federal de Viçosa pelos equipamentos, estrutura e reagentes.

Ao meu orientador Dr. Leandro Licursi de Oliveira pela orientação, por todos os ensinamentos compartilhados, incentivo, confiança e amizade.

À minha co-orientadora Dr. Mariella Freitas pela confiança nesses 6 anos de trabalho, incentivos, orientações e amizade.

A toda a equipe de trabalho do Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros. Em especial a Ana Luiza Destro, Bárbara Linhares, Nicole Losano, Pedro Henrique e Renata Freitas, que me ajudaram diretamente no desenvolvimento desta pesquisa.

A toda equipe do Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia, em especial ao professor Eduardo Marques e meus grandes amigos Thaís Fialho e Wendel. Obrigada pelas horas de alegria e confraternização, pelos conhecimentos compartilhados e pelo apoio nas horas difíceis.

À técnica Nívea Vieira, por me auxiliar na utilização do espectrômetro de massas.

As minhas grandes e companheiras amigas de todas as horas Laís Brito, Graziela Domingues, Pollyanna Ferreira e Neriamara Martins. Vocês foram como uma segunda família para mim, e também me ajudaram a vencer essa etapa. Obrigada pelos puxões de orelha, conselhos e principalmente pelos ótimos momentos de descontração.

À Suellen Condessa, pela grande amizade e ajuda nas análises histopatológicas.

Ao Luciano Puga e a Susana Puga, pela amizade e grande aprendizagem nas descontraídas coletas de morcegos.

À Tatiana Prata, pela amizade e pelo auxílio na construção das pranchas histológicas.

A todos os professores, técnicos e aos meus amigos e colegas, que direta ou indiretamente me auxiliaram e sempre torceram por mim.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1- APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA .....	1
1.1 Histórico e a utilização dos pesticidas .....	1
1.2 Importância ecológica e o bioacúmulo de pesticidas em morcegos .....	4
1.3 Efeitos do bioacúmulo de pesticidas em morcegos .....	7
1.4 Pesticida Deltametrina .....	9
REFERÊNCIAS.....	12
2- OBJETIVOS .....	18
2.1- Objetivo geral .....	18
2.2- Objetivos específicos .....	18
ARTIGO 1.....	19
Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissues of the Neotropical fruit-eating bat <i>Artibeus lituratus</i> .....	19
Abstract .....	20
1. Introduction.....	21
2. Materials and methods.....	23
3. Results .....	31
4. Discussion.....	37
References .....	44
ARTIGO 2.....	53
Deltametrina induz histotoxicidade hepática, intestinal e renal em morcegos frugívoros .....	53
RESUMO .....	54
1 INTRODUÇÃO .....	55
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	56

3. RESULTADOS.....	62
4 DISCUSSÃO.....	69
ARTIGO 3.....	76
Estresse oxidativo e histopatologias em testículo de morcegos frugívoros ( <i>Artibeus lituratus</i> ) expostos à deltametrina.....	76
Resumo.....	77
Introdução.....	78
Materiais e Métodos.....	79
Resultados .....	85
Discussão.....	92
Conclusão .....	96
Referências .....	96
3 - CONCLUSÕES GERAIS .....	102
ANEXO 1.....	103

## RESUMO

OLIVEIRA, Jerusa Maria de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2017. **Alterações Morfofisiológicas em morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*) expostos à formulação comercial do inseticida deltametrina.** Orientador: Leandro Licursi de Oliveira. Coorientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas.

A Deltametrina (DTM) é um inseticida piretroide utilizado na agricultura e no controle de vetores de doenças. Resíduos desse pesticida são comumente encontrados no ambiente e podem trazer prejuízos para a saúde de organismos não-alvos, como os morcegos frugívoros. Durante o forrageio, estes animais entram em contato com esse inseticida por intermédio da água e alimentação. No entanto, a literatura científica apresenta escassez de dados que demonstram a toxicidade dos pesticidas em dos morcegos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda de baixas concentrações do inseticida DTM no morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). Para isso, foram capturados 23 morcegos machos utilizando redes de neblina em fragmentos de Mata Atlântica - MG, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas (3x3x2 m) no morcegário da Universidade Federal de Viçosa, e porções de mamão pulverizadas com solução do inseticida DTM (0; 0,02; 0,04 mg/kg de mamão), foram oferecidas diariamente aos animais, durante sete dias. Após o período de exposição, foram avaliadas as enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutationa S-transferase (GST), a peroxidação lipídica e as proteínas carboniladas no fígado, músculo peitoral e testículos dos morcegos. Os níveis de peróxido de hidrogênio foram mensurados no fígado e músculo peitoral e o óxido nítrico (NO) no fígado, músculo peitoral, rins e testículos. No plasma, foram mensurados a atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), a glicemia e as proteínas totais. Foram mensurados o percentual de glicogênio hepático, os níveis de lipídios e proteínas totais do músculo peitoral e do fígado. A imunidade inata foi avaliada por intermédio da atividade bactericida do soro e da proliferação celular de esplenócitos. Foram realizadas também avaliações histopatológicas e histomorfométricas no fígado, rim, intestino e testículos. Os morcegos mostraram estresse oxidativo no fígado, no músculo peitoral e nos testículos. No plasma, os animais apresentaram hiperglicemia e aumento das transaminases AST e ALT. O fígado também mostrou redução da reserva de glicogênio, esteatose, e histopatologias pronunciadas. No intestino ocorreu hiperplasia de células caliciformes e maior evidência de células apoptóticas. Os rins

mostraram aumento de glicogênio nos túbulos proximais, infiltrados inflamatórios, nefroesclerose vascular benigna e redução dos níveis de NO. Os testículos dos morcegos expostos mostraram aumento nos níveis de NO, apoptose das células germinativas e histopatologias severas. Os parâmetros imunológicos avaliados não apresentaram alterações entre os grupos, provavelmente devido ao tempo de exposição. Portanto, esses resultados nos mostram que a exposição oral de morcegos frugívoros à baixas concentrações da formulação comercial do inseticida DTM pode alterar o metabolismo de carboidratos, causar injúrias no fígado, músculo peitoral, rins, intestino e testículos. Portanto, a DTM pode ser tóxica para morcegos frugívoros, e comprometer a saúde desses animais.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Jerusa Maria de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, August, 2017. **Morphophysiological alterations in fruit-eating bats (*Artibeus lituratus*) exposed to the commercial formulation of the insecticide deltamethrin.** Adviser: Leandro Licursi de Oliveira. Co-adviser: Mariella Bontempo Duca de Freitas.

Deltamethrin (DTM) is a pyrethroid insecticide used in agriculture and in control of disease vectors. Residues of this pesticide are commonly found in the environment and can be harmful to the health of non-target organisms, such as fruit-eating bats. During foraging, these animals come into contact with this insecticide through water and food. However, the scientific literature shows a shortage of data demonstrating the toxicity of pesticides in the physiology of bats. Therefore, the objective of this study was to evaluate the acute toxicity of low concentrations of DTM insecticide on the fruit-eating bat *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). Twenty-three male bats were captured with mist nets in fragments of Atlantic Forest - MG, Brazil. The animals were kept in cages in a bat shelter (3x3x2 m) at Universidade Federal de Viçosa. Portions of papaya sprayed with DTM insecticide solution (0; 0.02, 0.04 mg / kg papaya) were offered daily to the animals for seven days. After the exposure period, the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), lipid peroxidation and carbonylated proteins were evaluated in the liver, pectoral muscle and testis of bats. Hydrogen peroxide levels were measured in liver and pectoral muscle, nitric oxide (NO) was measured in liver, pectoral muscle, kidneys and testes. The activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), glucose and total proteins were measured in plasma. The percentage of hepatic glycogen, lipid and total proteins levels of pectoral muscle and liver were also measured. Innate immunity was assessed by serum bactericidal activity and splenocytes cell proliferation. Histopathology and histomorphometry evaluations were also performed in the liver, kidney, intestine and testes. Bats showed oxidative stress in liver and pectoral muscle. In plasma, the animals showed hyperglycemia and increased AST and ALT. The liver also showed reduced glycogen, steatosis, and pronounced histopathologies. In the intestine, goblet cell hyperplasia and increased evidence of apoptotic cells were observed. The kidneys showed increased glycogen in the proximal tubules, inflammatory infiltrates, benign vascular nephrosclerosis, and reduced NO levels. The testes of the exposed bats showed increased levels of NO, oxidative stress,

apoptosis of germ cells and severe histopathologies. The immunological parameters evaluated did not present alterations between the groups, probably due to the time of exposure. Therefore, these results show that oral exposure of fruit-eating bats to low concentrations of the commercial formulation of insecticide DTM can alter the metabolism of carbohydrates, causing injury to the liver, pectoral muscle, kidneys, intestines and testes. Therefore, DTM can be toxic to bats and compromise their health.

# 1- APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA

## 1.1 Histórico e a utilização dos pesticidas

Os pesticidas são substâncias químicas com ação contra qualquer agente que possa danificar a produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens e vetores. Na história da humanidade, a utilização de produtos com essa finalidade iniciou antes de Cristo, como por exemplo, o cloreto de sódio e o enxofre. No século XV enxofre, arsênio e mercúrio foram utilizados como inseticidas e fungicidas para controle de pragas (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009; BANASZKIEWICZ, 2010).

Com o tempo as substâncias foram aperfeiçoadas, até que nas décadas de 30 e 40 surgiram os primeiros pesticidas sintéticos. O primeiro pesticida sintético foi o inseticida DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane), que durante a II Guerra Mundial era administrado em pessoas para o controle de doenças como a malária, tifo e piolhos. Nessa época os novos inseticidas organoclorados foram proclamados como substâncias milagrosas (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009; BANASZKIEWICZ, 2010).

Após a ascensão da utilização dos pesticidas, diversas alterações ambientais e em populações de organismos não-alvos foram associadas a estes compostos. A contaminação dos organismos não-alvos ou do meio ambiente ocorre pela lixiviação, escoamento superficial, evaporação, erosão e na alimentação (KOHLENER; TRIEBSKORN, 2013). Quanto mais volátil o componente químico for, mais rapidamente ele é transportado para os processos da atmosfera e podem chegar em regiões distantes das áreas de aplicação (CARVALHO, 2017). Os resíduos de DDT e seus metabólitos, por exemplo, foram documentados no solo, em água superficiais, no ar e em tecidos de animais selvagens como peixes, mamíferos e aves (KOHLENER; TRIEBSKORN, 2013).

Resíduos de pesticidas induzem impactos em organismos não-alvos, como atrasos na metamorfose de anuros, bioacúmulo em mamíferos selvagens, e redução na população de abelhas e aves (EQANI et al., 2013; KOHLER; TRIEBSKORN, 2013; MULLIN et al., 2016; FREITAS; BROWN; KARASOV, 2017). A águia americana é um exemplo clássico do declínio da população proporcionado por pesticidas. A

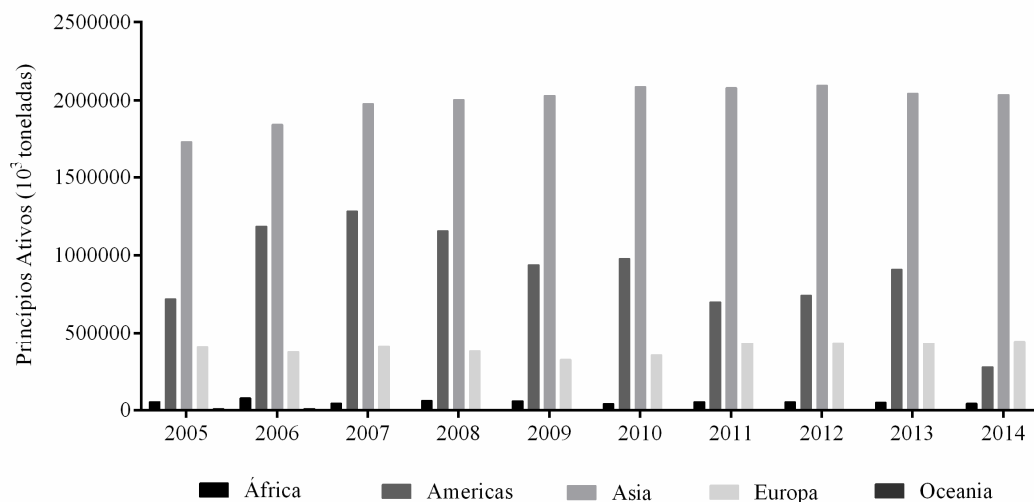
utilização do DDT nos EUA acarretou porosidade nos ovos dessas aves e impediu o desenvolvimento dos filhotes, levando à morte prematura dos mesmos. Essa espécie entrou na lista de animais ameaçados de extinção e saiu apenas em 2007, 45 anos após a proibição do uso do DDT no país (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009; BANASZKIEWICZ, 2010).

Devido aos impactos dos pesticidas para o meio ambiente e organismos não-alvos, alguns princípios ativos foram proibidos, e surgiram novas moléculas com a promessa de menor toxicidade. Então, novos compostos químicos foram criados e atualmente encontram-se aproximadamente 2400 produtos comerciais divididos em 434 ingredientes ativos diferentes. Esses produtos são classificados de acordo com sua composição química em organoclorados, organofosforados, piretroides, carbamatos, neonicotinoides, clorofenoxiácidos, triazínicos e glicinas. Dentro de cada grupo químico encontram-se diversos tipos de produtos comerciais com finalidades variadas, como inseticidas, (destinados ao controle de insetos), acaricidas (acarídeos), nematocidas (nemátodos, parasitas vegetais), moluscicidas (caramujos) e rodenticidas (roedores). Além desses há um grupo químico separado, os herbicidas, que são produtos com a finalidade de controlar ervas daninhas e os fungicidas e bactericidas, utilizados para prevenir doenças fúngicas e bacterianas (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009; BANASZKIEWICZ, 2010).

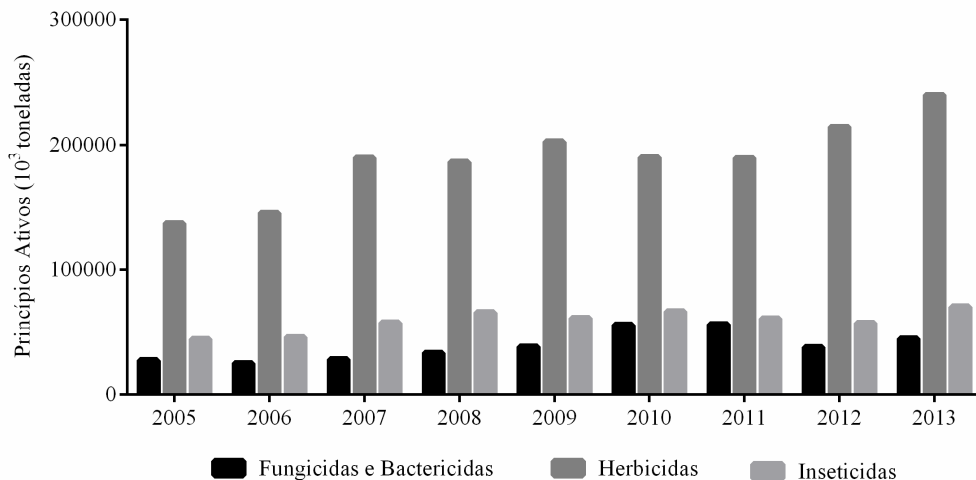
A utilização dos pesticidas em todo o mundo já atingiu grandes proporções, principalmente nos países em desenvolvimento (Figura 1) (Food and agriculture Organization of the United Nations- FAOSTAT). O Brasil, por exemplo, aumentou a utilização de pesticidas na última década (Figura 2), e desde 2008 é considerado o maior consumidor de pesticidas do mundo (ALBUQUERQUE et al., 2016), com destaque para a utilização dos herbicidas (Figuras 2) (FAOSTAT; Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis- IBAMA). No país, a utilização exagerada é reflexo do mal-uso dessas substâncias, e mais de 90% dos agricultores dependem de pesticidas para o manejo de pragas. Diversos produtores realizam a aplicação dos pesticidas de maneira indiscriminada, onde a frequência e as doses recomendadas pelos fabricantes não são respeitadas (SCHIESARI et al., 2013).

O Brasil também não possui monitoramento adequado para a utilização de componentes químicos e para resíduos de pesticidas no meio ambiente, principalmente na água doce (BARBOSA; SOLANO; UMBUZEIRO, 2015). Os monitoramentos se

restringem em apenas cinco estados brasileiros, que apresentam dados com baixa credibilidade (ALBUQUERQUE et al., 2016). Outro agravante para o país é a utilização de pesticidas comprovadamente tóxicos e que já são proibidos em outras regiões do mundo. Entre os 50 produtos comerciais mais vendidos no Brasil, 22 são proibidos na Europa como, por exemplo, o triclofon, 2,4-D, paraquat, e os herbicidas triazínicos.



**Figura 1** Toneladas de princípios ativos de fungicidas/bactericidas, inseticidas e herbicidas de diversas classes utilizados ou vendidos no setor agrícola para culturas e sementes nos continentes. Dados compilados da FAOSTAT (Food and agriculture Organization of the United Nations).



**Figura 2** Toneladas de princípios ativos de fungicidas/bactericidas, inseticidas e herbicidas de diversas classes utilizados ou vendidos no setor agrícola para culturas e sementes no Brasil. Dados compilados da FAOSTAT.

## 1.2 Importância ecológica e o bioacúmulo de pesticidas em morcegos

Morcegos pertencem a ordem Chiroptera, a segunda maior ordem em número de espécies da classe Mammalia. Eles representam 25% das espécies de mamíferos existentes (ALTRINGHAM 1996). No mundo são registradas 18 famílias, 202 gêneros e aproximadamente 1120 espécies, divididas em duas subordens; Microchiroptera e Megachiroptera (exclusiva do velho mundo) (NOWAK, 2005).

A ordem Chiroptera apresenta grande relevância para o equilíbrio dos ecossistemas. Os indivíduos desse grupo apresentam adaptações morfológicas e hábitos alimentares que fazem com que ocupem diversos nichos, e uma complexa relação de interdependência com o meio. A maior variedade de hábitos alimentares encontra-se entre os Microchiropteras que englobam hematófagos, frugívoros, insetívoros, piscívoros, polinívoros, nectarívoros e onívoros (NOWAK, 2005). Essa diversidade nos hábitos alimentares faz com que os morcegos ofereçam serviços ecológicos que auxiliam no equilíbrio do ecossistema, como o controle de insetos pragas, a dispersão de sementes e a polinização.

O contato dos morcegos com os resíduos de pesticidas pode ocorrer por intermédio da alimentação. Muitas vezes esses resíduos bioacumulam em seus tecidos e comprometem a saúde dos animais. Características do grupo, como o hábito de

forragear em grandes extensões, a baixa taxa de reprodução e a redução na disponibilidade de alimento tornam esses animais vulneráveis à exposição aos pesticidas (STAHLSCHMIDT; BRÜHL, 2012; STECHERT et al., 2014). Porém, apesar dessa vulnerabilidade, o número de investigações que retratam os efeitos dos pesticidas em morcegos ainda possui várias lacunas e concentram-se nas regiões temperadas do globo (Tabela 1). As Américas Central e do Sul abrigam grande riqueza de espécies de morcego, entretanto possui baixo número de trabalhos sobre o tema, embora apresente alto consumo de pesticidas nos últimos 10 anos (Figura 1). Na Ásia, o consumo de pesticida é alto (Figura 1), mas as pesquisas sobre o tema são escassas, tornando-a uma região de risco para a contaminação dos morcegos e outros mamíferos.

**Tabela 1-** Número de publicações sobre bioacúmulo ou o impacto dos pesticidas em tecidos de morcegos.

Continente	Número total de publicações	Ano de publicação	Guildas alimentares		
			insetívoro	frugívoro	outros
<b>América do Norte</b>	8	1964,1968, 1983, 2007, 2010, 2013, 2016	7		
<b>América central</b>	4	1976,1994, 1996,2017		1	
<b>América do Sul</b>	5	2010, 2012, 2016		4	
<b>Ásia</b>	3	2014,2015,2016	3		
<b>África</b>	5	2014, 2015, 2016	2	3	
<b>Europa</b>	14	1980-2016	12		
<b>Oceania</b>	2	2006, 2015	1		
<b>Total</b>	<b>41</b>		<b>25</b>	<b>8</b>	<b>0</b>

Os morcegos insetívoros são considerados mais susceptíveis aos pesticidas, pois estão no topo das cadeias tróficas. Esses animais auxiliam no controle da população de insetos, incluindo vetores de doenças como dengue, leishmaniose e malária e também de espécies pragas para a agricultura. Dessa forma, esses animais contribuem com a proteção contra danos por pragas em plantações, o que pode reduzir a utilização de pesticidas (CLEVELAND et al., 2006; BOYLES et al., 2011; LÓPEZ-HOFFMAN et al., 2014). Porém, ao se alimentarem de presas (insetos, artrópodes e outros) contaminadas com pesticidas os morcegos insetívoros acabam bioacumulando resíduos

dos mesmos em seus tecidos (GERELL; GERELL LUNDERG, 1993; STAHLSCHMIDT; BRÜHL, 2012). Concentrações de organoclorados como o DDT, DDE (diclorofeniltricloroetano), dieldrin, endossulfam, lindane, piretroides, organofosforados e carbamatos foram registradas em diversos tecidos desses animais (CLARK; KRYNITSKY, 1983; FERNÁNDEZ et al., 1993; GERELL; GERELL LUNDERG, 1993; KANNAN et al., 2010; EIDELS et al., 2013; LILLEY et al., 2013; STECHERT et al., 2014). Os morcegos insetívoros são os mais estudados (Tabela 1), e aparentemente acumulam mais pesticidas em relação aos morcegos com outros hábitos alimentares. Porém, essas informações possivelmente não retratam a realidade, pois a maior parte das pesquisas não retrata outros guildas alimentares (Tabela1).

Os morcegos frugívoros são grandes dispersores de sementes contribuindo indiretamente para o reflorestamento e conservação das florestas (ALTRINGHAM 1996). Esses animais também estão em constante exposição a contaminantes ambientais (VALDESPINO; SOSA, 2017) (BRINATI et al., 2016), e a dieta quase que exclusiva de frutas torna-os bons indicadores de presença e magnitude da contaminação de pesticidas (VALDESPINO; SOSA, 2017). Porém, as pesquisas sobre o bioacúmulo e o efeito dos pesticidas nos morcegos frugívoros ainda são insatisfatórias (Tabela 1).

Populações de morcegos insetívoros vêm decaindo em algumas regiões do mundo, e alguns autores associam essa queda ao bioacúmulo de pesticidas nos tecidos desses animais (BENNETT; THIES, 2007; DENNIS; GARTRELL, 2015). Assim como, na Nova Zelândia e na Espanha, onde morcegos encontrados mortos apresentavam altas concentrações de pesticidas no fígado ou na carcaça (FERNÁNDEZ et al., 1993; DENNIS; GARTRELL, 2015). Entretanto, ainda é difícil afirmar que o declínio nas populações esteja associado apenas ao bioacúmulo de pesticidas. Isso porque outros fatores como degradação ambiental, perda de habitats, fragmentação florestal e mudanças climáticas também podem estar envolvidos (ALLINSON et al., 2006; KOHLER; TRIEBSKORN, 2013; PARK, 2015). Dessa forma, conhecer os efeitos fisiológicos dos pesticidas em morcegos é importante para a manutenção das populações desses animais (BAYAT et al., 2014).

### **1.3 Efeitos do bioacúmulo de pesticidas em morcegos**

A biotransformação é o processo pelo qual as moléculas químicas ingeridas por um organismo sofrem modificação, mediada por enzimas, e convertem a molécula tóxica em um metabólito mais hidrossolúvel e mais fácil de ser excretado. Esse processo exige demasiadamente das atividades celulares e aumentam o metabolismo do indivíduo. Após a biotransformação os compostos podem bioacumular nos tecidos e induzir alterações fisiológicas como imunotoxicidade, estresse oxidativo, desregulação endócrina e falha reprodutiva em animais silvestres (BERNY, 2007).

As maiores concentrações de pesticidas em morcegos encontram-se no tecido adiposo, fígado e cérebro. Esses animais são sensíveis a resíduos de pesticidas, onde podem ser 30 vezes mais sensíveis do que ratos expostos (SHORE; MYHILL; WRIGHT, 1996). Os organoclorados, por exemplo, aumentam a taxa metabólica basal com consequente redução das reservas energéticas (SWANEPOEL et al., 1999; KANNAN et al., 2010; BRINATI et al., 2016). A maioria dos pesticidas são lipofílicos assim, o alto consumo das reservas energéticas, principalmente as lipídicas, aumenta a concentração de pesticidas em tecidos mais sensíveis, como o fígado e o cérebro (BOYD; MYHILL, 1988). Além disso, a redução das reservas de energia prejudica os processos reprodutivos, em especial das fêmeas, e dificulta o despertar do torpor (EIDELS et al., 2013).

A diminuição das reservas energéticas também causa aumento a taxa de forrageio e deixa o indivíduo mais susceptível à predação (SWANEPOEL et al., 1999; ALLINSON et al., 2006). O forrageio também pode ser prejudicado quando pesticidas induzem a queda da atividade da acetilcolinesterase e da capacidade do indivíduo em realizar a ecolocalização devido a morte de células nervosas (HSIAO et al., 2016) (EIDELS et al., 2016). A ecolocalização é importantíssima para os morcegos, torna-os independentes da luz auxiliando na percepção do ambiente por meio da detecção de alvos, direção, velocidade de trajetória, tamanho e forma do alvo (ALTRINGHAM 1996). Com essas habilidades prejudicadas, o animal provavelmente terá dificuldades para capturar presas, se locomover (voar) e identificar predadores.

A exposição de mamíferos aos pesticidas também causa diversas patologias hepáticas. Morcegos frugívoros, quando expostos aos inseticidas organoclorados endossulfam, organofosforado espinosina e ao bio- inseticida fentiona apresentaram

histopatologias hepáticas, como vacuolização, necrose e apoptose (AMARAL et al., 2012a, 2012b; OLIVEIRA et al., 2017). Além disso, podem apresentar redução da capacidade antioxidante total hepática (OLIVEIRA et al., 2017) e, dependendo da gravidade das lesões hepáticas, levar o animal ao óbito (DENNIS; GARTRELL, 2015).

Os organoclorados e piretroides induzem descontrolado em hormônios relacionados à reprodução, como a testosterona, por isso esses pesticidas são considerados desreguladores endócrinos. Porém, não há na literatura científica efeitos desses pesticidas sobre a reprodução de morcegos machos ou fêmeas. Encontram-se trabalhos que enfatizam a transferência do organoclorado DDE e do rodenticida diafacinone da mãe para o filhote, ou a presença de resíduos nos testículos (THIES; MCBEE, 1994; THIES; THIES; MCBEE, 1996). Dados como esses nos mostram que pesticidas podem bioacumular e biomagnificar na cadeia trófica, porém o quanto que essa transferência afeta o desenvolvimento dos filhotes ainda é desconhecido para esse grupo animal.

O sistema imune de morcegos também ainda é pouco conhecido, principalmente quando se trata de imunotoxicologia. A síndrome do nariz branco é uma doença que mata milhões de morcegos em regiões temperadas do mundo. KANNAN et al (2000), sugeriram que essa doença provavelmente está associada a distúrbios no sistema imune induzidos por bioacúmulo de organoclorado. Até o momento sabe-se que morcegos insetívoros contaminados com componentes orgânicos tóxicos apresentam distúrbios no sistema imune, pela redução da atividade do sistema complemento (LILLEY et al., 2013). Investigações em imunotoxicologia são relevantes, pois a toxicidade dos pesticidas leva à imunossupressão e torna o indivíduo mais susceptível a infecções por organismos patogênicos (AFONSO et al., 2016).

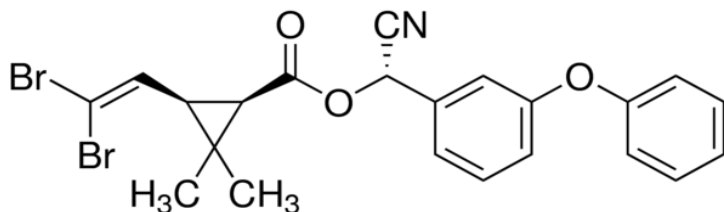
As alterações fisiológicas induzidas por pesticidas levam ao desequilíbrio na sua homeostase e pode prejudicar a sobrevivência dos animais. Consequentemente, podem ocasionar alterações no metabolismo, na taxa de forrageio, na capacidade antioxidante e na resposta a algum patógeno. Os morcegos são sensíveis à exposição de pesticidas e sugere-se que esses animais possam ser modelo para programas de avaliação de risco para pesticidas (STAHLSCHMIDT; BRÜHL, 2012). Entretanto, ainda encontram-se grandes lacunas na literatura sobre o tema e, dentre essas lacunas destacam-se os efeitos sobre a reprodução de machos e fêmeas, sobre o sistema imune, e sobre a capacidade antioxidante.

Além disso, os efeitos da exposição a pesticidas podem ser diferenciados entre morcegos e outros mamíferos, como os roedores. Isso porque morcegos possuem alta taxa metabólica, baixa produção de espécies reativas de oxigênio por oxigênio consumido e alta capacidade antioxidante. Outro fator que pode diferenciar as respostas fisiológicas desse grupo é a sua habilidade de controlar seu metabolismo através da heterotermia (EIDELS et al., 2016). Essa habilidade confere ao grupo a capacidade de retardar a sua morte em estudos de toxicidade em curto prazo, diferindo das respostas de peixes e ratos. Entretanto, também faz com que os resíduos tóxicos persistam por mais tempo no organismo, originando mais danos nos tecidos e morte direta (EIDELS et al., 2016). Dessa forma, é importante que as pesquisas sobre a ecotoxicologia em morcegos aumentem em número e abrangência territorial. Por essas pesquisas poderemos construir metas em prol da conservação do grupo e, conseqüentemente, auxiliar na redução da utilização de pesticidas.

#### **1.4 Pesticida Deltametrina**

Os piretroides são análogos sintéticos de piretrinas, substâncias inseticidas obtidas a partir das flores de uma espécie de crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Piretroides surgiram na década de 70 e foram considerados pesticidas de baixa toxicidade, sendo utilizados como alternativa ao uso dos inseticidas mais tóxicos, como os organoclorados. Os principais piretroides são: cipermetrina, deltametrina, alertrina, cialotrina, bifentrina e permetrina (SANTOS; AREAS; REYES, 2007).

Dentre os principais pesticidas piretroides a deltametrina (DTM) (Figura 3) é considerada a mais tóxica para vertebrados (ZHU et al., 2014; JABEEN et al., 2015). Esse inseticida é comumente utilizado na agricultura (cultivos de pêssegos, sorgo, abacaxi, café, eucalipto e assim por diante) e no controle de vetores de doenças (SANTOS; AREAS; REYES, 2007). A DTM também é aplicada em bovinos e cavalos para o controle de carrapatos. A aplicação ocorre através da pulverização ou imersão e a dose aplicada é determinada de acordo com o objetivo, em cultivos de frutas, por exemplo, as doses podem variar de 30 a 400 mg/100 L de água (ANVISA-Brasil 2003).



**Figura 3** Fórmula química do pesticida Deltametrina ( $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ ).

Resíduos de DTM e outros piretroides são comumente encontrados em águas superficiais, no solo e em peixes (OSTI et al., 2007; SCHIESARI et al., 2013). Esses resíduos normalmente estão acima do limite máximo permitido pela organização mundial de saúde (ERNST et al., 2001; SCHIESARI et al., 2013). Uma vez no ambiente, os piretroides, que possuem características lipofílicas, são rapidamente absorvidos através do trato gastrointestinal e respiratório, dos animais não alvos. As moléculas do inseticida atravessam os enterócitos e passam para a circulação entero-hepática por difusão. No fígado ocorre a biotransformação por meio de reações de hidrólise da ligação éster, seguida por diversas reações no sistema enzimático citocromo P450 e reações de conjugação, por fim seus resíduos são eliminados nas fezes (KIM et al., 2008; ZHU et al., 2014). A DTM atua no GABA ao bloquear os canais de cálcio provocando hiper-excitabilidade. Além disso, o inseticida induz um aumento na duração do potencial de ação nos músculos cardíacos, prolongando a entrada de íons  $Na^+$  na célula (SANTOS; AREAS; REYES, 2007; ZHU et al., 2014) e leva a uma redução da atividade motora (STARR et al., 2015).

O bioacúmulo dos piretroides, como a DTM, ocorre preferencialmente nos músculos esqueléticos, tecido adiposo, cérebro e baço (KIM et al., 2008; ZHU et al., 2014). O processo de biotransformação e consequente bioacúmulo é considerado tóxico e leva a diversas injúrias. Em mamíferos, por exemplo, a DTM tem uma dose letal (LD50) em ratos que pode variar de 50 a 500 mg/Kg e tem a propriedade lipofílica que facilita a alta absorção pelo trato gastrointestinal e respiratório, atingindo o sistema nervoso central e periférico (SANTOS; AREAS; REYES, 2007; ZHU et al., 2014).

Peixes, ratos e camundongos quando expostos a doses baixas ou subletais da DTM apresentam estresse oxidativo. O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre antioxidantes e espécies reativas que pode levar a danos aos lipídios, proteínas e ao DNA (AGRAWAL; SHARMA, 2010). DTM e muitos outros pesticidas induzem o

aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies de nitrogênio (RNS) em diversos órgãos (KARAMI-MOHAJERI; ABDOLLAHI, 2011). Para evitar danos oxidativos causados por ROS e RNS, as células possuem sistemas enzimáticos (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) e não enzimáticos ( $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, carotenóides e glutathione) (Hermes-Lima 2004). As oscilações nesses sistemas de defesa antioxidante são usadas como ferramenta para avaliar os efeitos de xenobióticos em organismos não alvos.

A DTM também pode causar distúrbios no metabolismo de carboidratos, redução da atividade da acetilcolinesterase, aumento das transaminases hepáticas no plasma, e apoptose no fígado e rim. Além disso, os animais podem apresentar diversas histopatologias no fígado, rins, intestino e imunossupressão (VELMURUGAN et al., 2007; ISSAM et al., 2012; BHUSHAN; SAXENA; SAXENA, 2013).

A contaminação ambiental por pesticidas piretroides também tem sido associada a distúrbios na reprodução animal e humana (AHMAD; KHAN; KHAN, 2011). O inseticida DTM pode reduzir o tamanho dos testículos e das vesículas seminais (AHMAD; KHAN; KHAN, 2011) e, induzir a formação de espécies reativas no órgão, principalmente através da produção excessiva de óxido nítrico (NO). O óxido nítrico tem papel na regulação de diversas funções fisiológicas, inclusive no sistema endócrino. Esse radical atua sobre a espermatogênese, participando da maturação dos espermatozoides e na conservação das células germinativas (EL-GOHARY et al., 1999; LUE et al., 2003; AITKEN; ROMAN, 2008). Então, um desequilíbrio nas concentrações de NO testiculares, propiciada por xenobióticos pode ocasionar apoptose, redução da qualidade e motilidade espermática e a desregulação da síntese de testosterona (EL-GOHARY et al., 1999; LUE et al., 2003). Assim, piretroides também são considerados disruptores endócrinos como os organoclorados (AHMAD; KHAN; KHAN, 2011; JIN et al., 2011; ISMAIL; MOHAMED, 2012).

## REFERÊNCIAS

- AFONSO, E.; TOURNANT, P.; FOLTÊTE, J. C.; GIRAUDOUX, P.; BAURAND, P. E.; ROUÉ, S.; CANELLA, V.; VEY, D.; SCHEIFLER, R. Is the Lesser Horseshoe Bat (*Rhinolophus Hipposideros*) Exposed to Causes That May Have Contributed to Its Decline? A Non-Invasive Approach. **Global Ecology and Conservation**, v. 8, p. 123–137, 2016.
- AGRAWAL, A.; SHARMA, B. Pesticides Induced Oxidative Stress in Mammalian Systems. **International Journal of Biological and Medical Research**, v. 3, n. 3, p. 90–104, 2010.
- AHMAD, L.; KHAN, A.; KHAN, M. Z. Pyrethroid-Induced Reproductive Toxicopathology in Non-Target Species. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 32, n. 1, p. 1–9, 2011.
- AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant Systems and Oxidative Stress in the Testes. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 636, n. December, p. 154–171, 2008.
- AKTAR, W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of Pesticides Use in Agriculture: Their Benefits and Hazards. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2009.
- ALBUQUERQUE, A. F.; RIBEIRO, J. S.; KUMMROW, F.; NOGUEIRA, A. J. A.; MONTAGNER, C. C.; UMBUZEIRO, G. A. Pesticides in Brazilian Freshwaters: A Critical Review. **Environ. Sci.: Processes Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779–787, 2016.
- ALLINSON, G.; MISPAGEL, C.; KAJIWARA, N.; ANAN, Y.; HASHIMOTO, J.; LAURENSEN, L.; ALLINSON, M.; TANABE, S. Organochlorine and Trace Metal Residues in Adult Southern Bent-Wing Bat (*Miniopterus Schreibersii* Bassanii) in Southeastern Australia. **Chemosphere**, v. 64, n. 9, p. 1464–1471, 2006.
- AMARAL, T. S.; CARVALHO, T. F.; SILVA, M. C.; BARROS, M. S.; PICANÇO, M. C.; NEVES, C. A.; FREITAS, M. B. Short-Term Effects of a Spinosyn's Family Insecticide on Energy Metabolism and Liver Morphology in Frugivorous Bats *Artibeus Lituratus* (Olfers, 1818). **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 2, p. 299–304, 2012a.
- AMARAL, T. S.; CARVALHO, T. F.; SILVA, M. C.; GOULART, L. S.; BARROS, M. S.; PICANÇO, M. C.; NEVES, C. a.; FREITAS, M. B. 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, 2012b.
- BANASZKIEWICZ, T. Evolution of Pesticide Use. v. 5, p. 7–18, 2010.
- BARBOSA, A. M. C.; SOLANO, M. de L. M.; UMBUZEIRO, G. de A. Pesticides in Drinking Water - The Brazilian Monitoring Program. **Frontiers in public health**, v. 3, n. November, p. 246, 2015.

BAYAT, S.; GEISER, F.; KRISTIANSEN, P.; WILSON, S. C. Organic Contaminants in Bats: Trends and New Issues. **Environment International**, v. 63, p. 40–52, 2014.

BENNETT, B. S.; THIES, M. L. Organochlorine Pesticide Residues in Guano of Brazilian Free-Tailed Bats, *Tadarida Brasiliensis* Saint-Hilaire, from East Texas. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 78, n. 3–4, p. 191–194, 2007.

BERNY, P. Pesticides and the Intoxication of Wild Animals. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, n. 2, p. 93–100, 2007.

BHUSHAN, B.; SAXENA, P. N.; SAXENA, N. Biochemical and Histological Changes in Rat Liver Caused by Cypermethrin and Beta-Cyfluthrin. **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, v. 64, n. 1, p. 57–67, 2013.

BOYD, I. L.; MYHILL, D. G. Uptake of Gamma-HCH (Lindane) by Pipistrelle Bats and Its Effect on Survival. **Environmental Pollution**, v. 51, p. 95–111, 1988.

BOYLES, J. G.; CRYAN, P. M.; MCCRACKEN, G. F.; KUNZ, T. H. Conservation. Economic Importance of Bats in Agriculture. **Science (New York, N.Y.)**, v. 332, n. April, p. 41–42, 2011.

Brasil- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003). <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9446f78047458c8895a3d53fbc4c6735/D06++Deltametrina.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 21 set. 2014

BRINATI, A.; MARIA, J.; VIVIANE, O.; OLIVEIRA, S.; SOARES, M.; BRUNO, B.; CARVALHO, M.; SILVA, L.; ELIANA, M.; QUEIROZ, L.; LUIZ, S.; MATTA, P. Low , Chronic Exposure to Endosulfan Induces Bioaccumulation and Decreased Carcass Total Fatty Acids in Neotropical Fruit Bats. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, p. 1–6, 2016.

CARVALHO, F. P. Pesticides, Environment, and Food Safety. **Food and Energy Security**, v. 6, n. 2, p. 48–60, 2017.

**Clark, D.R., Jr., and R. F. Shore. 2001..pdf.** , [s.d.].

CLEVELAND, C. J.; BETK, M.; FEDERICO, P.; FRANK, J. D.; HALLAM, T. G.; HORN, J.; KUNZ, T. H.; JUAN D. LÓPEZ, J.; MCCRACKEN, G. F.; MEDELLÍN, R. A.; MORENO-VALDEZ, A.; SANSONE, C. G.; WESTBROOK, J. K. Estimation of the Economic Value of the Pest Control Service Provided by the Brazilian Free-Tailed Bat in the Winter Garden Region of South-Central Texas. **Frontiers in Ecology and the Environment** 4:, v. 4, n. Figure 2, p. 238–243, 2006.

DENNIS, G. C.; GARTRELL, B. D. Nontarget Mortality of New Zealand Lesser Short-Tailed Bats (*Mystacina Tuberculata*) Casused by Diphacionone. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 51, n. 1, p. 177–186, 2015.

DONALD R. CLARK, J.; KRYNITSKY, A. J. D D E in Brown and White Fat of

- Hibernating Bats. **Environmental Pollution**, v. 31, p. 287–299, 1983.
- EIDELS, R. R.; JOHN O. WHITAKER, J.; LYDY, M. J.; SPARKS, D. W. Screening of Insecticides in Bats from Indiana. **Proceedings of the Indiana Academy of Science**, v. 121, n. 2, p. 133–143, 2013.
- EIDELS, R. R.; SPARKS, D. W.; WHITAKER, J. O.; SPRAGUE, C. A. Sub-Lethal Effects of Chlorpyrifos on Big Brown Bats (*Eptesicus Fuscus*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 71, n. 3, p. 322–335, 2016.
- EL-GOHARY, M.; AWARA, W. M.; NASSAR, S.; HAWAS, S. Deltamethrin-Induced Testicular Apoptosis in Rats: The Protective Effect of Nitric Oxide Synthase Inhibitor. **Toxicology**, v. 132, n. 1, p. 1–8, 1999.
- EQANI, S. A. M. A. S.; MALIK, R. N.; CINCINELLI, A.; ZHANG, G.; MOHAMMAD, A.; QADIR, A.; RASHID, A.; BOKHARI, H.; JONES, K. C.; KATSOYIANNIS, A. Uptake of Organochlorine Pesticides (OCPs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) by River Water Fish: The Case of River Chenab. **Science of the Total Environment**, v. 450–451, p. 83–91, 2013.
- ERNST, W.; JACKMAN, P.; DOE, K.; PAGE, F.; JULIEN, G.; MACKAY, K.; SUTHERLAND, T. Dispersion and Toxicity to Non-Target Aquatic Organisms of Pesticides Used to Treat Sea Lice on Almon in Net Pen Enclosures. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 6, p. 432–443, 2001.
- FERNÁNDEZ, M. A.; HERNÁNDEZ, L. M.; IBÁÑEZ, C.; GONZÁLEZ, M. J.; GUILLÉN, A.; PÉREZ, J. L. Congeners of PCBs in Three Bat Species from Spain. **Chemosphere**, v. 26, n. 6, p. 1085–1097, 1993.
- FREITAS, M. B.; BROWN, C. T.; KARASOV, W. H. Warmer Temperature Modifies Effects of Polybrominated Diphenyl Ethers on Hormone Profiles in Leopard Frog Tadpoles (*Lithobates Pipiens*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 120–127, 2017.
- GERELL, R.; GERELL LUNDERG, K. Decline of a Bat *Pipistrellus Pipistrellus* Population in an Industrialized Area in South Sweden. **Biological Conservation**, v. 65, n. 2, p. 153–157, 1993.
- HSIAO, C.-J.; LIN, C.-L.; LIN, T.-Y.; WANG, S.-E.; WU, C.-H. Imidacloprid Toxicity Impairs Spatial Memory of Echolocation Bats through Neural Apoptosis in Hippocampal CA1 and Medial Entorhinal Cortex Areas. **NeuroReport**, v. 27, n. 6, p. 462–468, 2016.
- ISMAIL, M. F.; MOHAMED, H. M. Deltamethrin-Induced Genotoxicity and Testicular Injury in Rats: Comparison with Biopesticide. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 10, p. 3421–3425, 2012.
- ISSAM, C.; INTISSAR, G.; FATMA, B.; SAMIR, H. M. Y. H.; ZOHRA, H.; HASSEN, B. Oxidative Stress, Biochemical and Histopathological Alterations in the Liver and Kidney of Female Rats Exposed to Low Doses of Deltamethrin (DM): A

Molecular Assessment. **Biomedical and environmental sciences : BES**, v. 25, n. 6, p. 672–683, 2012.

JABEEN, F.; CHAUDHRY, A. S.; MANZOOR, S.; SHAHEEN, T. Examining Pyrethroids , Carbamates and Neonicotinoids in Fish , Water and Sediments from the Indus River for Potential Health Risks. **Environ Monit Assess.**, v. s, n. 18, p. 29, 2015.

JIN, Y.; WANG, L.; RUAN, M.; LIU, J.; YANG, Y.; ZHOU, C.; XU, B.; FU, Z. Cypermethrin Exposure during Puberty Induces Oxidative Stress and Endocrine Disruption in Male Mice. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 124–130, 2011.

KANNAN, K.; YUN, S. H.; RUDD, R. J.; BEHR, M. High Concentrations of Persistent Organic Pollutants Including PCBs, DDT, PBDEs and PFOS in Little Brown Bats with White-Nose Syndrome in New York, USA. **Chemosphere**, v. 80, n. 6, p. 613–618, 2010.

KARAMI-MOHAJERI, S.; ABDOLLAHI, M. Toxic Influence of Organophosphate, Carbamate, and Organochlorine Pesticides on Cellular Metabolism of Lipids, Proteins, and Carbohydrates: A Systematic Review. **Human & experimental toxicology**, v. 30, n. 9, p. 1119–40, 2011.

KIM, K. B.; ANAND, S. S.; KIM, H. J.; WHITE, C. A.; BRUCKNER, J. V. Toxicokinetics and Tissue Distribution of Deltamethrin in Adult Sprague-Dawley Rats. **Toxicological Sciences**, v. 101, n. 2, p. 197–205, 2008.

KOHLER, H.-R.; TRIEBSKORN, R. Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? **Science**, v. 341, n. 6147, p. 759–765, 2013.

LILLEY, T. M.; RUOKOLAINEN, L.; MEIERJOHANN, A.; KANERVA, M.; STAUFFER, J.; LAINE, V. N.; ATOSUO, J.; LILIUS, E. M.; NIKINMAA, M. Resistance to Oxidative Damage but Not Immunosuppression by Organic Tin Compounds in Natural Populations of Daubenton's Bats (*Myotis Daubentonii*). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 157, n. 3, p. 298–305, 2013.

LÓPEZ-HOFFMAN, L.; WIEDERHOLT, R.; SANSONE, C.; BAGSTAD, K. J.; CRYAN, P.; DIFFENDORFER, J. E.; GOLDSTEIN, J.; LASHARR, K.; LOOMIS, J.; MCCRACKEN, G.; MEDELLÍN, R. A.; RUSSELL, A.; SEMMENS, D. Market Forces and Technological Substitutes Cause Fluctuations in the Value of Bat Pest-Control Services for Cotton. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

LUE, Y.; SINHA HIKIM, A. P.; WANG, C.; LEUNG, A.; SWERDLOFF, R. S. Functional Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in the Induction of Male Germ Cell Apoptosis, Regulation of Sperm Number, and Determination of Testes Size: Evidence from Null Mutant Mice. **Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 3092–3100, 2003.

MULLIN, C. A.; FINE, J. D.; REYNOLDS, R. D.; FRAZIER, M. T. Toxicological Risks of Agrochemical Spray Adjuvants: Organosilicone Surfactants May Not Be Safe.

**Frontiers in public health**, v. 4, n. May, p. 92, 2016.

OLIVEIRA, J. M.; BRINATI, A.; DIVINA, L.; MIRANDA, L.; MORAIS, D. B. Exposure to the Insecticide Endosulfan Induces Liver Morphology Alterations and Oxidative Stress in Fruit-Eating Bats Short Running Title: Endosulfan Exposure in Fruit Bats. **International Journal of Experimental Pathology**, p. 1–9, 2017.

OSTI, S. C.; VAROLI, F. M. F.; MATUSHIMA, E. R.; BERNARDI, M. M. Comparative Studies of Delthametrin Acute Toxicity Toxicity in Exotic and Brazilian Fish. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, p. 101–106, 2007.

PARK, K. J. Mitigating the Impacts of Agriculture on Biodiversity: Bats and Their Potential Role as Bioindicators. **Mammalian Biology**, v. 80, n. 3, p. 191–204, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mambio.2014.10.004>>.

SANTOS, M. A. T. Dos; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides - Uma Visão Geral. **Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 339–349, 2007.

SCHIESARI, L.; WAICHMAN, a.; BROCK, T.; ADAMS, C.; GRILLITSCH, B. Pesticide Use and Biodiversity Conservation in the Amazonian Agricultural Frontier. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 368, n. 1619, p. 20120378, 2013.

SHORE, R. F.; MYHILL, D. G.; WRIGHT, J. A Comparison of the Toxicity to Laboratory Mice and Pipistrelle Bats *Pipistrellus pipistrellus* of Exposure to Remedially-Treated Timber. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 2, n. 2–3, p. 125–129, 1996.

STAHLSCHMIDT, P.; BRÜHL, C. A. Bats at Risk? Bat Activity and Insecticide Residue Analysis of Food Items in an Apple Orchard. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 7, p. 1556–1563, 2012.

STARR, J. M.; GRAHAM, S. E.; ROSS, D. G.; TORNERO-VELEZ, R.; SCOLLON, E. J.; DEVITO, M. J.; CROFTON, K. M.; WOLANSKY, M. J.; HUGHES, M. F. Environmentally Relevant Mixing Ratios in Cumulative Assessments: A Study of the Kinetics of Pyrethroids and Their Ester Cleavage Metabolites in Blood and Brain; and the Effect of a Pyrethroid Mixture on the Motor Activity of Rats. **Toxicology**, v. 320, n. 1, p. 15–24, 2015.

STECHERT, C.; KOLB, M.; BAHADIR, M.; DJOSSA, B. A.; FAHR, J. Insecticide Residues in Bats along a Land Use-Gradient Dominated by Cotton Cultivation in Northern Benin, West Africa. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 14, p. 8812–8821, 2014.

SWANEPOEL, R. E.; RACEY, P. A.; SHORE, R. F.; SPEAKMAN, J. R. Energetic Effects of Sublethal Exposure to Lindane on Pipistrelle Bats (*Pipistrellus pipistrellus*). **Environmental Pollution**, v. 104, n. 2, p. 169–177, 1999.

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. 239–42, 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. 178–87, 1996.

VALDESPINO, C.; SOSA, V. J. Effect of Landscape Tree Cover, Sex and Season on the Bioaccumulation of Persistent Organochlorine Pesticides in Fruit Bats of Riparian Corridors in Eastern Mexico. **Chemosphere**, v. 175, p. 373–382, 2017.

VELMURUGAN, B.; SELVANAYAGAM, M.; CENGIZ, E. I.; UNLU, E. Histopathology of Lambda-Cyhalothrin on Tissues (Gill, Kidney, Liver and Intestine) of *Cirrhinus Mrigala*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 286–291, 2007.

ZHU, P.; FAN, S.; ZOU, J. H.; MIAO, H.; LI, J. G.; ZHANG, G. W.; WU, Y. N. Application of Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Analyzing Pharmacokinetics and Distribution of Deltamethrin in Miniature Pig Tissues. **Biomedical and environmental sciences : BES**, v. 27, n. 6, p. 426–35, 2014.

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- Objetivo geral**

Avaliar a toxicidade aguda da formulação comercial do inseticida piretroide deltametrina em morcegos frugívoros, da espécie *Artibeus lituratus*.

### **2.2- Objetivos específicos**

- Mensurar os níveis plasmáticos de proteínas totais, glicemia e das transaminases Alanina e Aspartato aminotransferases (Artigo 1).
- Avaliar os efeitos do inseticida deltametrina sobre as reservas de energia (glicogênio, proteínas totais e lipídios) (Artigo 1).
- Avaliar a capacidade antioxidante do fígado, músculo peitoral e testículos (Artigo 1 e 3).
- Avaliar a produção de espécies reativas no músculo peitoral e fígado (Artigo 1 e 3).
- Avaliar os danos oxidativos causados pela deltametrina no fígado, músculo peitoral e testículos (Artigo 1 e 3).
- Avaliar o impacto da exposição aguda ao inseticida piretroide deltametrina na resposta imunológica inata (Artigo 2).
- Avaliar os efeitos do inseticida deltametrina sobre alterações histológicas do fígado, rim, intestino e testículos (Artigo 2 e 3).

## **ARTIGO 1**

**Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissues of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus***

Artigo submetido à revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*

**Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve  
in tissues of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus***

**Abstract**

Deltamethrin (DTM) is a synthetic pyrethroid insecticide highly used by farmers and home users. This pesticide has lipophilic properties that facilitate a high absorption and can cause toxicity in non-target organisms. During foraging, the fruit-eating bats *Artibeus lituratus* are exposed to pesticides. However, the knowledge of the toxicity of pesticides on the physiology of bats is relatively scarce. This study aimed to check the toxicity of short-term exposure to low concentration of DTM on fruit-eating bat *A. lituratus*. After seven days of exposure to two doses of DTM (0.02 and 0.04 mg/kg of papaya), the fruit bats showed an increase in the enzyme aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and hyperglycemia. The liver and pectoral muscle presented oxidative stress. In the liver, the hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and nitric oxide (NO) were increased as well as the antioxidant glutathione (GSH), the activity of glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) but in a lesser extent. Yet, total lipids were increased while hepatic glycogen content is reduced. The pectoral muscle showed NO, SOD, CAT, malondialdehyde (MDA), and carbonyl increased protein levels in both concentrations of DTM. All these results show that low doses of DTM can cause hepatic and muscular toxicity and induce changes in carbohydrate metabolism. Physiological changes caused by exposure to DTM in bats may have direct consequences in flight capacity, reproduction, and metabolism of these animals.

**Keywords:** Neotropical bat; ecotoxicology; pyrethroid; reactive oxygen species; hepatotoxicity; hyperglycemia.

## 1. Introduction

In countries where agriculture is the main source of income the rate of consumption of pesticides is alarming. Many farmers apply pesticides indiscriminately using dose and frequency beyond those recommended (Albuquerque et al., 2016; Schiesari et al., 2013). Currently, one of the classes of pesticide commonly used are the synthetic pyrethroids. The main insecticides of this class are allethrin, bifenthrin, cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin, and permethrin.

Deltamethrin (DTM) is a synthetic type II pyrethroid insecticide that has a wide application in the home use to control flies, cockroaches, and ants. It is also applied in cattle and horses to control ticks, and in several crops (peaches, sorghum, pineapple, coffee, and eucalyptus) to eliminate leaf strippers. The application consists of spraying and soaking. The applied dose is determined according to the goal, such as in crop growing the doses may range from 30- 400 mg/100 L of water (Brazil-ANVISA 2003).

In mammals (non-target organisms), the DTM has a median lethal dose (LD50) in rats ranged from 50 to 500 mg/Kg and has the lipophilic property that facilitates high absorption by the gastrointestinal and respiratory tract, reaching the central and peripheral nervous system (Santos et al., 2007; Zhu et al., 2014). Currently, it is known that metabolites accumulate in the liver, adipose tissue, blood, brain, and muscles (Kim et al. 2008; Zhu et al. 2014), and main route of elimination is through feces (Santos et al. 2007). The DTM acts on GABA by blocking the calcium channels and causes hyperpolarization. In addition, DTM induces an increase in the duration of the action potential in cardiac muscles, prolonging the entry of  $\text{Na}^+$  ions into the cell (Santos et al. 2007; Zhu et al. 2014) and leading to a decrease in the motor activity (Starr et al. 2015). Moreover, several studies in rats and mice described that the commercial formulation of

DTM can cause genotoxic effects in mammals. Also, can induce increased liver enzymes Alanine aminotransferase (ALT) and Aspartate aminotransferase (AST) (Chauhan et al., 2007), nephrotoxicity, hepatotoxicity, and oxidative stress (Valentine 1990; El-Demerdash 2011; Abdel-Daim et al. 2013; Bhushan et al. 2013).

The oxidative stress is the imbalance between antioxidants and reactive species causing damage to lipids, proteins, and DNA at a cellular level (Agrawal & Sharma 2010). DTM and many other pesticides in non-target organisms have been attributed to the increased generation of reactive species of oxygen (ROS) and species of nitrogen (RNS) (Karami-Mohajeri and Abdollahi 2011). To avoid oxidative damage caused by ROS and RNS the cells have enzymatic (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) and non-enzymatic (α-tocopherol, ascorbic acid, carotenoids and glutathione) systems (Hermes-Lima 2004). The oscillations in this antioxidative defense system could be used as a tool to evaluate the effects of pesticides in tissues non-target organisms like bats (Hermes-Lima 2004).

The exposure of bats to pesticides occurs during foraging when these animals feed on contaminated leaves, insects or fruits (Stahlschmidt et al., 2017). After ingestion, pesticide residues present in their food can accumulate in the tissues of bats and cause toxicity (Oliveira et al 2017). Previous studies from our laboratory showed decreased in enzymatic defense systems in the livers of fruit-eating bats that have been exposed to environmentally relevant concentrations of the insecticide endosulfan (Oliveira et al 2017). Moreover, organophosphates and/or organochlorines in bats lead to changes in the energy reserves (Amaral et al., 2012; Amaral et al., 2012; Brinati et al., 2016), increase the basal metabolic rate (Swanepoel et al., 1999), histopathologies (Amaral et al., 2012; Oliveira et al., 2017), and affect the immune system (Lilley et al., 2013).

The physiological changes caused by pesticides in bats can impair the bat's reproductive success, hibernation, and longevity (Allinson et al., 2006; Dennis and Gartrell, 2015; Fernández et al., 1993; Kannan et al., 2010; Swanepoel et al., 1999). Furthermore, several studies emphasize the relationship between exposure to pesticides and their population decrease (Gerell & Gerell Lunderg 1993; Swanepoel et al. 1999; Bennett & Thies 2007). However, the toxicity of pesticides on the physiology of bats is still scarce, especially in fruit bats. Fruit bats disperse seeds and pollinate plants, contributing to reforestation and conservation of tropical forests, especially the fruit-eating bats *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Phyllostomidae family). This species presents large size, wide distribution, and abundance in Latin America and occupies several ecosystems, including urban areas. Therefore, our aim was to check if deltamethrin, a pyrethroid insecticide, could cause alterations in biochemical biomarkers in serum, oxidative stress markers and energy reserves changes in the liver and pectoral muscle of the fruit-eating bat *A. lituratus*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

The pyrethroid insecticide deltamethrin (DTM) (Bayer CropScience, Rio Grande do Sul, Brazil), was obtained from the local specialized retailer. All other reagents were purchased from company Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, US) and Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.2. Bats

Adult male bats ( $n = 23$ ) (*A. lituratus*) were captured with mist nets around the *campus* of University of Viçosa (UFV) ( $20^{\circ} 45' S$  and  $42^{\circ} 52' W$ ) (Viçosa, MG, Brazil). All animals were identified according to the identification key for Brazilian bats (Vizzotto and Taddei 1973), weighed, and kept in individual steel cages ( $45 \times 22$  cm). Cages were placed in a bat house located under trees at the João Moojen Zoology Museum of UFV. Bats were fed with papaya (*Carica papaya*) and water. Papayas were used because fruit bats easily accept this diet in captivity. All procedures performed in this study were submitted and approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Viçosa (registration nº 45/2014) and Brazilian Government (SISBIO, registration nº 30904-3).

### 2.3. Experimental design

The bats were divided into three groups based on DTM dietary exposure. The group 0.02 mg DTM /Kg of papaya (DTM 0.02,  $n=8$ ), 0.04 mg DTM /Kg of papaya (DTM 0.04,  $n=8$ ), and the Control group (Ct,  $n=7$ ) that was not exposed to DMT.

The DTM was diluted with water and the solution was sprayed homogeneously throughout the peel side. The treated fruits were divided in half ( $\sim 150$  g) and offered to the animals with the peel side up. The fruit was offered every night (18:00 h) and water was available *ad libitum*. Food consumption was monitored daily by placing a known amount of fruit ( $\sim 150$  g) in each cage; leftovers were collected and weighed each morning (08:00 h).

After seven days of exposure, the bats were weighed and euthanized. The blood was collected and the liver and pectoral muscles were removed, weighed and immediately stored at  $-80^{\circ}C$  until the biochemical analyses were carried out.

#### *2.4. Deltamethrin concentration in fruits*

Deltamethrin concentration in papaya was quantified by mass spectrometry. Samples of papaya (1 cm<sup>3</sup>) were homogenized in acetonitrile (LC/MS-grade) and sodium phosphate buffer 0.1 mol/L (pH 7.0) (1:1 v/v). The homogenates were centrifuged at 15,000 g for 5 min and 10µL of the supernatant was applied in a triple quadrupole mass spectrometer (Triple Quad LC/MS Agilent Technologies- 6430). The column used was Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1.8 µm, 2.1x 50 mm. The solvent A was acetonitrile and solvent B was Ammonium hydroxide 5 mmol/L. The acquisition time was 5 min in linear gradient reaching 100% of solvent A in 2.94 min. The concentration of the DTM from papaya was calculated using the standard curve with known concentrations of DTM (Sigma, 98%). Each sample was analyzed in duplicate and the results were expressed in mg/Kg.

#### *2.5. Biochemical biomarkers in serum*

The blood (~3.5 mL) from bats was centrifuged at 1,500 g for 15 min. The serum was separated and aliquots of 0.5 ml were stored at -80°C until the determination of glucose, total protein, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). The glucose and total protein were measured through the specific Bioclin Kit (enzymatic colorimetric). AST and ALT were measured in accordance with Labtest Kit (enzymatic colorimetric), all following the manufacturer's instructions.

#### ***Oxidative stress markers***

#### *2.6. Tissue sample preparation*

Samples of frozen tissues liver (100 mg) and pectoral muscles (100 mg) from *A. lituratus* were homogenized in 0.2 mol/L phosphate buffer, 1 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 7.4 using a homogenizer (OMNI). The

homogenates were centrifuged at 15,000 g for 10 min at 4°C and the supernatants were used for analysis of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), nitric oxide (NO), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), malondialdehyde (MDA) and total protein assays. The pellets resulting were used for analyses of protein oxidation.

### *2.7. Nitric oxide production*

NO production was quantified by the standard Griess reaction. Briefly, 50 µl of supernatants described above were incubated with an equal volume of Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine, and 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) at room temperature, for 10 minutes (Tsikas 2007). The absorbance was measured at 540 nm in a microplate scanning spectrophotometer (Multiskan GO, Thermo Scientific). The conversion of absorbance into micromolar concentrations of NO was obtained from a sodium nitrite (0–100 µM) standard curve and expressed as NO concentrations (µmol/L).

### *2.8. Hydrogen peroxide production*

The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was measured in supernatants of homogenates of tissues, as described above. Briefly, 50 µL of supernatants were incubated with 50 µL of α-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD), and an equal volume of peroxidase type II 15 mmol/L. The microplate was incubated for 24h at 37°C. After incubated, the reaction was stopped using 50µL of sulfuric acid (10%). The absorbance was measured at 490 nm in a microplate scanning spectrophotometer (Multiskan GO). The conversion of

absorbance into micromolar concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was calculated from a standard curve using a known concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The results were expressed as μmol/L.

### *2.9. Enzymes activity assays*

#### Superoxide dismutase activity

The activity of SOD was determined by the method based on the reduction of the superoxide (O<sup>-2</sup>) and hydrogen peroxide, thereby decreasing the auto-oxidation of pyrogallol, according to (Dieterich et al., 2000). The reaction mixture contains 99 μl of potassium phosphate buffer (5 mmol/L, pH 7) and 30 μL of sample. The reaction was started by adding 15 μL of pyrogallol (100 μmol/L). The reaction mixture was measured by absorbance at 570 nm. SOD activity was calculated as units per milligram of protein, with one U of SOD defined as the amount that inhibited the rate of pyrogallol autoxidation by 50%.

#### Catalase activity

Catalase activity (CAT) was determined according to (Aebi, 1984) using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrate. Briefly, 1 ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added to the reaction mixture containing 10 μL of sample in 1.0 ml of potassium phosphate buffer (50 mmol/L, pH 7.0). After addition, the reaction mixture was monitored at 240 nm for 1 min at an interval of 30 s. An extinction coefficient of  $\epsilon_{240} = 0.036 \text{ mmol/L} \times \text{cm}$  was used for calculations. One unit of CAT activity was defined as the amount of enzyme that decomposes one mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 min. Catalase activity was calculated as U per milligram of protein.

## Glutathione S-transferase activity

GST activity was measured using the method of (Habig et al., 1974). Glutathione S-transferase activity (GST) was assayed according to through the formation of glutathione-conjugated 2,4- dinitrochlorobenzene (CDNB). Briefly, 1 mmol/L of CDNB was added to the buffer containing 1 mmol/L of GSH and the aliquot (10 $\mu$ L) of the sample to be tested. Upon addition of CDNB, the change was monitored with absorbance at 340 nm for 60 seconds. The molar extinction coefficient used for CDNB was  $\epsilon_{340} = 9.6 \text{ mmol/L} \times \text{cm}$ . One unit of GST activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed the formation of one  $\mu$ mole of product/min/mL. GST activity was expressed as U per milligram of protein.

### *2.10. Determination of reduced glutathione*

Reduced glutathione (GSH) levels were evaluated according to the protocol of Akerboom and Sies (1981, modified by Welker et al. 2012). The liver (100 mg) was homogenized in 0.5 ml of 10% TCA using a homogenizer (OMNI) and then centrifuged at 15,000 g for 10 min at 4°C. The supernatant (0.2 mL) of this homogenate was mixed with 2.6 ml of potassium phosphate buffer (0.2 mol/L, pH 7.0). The reaction was initiated by the addition of 0.2 ml 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) and the absorbance was monitored at 412 nm. The concentration of GSH was determined by using the standard curve of known concentrations of GSH. The results were expressed as nmol of GSH per mg of protein.

### *2.11. Determination of malondialdehyde*

The extent of lipid peroxidation (LPO) was measured according to Buege & Aust (1978), involving the measurement of total malondialdehyde (MDA) which is the major product of lipid peroxidation. Briefly, 0.2 ml of the supernatant of tissues were homogenized in 0.4 ml of a solution of trichloroacetic acid (15%)/thiobarbituric acid (0.375%)/hydrochloric acid (0.6%). The total reaction mixture was kept in boiling water bath for 40 minutes. After cooling on the ice, butyl alcohol (0.6 mL) was added, then the solution was vortexed for 2 minutes and centrifuged for 10 minutes at 9,000 g, the precipitate was removed. The supernatant was used to measure the absorbance at 535 nm in a microplate scanning spectrophotometer (Multiskan GO). The concentration of MDA was determined by using the standard curve of known concentrations of 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane (TMPO). The results were expressed as  $\mu\text{mol/L}$  per mg protein.

#### *2.12. Protein oxidation*

Protein carbonyl content was measured using the 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) procedure (Levine et al., 1994) based on the carbonyl groups react with DNPH. The pellets resulting of the tissue homogenates from previous extractions were used for quantification. Pellets were added to 0.5 ml of solution DNPH 10 mmol/L diluted in hydrochloric acid (7%), mixed by vortexed and kept at room temperature in the dark, shaking periodically for 30 minutes. Then, 0.5 ml of ice-cold 10% TCA was added to each tube, centrifuged (5,000g for 10 min at 4 ° C) and the supernatant was discarded. The precipitate was washed three times with 1 ml of ethyl acetate and ethanol (1:1 v/v). Finally, 1 ml of sodium dodecyl sulfate (SDS) 6% was added, the tubes were vortexed to dissolve the pellet and the supernatant was measured by absorbance at 370 nm. The results were expressed as nmol per mg of protein based on the molar extinction coefficient of  $\epsilon_{370} = 22 \text{ mmol/L} \times \text{cm}$ .

### *2.13. Energy reserves*

The concentration of total lipids of the liver tissue and pectoral muscle were performed by a gravimetric method according to Folch et al. (1957). Briefly, frozen tissue samples (100 mg) were homogenized in chloroform: methanol (2: 1). After filtration and separation of the phases by the addition of 4 ml of saline 0.9%, an aliquot of the extract (10 ml) was used for determination of total lipids. The results were expressed as g/100g. Total protein was determined by the Lowry et al. (1951) method using bovine serum albumin as a standard. The results were expressed as mg/ g tissue.

Glycogen percentage in the liver was measured by histological sections. Liver tissues were fixed in Karnovsky solution for 24 hours. After this time, the liver tissues were dehydrated in ethanol, cleared in xylol, and embedded in glycol methacrylate (Historesin®, Leica, Germany). Sections were obtained with the aid of a rotary microtome (Leica, Germany). Sections (3-µm) were stained with Periodic acid-Schiff (PAS). To avoid repetitive analysis of the same histological area, sections were evaluated in semi-series using one in every 10 sections. The slides were visualized with a 20× objective lens and, and images (10 images/ animal) were captured using a light microscope equipped with a digital camera (Olympus CX30; Tokyo, Japan). The morphometric analysis was performed using Image Pro-Plus 4.5 image analysis software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). The amount of glycogen was determined by the percentage of points obtained by the means of a checkered grid of 266 points (2660 points per animal), with numbered points (line intersections) on glycogen (Cupertino et al. 2013).

### *2.14. Statistical analysis*

Data distribution was determined by the Shapiro–Wilk test using the program GraphPad Prism (version 6.0, Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Results are expressed as means and standard deviations (mean  $\pm$  SD). The data were submitted to unifactorial one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey post-hoc test for multiple comparisons. Statistical significance was established at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.2. Animals and hepatic functional markers

The glucose serum increased in the groups DTM 0.02 ( $p = 0.01$ ) and DTM 0.04 ( $p = 0.04$ ) (Fig. 1A) compared to the control groups. The total protein serum was not altered in the DTM 0.02 ( $p = 0.07$ ) and DTM 0.04 ( $p = 0.12$ ) groups compared to control (Fig. 1B). ALT enzyme activity increased in the DTM 0.04 group ( $p = 0.026$ ) (Fig. 1C). AST enzyme activity showed an increase in the DTM 0.02 ( $p \leq 0.0001$ ) and DTM 0.04 ( $p = 0.002$ ) groups compared to the control groups (Fig. 1D).

No animals exposed to DTM died during the experiment. Papaya consumption among groups was not altered during the experiment (Table 1). However, oral exposure to DTM for 7 days significantly reduced the body mass (g) of the bats exposed to DTM 0.02 ( $p = 0.005$ ) and DTM 0.04 ( $p < 0.0001$ ) compared to the control group (Table 1).

**Table 1.** Consumption of fruits and body weight from *A. lituratus* exposed daily to DTM.

Treatments		
Control (n=7)	DTM 0.02 (n=8)	DTM 0.04 (n=8)

Weight (g) pre-exposure	69.43 ± 5.91	73.63 ± 11.06	72.28 ± 4.40
Weight (g) post- exposure	68.93 ± 3.44	68.91 ± 6.18	64.60 ± 8.76
Papaya consumption (g/ body mass/ day)	2.10 ± 0.18	1.58 ± 0.10	1.55 ± 0.17
Weight loss (%)*	0.39 ± 2.07 <sup>a</sup>	6.36 ± 3.31 <sup>b</sup>	11.91 ± 3.94 <sup>c</sup>

\* Different letters indicate significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ).

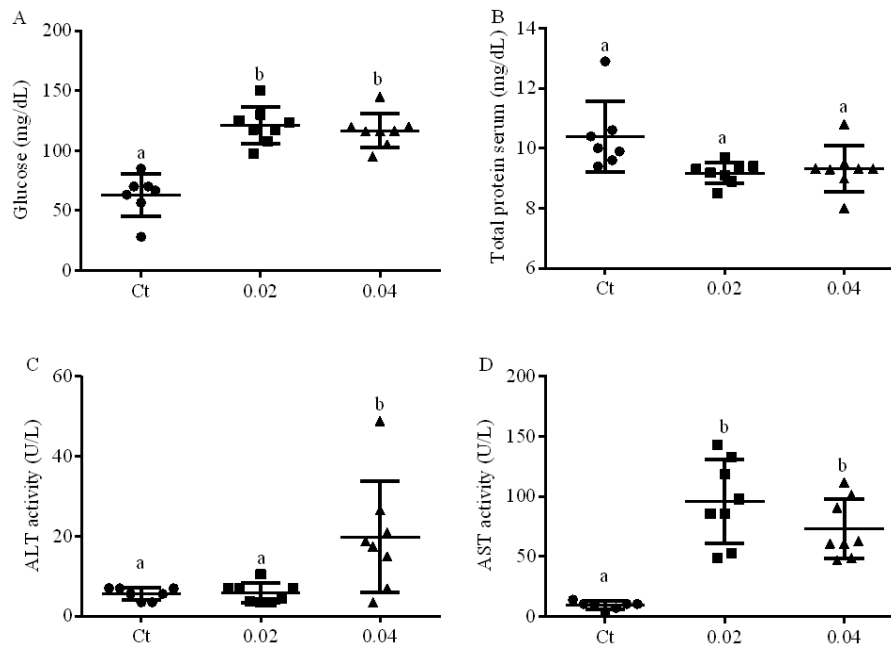


Fig. 1. Damage of DTM in the biochemical biomarkers in *A. lituratus* serum. (A) glucose levels; (B) total protein; (C) AST activity; (D) ALT activity. Ct= Control; 0.02 and 0.04 refer to the two test groups of DTM. Data are expressed as means ± SEM. Different letters indicate significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.3. Oxidative stress evaluation

In the liver, the concentration of nitric oxide (NO) increased in DTM 0.02 ( $p = 0.012$ ) and DTM 0.04 group ( $p = 0.006$ ) compared to control (Fig. 2A). The concentrations of NO in the pectoral muscle were increased in animals treated groups DTM 0.02 ( $p = 0.013$ ) and DTM 0.04 ( $p = 0.018$ ) compared to the control group (Fig. 2A).

The hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) levels were higher in the liver of animals treated with DTM 0.02 ( $p < 0.001$ ) and DTM 0.04 ( $p = 0.01$ ) compared to control animals (Fig. 2B). Unlike the liver, the  $H_2O_2$  levels could not be detected in the pectoral muscle (Fig. 2B).

SOD activity was increased in the liver and pectoral muscle (Fig. 3A) of DTM 0.02 ( $p = 0.01$ ,  $p = 0.006$ ) and DTM 0.04 ( $p = 0.003$ ,  $p = 0.004$ ) groups, respectively. CAT activity increased in the liver of DTM 0.04 group ( $p = 0.03$ ) (Fig. 3B). In the pectoral muscle, the CAT activity increased in both groups DTM 0.02 ( $p < 0.001$ ) and DTM 0.04 ( $p = 0.001$ ) (Fig. 3B). The GST activity increased only in the liver of group DTM 0.04 ( $p = 0.01$ ) (Fig. 3C) accompanied by an increased in GSH ( $p = 0.0005$ ) (Fig. 3D). The GST activity showed no difference in the pectoral muscles of both DTM 0.02 and DTM 0.04 groups (Fig. 3C).

The concentration of MDA in the liver showed difference only in the higher dose group DTM 0.04 ( $p = 0.048$ ) when compared to control (Fig. 4A). However, MDA concentration was increased in the pectoral muscle of both groups DTM 0.02 ( $p = 0.005$ ) and DTM 0.04 ( $p = 0.005$ ) compared to the control group (Fig. 4A). Protein carbonyl content was not different between DTM 0.02 and DTM 0.04 groups with respect to the control group in liver ( $p > 0.05$ ) (Fig. 4B). However, protein carbonyl increased in the pectoral muscles of both groups DTM 0.02 ( $p = 0.03$ ) and 0.04 ( $p = 0.001$ ) in relation to the control group (Fig. 4B).

Moreover, there was a positive moderate correlation between MDA pectoral muscle and protein carbonyls ( $r = 0.6$ ;  $p = 0.006$ ). A positive correlation between MDA and protein total was also found ( $r = 0.7$ ;  $p = 0.0004$ ) (Data not show).

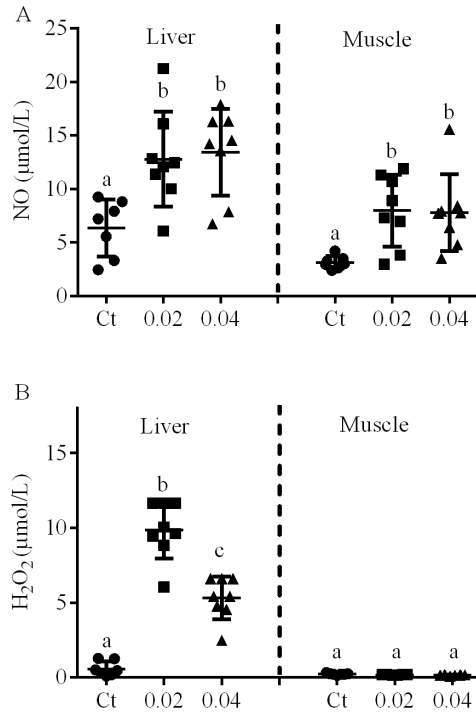


Fig. 2. NO (A) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B) levels in the liver and pectoral muscle of *A. lituratus*. Ct= Control; 0.02 and 0.04 refer to the two test groups of DTM. Data are expressed as means  $\pm$  standard error of the means. Different letters indicate significant differences between groups ( $p < 0.05$ ).

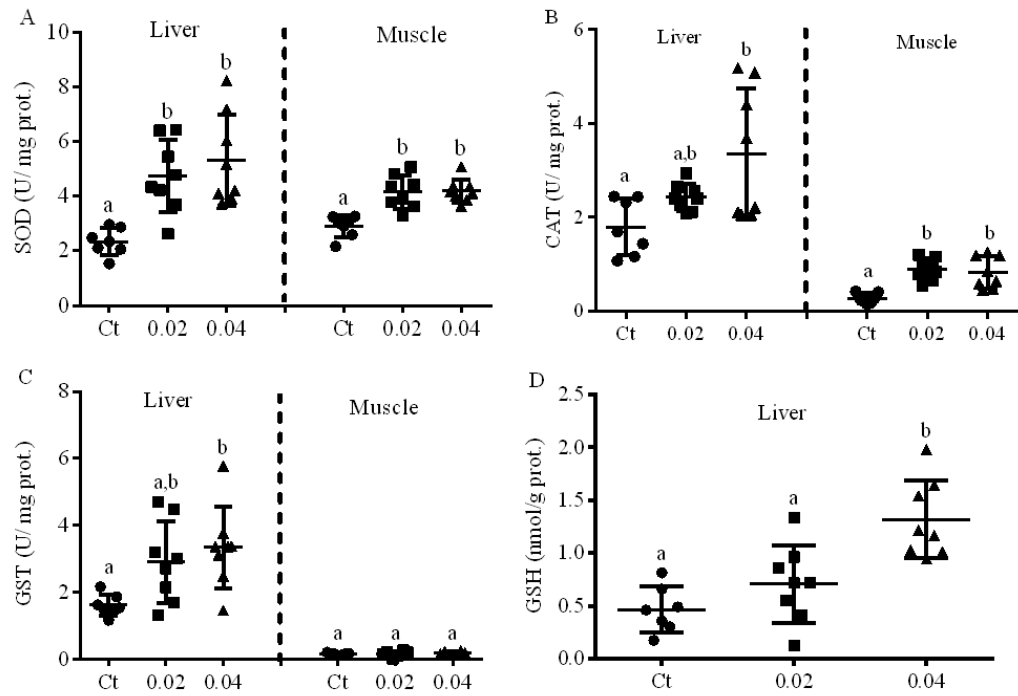


Fig. 3. Enzymes antioxidants in *A. lituratus* liver and pectoral muscle serum. (A) SOD activity; (B) CAT activity; (C) GST activity; (D) GSH levels. Ct= Control; 0.02 and 0.04 refer to the two tested groups. Data are expressed as means  $\pm$  standard error of the means. Different letters indicate significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ).

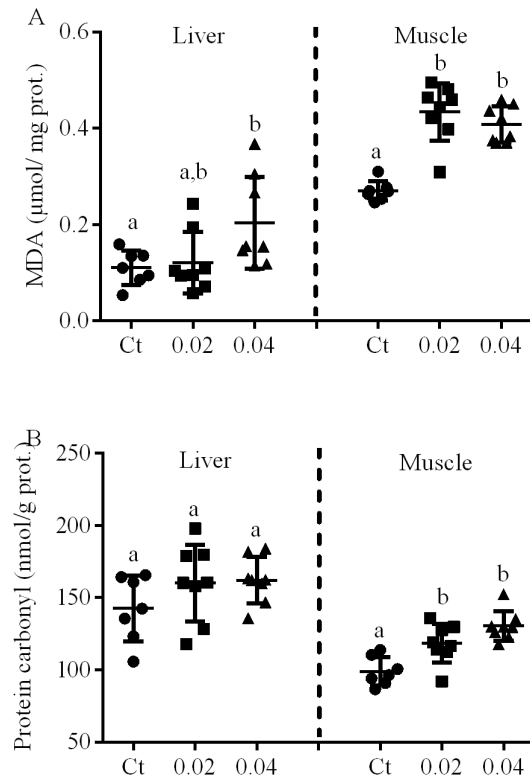


Fig. 4. MDA (A) and Carbonyl protein (B) levels in the liver and pectoral muscle of *A. lituratus*. Ct= Control; 0.02 and 0.04 refer to the two test groups. Data are expressed as means  $\pm$  standard error of the means. Different letters indicate significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.4. Energy reserves

The concentration of liver total lipids increased significantly in the groups treated with DTM 0.02 ( $p= 0.04$ ) and DTM 0.04 ( $p= 0.04$ ) compared to control group (Fig. 5A) indicating hepatic steatosis. However, the total lipid concentration of the pectoral muscle showed no difference between the groups of animals treated DTM 0.02 and DTM 0.04 (Fig. 5A) when compared to control group.

The concentration of total protein in the liver showed no significant changes in the treated groups DTM 0.02 and DTM 0.04 compared to control group (Fig. 5B). But,

there was a significant increase in the concentration of total protein of the pectoral muscle on both groups DTM 0.02 ( $p= 0.006$ ) and DTM 0.04 ( $p= 0.02$ ) when compared to the control group (Fig. 5B).

Glycogen percentage in liver decreased in both group DTM 0.02 ( $p= 0.024$ ) and DTM 0.04 ( $p= 0.016$ ) (Fig. 5C). This reduction can be observed on photomicrographs (Fig. 5 D-F).

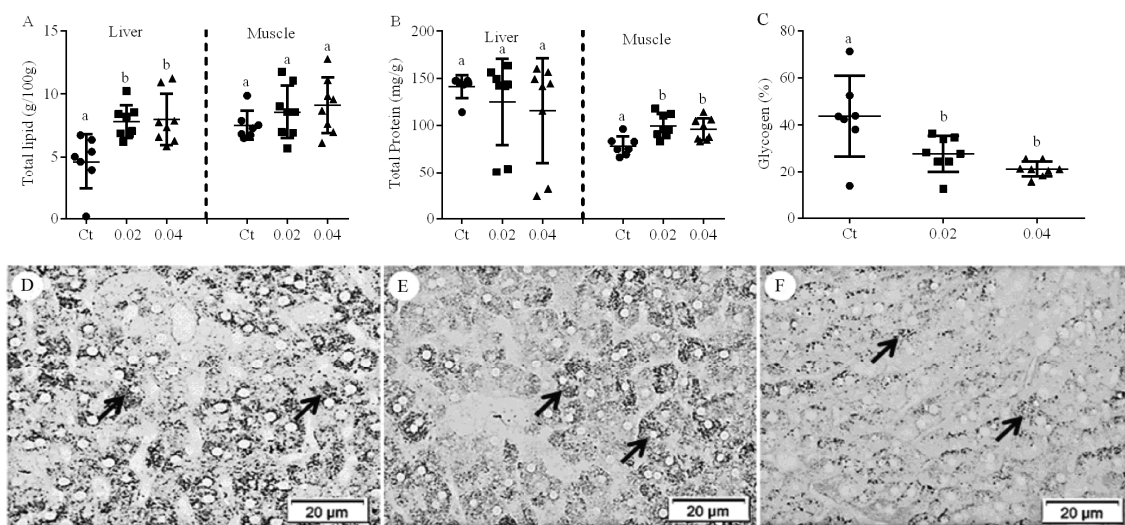


Fig. 5. Effects of pesticide on total lipid (A), total protein (B), and glycogen liver percentage (C) of *A. lituratus* short-term exposed to DTM. Ct= Control; 0.02, 0.04 refer to the two test groups. Data are expressed as means  $\pm$  SD. Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ). Photomicrographs were stained with Periodic acid-Schiff to evidenced glycogen. Control (C), DTM 0.02 (D) and DTM 0.04 (E). Black arrows = glycogen deposits.

#### 4. Discussion

This is the first study showing the effect of short-exposure Neotropical fruit bats to deltamethrin (DTM). In this study, *A. lituratus* exposed to fruit contaminated with DTM showed alterations in the transaminases enzymes, oxidative stress in the liver, pectoral muscle, and changes in energy reserves. These changes indicate that DTM is toxic,

altering the metabolism of carbohydrates and inducing oxidative stress in the liver and pectoral muscle.

The fruit consumption per day between the two exposed groups showed no differences. This result suggests that bats did not detect the presence of DTM in their diet considering that DTM was detected by mass spectrometry in the fruits offered to bats. However, bats exposed to DTM presented loss of body mass as well as female rats treated with low doses of DTM for 45 days (Issam et al., 2012), and insectivorous bats exposed for 3 days to the organochlorine insecticide lindane (Swanepoel et al. 1999). The stress responses caused by DTM can induce metabolic disorders that lead to a loss of body mass in the exposed animals (Hill et al. 2016). This can influence the reproductive success and the ability of bats to accumulate energy reserves, inducing behavioral changes such as increased foraging (Swanepoel et al. 1999).

Bats orally exposed to DTM showed increased serum glucose levels and decreased glycogen percentage in the liver. This occurs due to the stress caused by pesticides in the liver. The pesticides induce the mobilization of liver glycogen through glycogenolysis leading to hyperglycemia status, like described in rats exposed to cypermethrin, deltamethrin, organophosphorus (OP), and organochlorine (OC) pesticides (Rehman et al., 2006; Kanbur et al., 2016; Bhushan et al., 2013; Arora et al., 2016).

In the present study, bats also showed an increase in the AST and ALT enzymes serum in the groups treated with deltamethrin, indicating liver damage. Transaminases are intracellular enzymes that exist only in small amounts in serum. Elevation in the transaminases plasma concentrations indicates the utilization of amino acids for the oxidation or for glycogenesis (Youself et al. 2006). The increase of the enzymes in the

blood can indicate damage like necrosis caused by xenobiotics in the liver, muscle, kidney, and lung corresponding to the stress levels of the treated animals. Thus, these enzymes are being considered as biomarkers of toxicity indication of even minor cellular damage (Naveed et al. 2011). The increase in the AST enzymes could also be attributed to the harmful effect of DTM on muscle fiber membrane that leads to pectoral muscle dysfunction. These results are consistent with the literature (Abdel-Daim et al., 2013; Bhushan et al., 2013; Arora et al., 2016) and can indicate the toxic potential of DTM in liver and muscle.

Exposure to pesticides can induce changes in the production of reactive oxygen species (ROS), such as the superoxide radical ( $O_2^-$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and reactive nitrogen species (RNS) (Limón-Pacheco and Gonsebatt 2009). The liver and pectoral muscles of bats exposed to DTM showed an increase in the nitric oxide (NO) level similar to rats exposed to pyrethroids cypermethrin, low dose of deltamethrin, and OP amitraz (Arora et al., 2016; Kanbur et al., 2016). When nitric oxide (NO) reacts with superoxide radical ( $O_2^-$ ) lead to the production of intra- and extracellular peroxynitrite (ONOOH). The peroxynitrite in the presence of hydrogen ion can yield hydroxyl radicals ( $HO^\bullet$ ), a powerful oxidizing agent that induces damage in various biomolecules, like DNA and proteins (Droge, 2002). Therefore, the increased NO suggests that DTM induces greater synthesis of superoxide radical with inducing consequent changes in antioxidant enzymes and energetic reserves. NO is also synthesized by immune cells (monocytes, macrophages, and neutrophils) (Fukushima et al. 2002). Thus, the liver and pectoral muscle may also have increased inflammation induced by DTM. This process is defined as a rapid and excessive cell release of reactive species that may lead to oxidative stress in bats (Mittal et al., 2014; Schneeberger et al 2013).

The bats orally exposed to both concentrations of DTM, 0.02 and 0.04, had an increase in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in the liver while in the pectoral muscle the levels showed no difference. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is generated by any yielding superoxide radical, acting in the protein structures, enzyme inactivation and oxidation of DNA and lipids (Pisoschi and Pop 2015). The liver is the predominant organ for metabolism of xenobiotics, including pesticides, and the first organ exposed to ingested toxins due to the portal blood supply (Clampitt and Hart 1978). The DTM may have acted differently in both pectoral muscle and liver because the liver is the largest detoxification organ that performs the biotransformation of DTM. Moreover, the liver defense system is more robust and therefore may exhibit a higher degree of intoxication, which is reflected substantially in ROS and antioxidant enzymes.

Antioxidant enzymes such as SOD, CAT, and GST, and non-enzymatic antioxidant molecules such as vitamins (ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol), carotenoids and glutathione are key to maintaining the prooxidant-antioxidant balance and thus maintain the cellular homeostasis.

SOD and CAT activity are important defense mechanisms against toxic effects of ROS. SOD catalyzes the conversion of superoxide radicals to hydrogen peroxide, while CAT converts hydrogen peroxide into water and oxygen (Droge, 2002). In the study, the activity of enzymes SOD and CAT increased in the liver and pectoral muscle. Probably because DTM process of detoxification induced intense cellular production of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicating the beginning of the generation of RNS and ROS.

Another antioxidant enzyme involved in xenobiotic detoxification is the glutathione S-transferase (GST). The activity GST enzyme increased in the liver of the bats with an increase of reduced glutathione (GSH). The GST plays a role in phase II reactions,

involved with the biotransformation of molecules, mainly aldehydes produced in lipid peroxidation, contributing to the body detoxification by adding a GSH-group to xenobiotic or their metabolites. So the molecules become more water-soluble and thus can be excreted more easily (Hayes et al., 2004). Moreover, GST disrupts production of lipid peroxidation by reducing hydroperoxides that are formed by the production of ROS (Sharma et al., 2004). Thus, increased GST in the liver may have been essential to avoid a significant increase in lipid peroxidation observed in the liver.

The low concentration of the insecticide DTM may be the cause of the increase of the antioxidant enzymes in the bat's tissues evaluated in this study. Rats and fish exposed orally to DTM in low doses also showed an increase of the antioxidants enzymes in liver and muscle (Ceyhun et al. 2010; Arora et al. 2016). These authors observed that the activities of these enzymes decreased with the increase of DTM concentrations and exposure time. The high production of antioxidant enzymes in exposed animals promotes protection against oxidative stress induced by pesticides. However, increasing antioxidant capacity has a cost and requires different sources of energy. Long exposure to oxidizing agents, such as DTM, will influence the elevation of oxidative damage, which will eventually lead to the reduction of the antioxidant capacity of these animals (Beaulieu and Costantini 2014), as observed in bats exposed for a long period to endosulfan and heavy metal (Naidoo et al., 2015; Oliveira et al., 2017).

In this study, the bats exposed to DTM showed an increase in the byproduct of lipid peroxidation, the malondialdehyde (MDA), in the pectoral muscle. The increase of the free radical probably induced an oxidative state in the cell. The MDA in the pectoral muscle can cause cellular damages, like protein dysfunction, and lead to the formation of aggregates in the bat cells that can accumulate and form insoluble fibrils, affecting

protein function inside the cell (Gonçalves et al. 2016). It was observed that groups that presented increased MDA also increased protein carbonyl and total protein content in the pectoral muscle. The MDA molecules cross-link to amino groups of lipids and proteins and cause the polymerization of membrane proteins and formation of Schiff-bases, which results in dysfunctional proteins, leading to the increase of total proteins (Droge, 2002; Pisoschi and Pop, 2015). These results show that the exposure to DTM in low doses and short- time exposure can cause the formation of MDA with oxidation of proteins in the bat pectoral muscles, as confirmed by the correlation test of 70%. Similar changes associated with the amount of protein and MDA were found in fish muscles exposed to organophosphorus diazinon, methyl parathion and glyphosate (Monteiro et al., 2006; Oruç and Usta, 2007; Sinhorin et al., 2014). Thus, the results found in this study, the increase of NO, the formation of protein carbonyl and MDA, suggest that the DTM probably accumulated in the pectoral muscle tissue of bats and generated oxidative stress. The oxidative stress caused by DTM in the pectoral muscle of bats may induce muscular damage as observed in rats after exposure to DTM (Starr et al., 2015). Damage in pectoral muscle can impair the ability of bats to fly because the flight is generated by the contraction of the pectoral muscles and the biceps brachii (Konow et al.2017). If the flying ability of bats is altered, these animals may have difficulty in foraging and reproductive behaviors, making it difficult to survive.

Bats have an ability to maintain low levels of oxidative stress (Wilhelm Filho et al. 2007; Salmon et al. 2009). In addition, fruit bats exhibit the higher concentration of antioxidants in their fruit diet, which also contribute to enhancing their defense system (Schneeberger et al. 2014). However, our study showed that despite having the

potentially more effective antioxidants defense system, fruit bats are susceptible to the effects of the low doses of the insecticide DTM.

Additionally, data presented in our study suggested that DTM had the same effects that the OP pesticides and carbamates on the pectoral muscle of bats. These pesticides act increasing the  $H_2O_2$  which lead to a decrease of acetylcholinesterase and an increase in the concentrations of MDA, total proteins and antioxidant enzymes in fish and rats muscle (Milatovic et al., 2006; Oruç and Usta 2007; Karami-Mohajeri and Abdollahi 2011; Karami-Mohajeri et al., 2014).

DTM is considered an energetic stressor because generates an increase in the metabolic rate and a consequent decrease in the reserves of hepatic glycogen and total proteins. This event induces increased storage of lipid in liver cells. In this study, total lipid concentrations increased in the liver of bats treated with DTM. The increase in total lipid concentration in the liver suggests that DTM induced hepatic steatosis and changes in carbohydrate metabolism like described to other pesticides (Amaral et al. 2012a; Bhushan et al. 2013; Liang et al. 2013; Oliveira et al. 2017). Similar results were reported in rats and freshwater fish exposed to low doses of pyrethroids (Bhushan et al., 2013; Sapana Devi and Gupta, 2014). The bat *A. lituratus* exposed for 30 days at commercial doses of OP Fenthion showed an increase in total lipid in the liver (Amaral et al., 2012).

Exposure to DTM impairs key enzymes related to amino acid catabolism by preventing liver cells from absorbing effectively amino acids from the blood. Consequently, this disturbance in energy metabolism induces hepatotoxicity, mainly steatosis and oxidative stress, as supported by the results of this study.

## **5. Conclusions**

This is the first study to check the toxic effects of oral exposure to low doses of DTM on *A. lituratus* fruit bats. The present results show that DTM can alter the metabolism of carbohydrates and induce oxidative stress in the liver and pectoral muscle of bats. For the first time, we evaluated changes in the pectoral muscle of bats and we observed that this tissue was highly affected by DTM.

## **Funding**

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## **Acknowledgment**

The authors thank the Nucleus of biomolecules and the Museum of Zoological João Moojen of Universidade Federal de Viçosa.

## **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## **References**

- Abdel-Daim, M.M., Abuzead, S.M.M., Halawa, S.M., 2013. Protective Role of *Spirulina platensis* against Acute Deltamethrin-Induced Toxicity in Rats. PLoS One 8. doi:10.1371/journal.pone.0072991
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Albuquerque, A.F., Ribeiro, J.S., Kummrow, F., Nogueira, A.J.A., Montagner, C.C.,

- Umbuzeiro, G.A., 2016. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. *Environ. Sci. Process. Impacts* 18, 779–787. doi:10.1039/C6EM00268D
- Allinson, G., Mispagel, C., Kajiwara, N., Anan, Y., Hashimoto, J., Laurenson, L., Allinson, M., Tanabe, S., 2006. Organochlorine and trace metal residues in adult southern bent-wing bat (*Miniopterus schreibersii bassanii*) in southeastern Australia. *Chemosphere* 64, 1464–1471. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.12.067
- Amaral, T.S., Carvalho, T.F., Silva, M.C., Barros, M.S., Picanço, M.C., Neves, C.A., Freitas, M.B., 2012. Short-term effects of a spinosyn's family insecticide on energy metabolism and liver morphology in frugivorous bats *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). *Brazilian J. Biol.* 72, 299–304. doi:10.1590/S1519-69842012000200010
- Amaral, T.S., Carvalho, T.F., Silva, M.C., Goulart, L.S., Barros, M.S., Picanço, M.C., Neves, C. a., Freitas, M.B., 2012. Metabolic and Histopathological Alterations in the Fruit-Eating Bat *Artibeus lituratus* Induced by the Organophosphorous Pesticide Fenthion. *Acta Chiropterologica* 14, 225–232. doi:10.3161/150811012X654420
- Arora, D., Siddiqui, M.H., Sharma, P.K., Singh, S.P., Tripathi, A., Mandal, P., Singh, U.S., Singh, P.K., Shukla, Y., 2016. Evaluation and physiological correlation of plasma proteomic fingerprints for deltamethrin-induced hepatotoxicity in Wistar rats. *Life Sci.* 160, 72–83. doi:10.1016/j.lfs.2016.04.025
- Agrawal A., Sharma B., 2010. Pesticides induced oxidative stress in mammalian systems. *Int. J. Biol. Med. Res.* 3, 90–104.
- Bhushan, B., Saxena, P.N., Saxena, N., 2013. Biochemical and histological changes in rat liver caused by cypermethrin and beta-cyfluthrin. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 64, 57–67. doi:10.2478/10004-1254-64-2013-2184

- Brasil- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003).  
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9446f78047458c8895a3d53fbc4c6735/D06++Deltametrina.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 21 set. 2014
- Brinati, A., Maria, J., Viviane, O., Oliveira, S., Soares, M., Bruno, B., Carvalho, M., Silva, L., Eliana, M., Queiroz, L., Luiz, S., Matta, P., 2016. Low , Chronic Exposure to Endosulfan Induces Bioaccumulation and Decreased Carcass Total Fatty Acids in Neotropical Fruit Bats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1–6. doi:10.1007/s00128-016-1910-8
- Cupertino, M.C., Costa, K.L.C., Santos, D.C.M., Novaes, R.D., Condessa, S. S., Neves, A.C., Oliveira, J.A., Matta, S.L.P., 2013. Long-lasting morphofunctional remodelling of liver parenchyma and stroma after a single exposure to low and moderate doses of cadmium in rats. *Int. J. Exp. Path.* 94, 343–351. doi: 10.1111/iep.12046.
- Clampitt R.B., Hart R.J., 1978. The tissue activities of some diagnostic enzymes in ten mammalian species. *J Comp Pathol* 88:607–621
- Dennis, G.C., Gartrell, B.D., 2015. Nontarget Mortality of New Zealand Lesser Short-tailed bats ( *Mystacina tuberculata*) Casused by Diphacionone. *J. Wildl. Dis.* 51, 177–186. doi:10.7589/2013-07-160
- Dieterich, S., Bieligm, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., Prestle, J., 2000. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart : Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. *Circulation* 101, 33–39. doi:10.1161/01.CIR.101.1.33
- Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
- El-Demerdash FM (2011) Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase

- in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food Chem Toxicol* 49:1346–1352. doi: 10.1016/j.fct.2011.03.018
- Fernández, M.A., Hernández, L.M., Ibáñez, C., González, M.J., Guillén, A., Pérez, J.L., 1993. Congeners of PCBs in three bat species from Spain. *Chemosphere* 26, 1085–1097. doi:10.1016/0045-6535(93)90197-D
- Folch J, Less M, Sloane Stanley GHA (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226-497
- Fukushima T, Tanaka K, Lim H, Moriyama M (2002) Mechanism of cytotoxicity of paraquat. *Environ Health Prev Med* 7:89–94. doi: 10.1265/ehpm.2002.89
- Habig, W.H., Pabst, M.J., William B. Jakoby, 1974. Glutathione S- Transferases. *J. Biol. Chem.* 25, 7130–7139.
- Gonçalves R.V., Novaes R.D., Sarandy M.M. et al (2016) *Schizocalyx cuspidatus* (A. St.-Hil.) Kainul. & B. Bremer extract improves antioxidant defenses and accelerates the regression of hepatic fibrosis after exposure to carbon tetrachloride in rats. *Nat. Prod. Res.* 00, 000–000. (in press). doi: 10.1080/14786419.2016.1143825
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2004. Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857
- Hermes-Lima M., 2004. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: Kenneth B. Storey (Ed). *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation.* Wiley-Liss, NY: John Wiley & Sons, Inc. p. 319- 368
- Hill K., Aswegen S.V., Schoeman, A.C., Claassens, S., Rensburg, P.J.V., Naidoo, S., Vosloo, D., 2016. Foraging at wastewater treatment works affects brown adipose tissue fatty acid profiles in banana bats. *Biology Open*, 0:1-8. doi:10.1242/bio.013524

- Kanbur, M., Siliğ, Y., Eraslan, G., Karabacak, M., Soyer Sarıca, Z., Şahin, S., 2016. The toxic effect of cypermethrin, amitraz and combinations of cypermethrin-amitraz in rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 5232–5242. doi:10.1007/s11356-015-5720-z
- Kannan, K., Yun, S.H., Rudd, R.J., Behr, M., 2010. High concentrations of persistent organic pollutants including PCBs, DDT, PBDEs and PFOS in little brown bats with white-nose syndrome in New York, USA. *Chemosphere* 80, 613–618. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.04.060
- Karami-Mohajeri, S., Abdollahi, M., 2011. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 1119–40. doi:10.1177/0960327110388959
- 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, 251–63. doi:10.1177/0960327113493300
- Levine, R.L., Willians, J.A., Stadtman, E.R., Schacter, E., 1994. Carbonyl Assays for Determination of Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzymol.* 233, 346–257.
- Lilley, T.M., Ruokolainen, L., Meierjohann, A., Kanerva, M., Stauffer, J., Laine, V.N., Atosuo, J., Lilius, E.M., Nikinmaa, M., 2013. Resistance to oxidative damage but not immunosuppression by organic tin compounds in natural populations of Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*). *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 157, 298–305. doi:10.1016/j.cbpc.2013.01.003

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL., Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75
- Milatovic, D., Gupta, R.C., Aschner, M., 2006. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. *ScientificWorldJournal*. 6, 295–310. doi:10.1100/tsw.2006.38
- Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., Malik, A.B., 2014. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal*. 20, 1126–67. doi:10.1089/ars.2012.5149
- Monteiro, D.A., de Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 143, 141–149. doi:10.1016/j.cbpc.2006.01.004
- Naidoo, S., Vosloo, D., Schoeman, M.C., 2015. Pollutant exposure at wastewater treatment works affects the detoxification organs of an urban adapter, the Banana Bat. *Environ. Pollut.* 208, 830–839. doi:10.1016/j.envpol.2015.09.056
- Oliveira, J.M., Brinati, A., Divina, L., Miranda, L., Morais, D.B., 2017. Exposure to the insecticide endosulfan induces liver morphology alterations and oxidative stress in fruit-eating bats Short running title: Endosulfan exposure in fruit bats. *Int. J. Exp. Pathol.* 1–9. doi:10.1111/iep.12223
- Oruç, E., Usta, D., 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 48–55. doi:10.1016/j.etap.2006.06.005
- Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 55–74. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040
- Pournourmohammadi, S., Farzami, B., Ostad, S.N., Azizi, E., Abdollahi, M., 2005. Effects of malathion subchronic exposure on rat skeletal muscle glucose

- metabolism. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 191–196.  
doi:10.1016/j.etap.2004.07.002
- Rehman, H., Ali, M., Atif, F., Kaur, M., Bhatia, K., Raisuddin, S., 2006. The modulatory effect of deltamethrin on antioxidants in mice. *Clin. Chim. Acta* 369, 61–65. doi:10.1016/j.cca.2006.01.010
- Rjeibi, I., Ben Saad, A., Hfaiedh, N., 2016. Oxidative damage and hepatotoxicity associated with deltamethrin in rats: The protective effects of *Amaranthus spinosus* seed extract. *Biomed. Pharmacother.* 84, 853–860.  
doi:10.1016/j.biopha.2016.10.010
- Santos, M.A.T. Dos, Areas, M.A., Reyes, F.G.R., 2007. Piretróides - uma visão geral. *Aliment. e Nutr. - Brazilian J. Food Nutr.* 18, 339–349.
- Sapana Devi, M., Gupta, A., 2014. Sublethal toxicity of commercial formulations of deltamethrin and permethrin on selected biochemical constituents and enzyme activities in liver and muscle tissues of *Anabas testudineus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 115, 48–52. doi:10.1016/j.pestbp.2014.08.004
- Schiesari, L., Waichman, A., Brock, T., Adams, C., Grillitsch, B., 2013. Pesticide use and biodiversity conservation in the Amazonian agricultural frontier. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368, 20120378. doi:10.1098/rstb.2012.0378
- Schneeberger, K., Czirják, G. A., Voigt, C. C., 2017. Inflammatory challenge increases measures of oxidative stress in a free-ranging, long-lived mammal. *J Exp Biol.* 216, 4514–4519. doi:10.1242/jeb.090837
- Sharma, R., Yang, Y., Sharma, A., Awasthi, S., Awasthi, Y.C., 2004. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* 6, 289–300.  
doi:10.1089/152308604322899350

- Sinhorin, V.D.G., Sinhorin, A.P., Teixeira, J.M. dos S., Miléski, K.M.L., Hansen, P.C., Moreira, P.S.A., Kawashita, N.H., Baviera, A.M., Loro, V.L., 2014. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 181–187. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.04.040
- Starr, J.M., Graham, S.E., Ross, D.G., Tornero-Velez, R., Scollon, E.J., DeVito, M.J., Crofton, K.M., Wolansky, M.J., Hughes, M.F., 2015. Environmentally relevant mixing ratios in cumulative assessments: A study of the kinetics of pyrethroids and their ester cleavage metabolites in blood and brain; and the effect of a pyrethroid mixture on the motor activity of rats. *Toxicology* 320, 15–24. doi:10.1016/j.tox.2014.02.016
- Swanepoel, R.E., Racey, P.A., Shore, R.F., Speakman, J.R., 1999. Energetic effects of sublethal exposure to lindane on pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus*). *Environ. Pollut.* 104, 169–177. doi:10.1016/S0269-7491(98)00196-1
- Tsikas D (2007) 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. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 851:51–70. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.07.054
- Valentine WM (1990) Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 20(2):375-82.
- Welker, A. F., Campos, E. G., Cardoso, L. A., Hermes-Lima, M., 2012. Role of catalase on the hypoxia/reoxygenation stress in the hypoxia-tolerant *Nile tilapia*. 302 (9): 1111-1118. doi: 10.1152/ajpregu.00243.2011
- Zhu, P., Fan, S., Zou, J.H., Miao, H., Li, J.G., Zhang, G.W., Wu, Y.N., 2014.

Application of gas chromatography-mass spectrometry in analyzing pharmacokinetics and distribution of deltamethrin in miniature pig tissues.

Biomed. Environ. Sci. 27, 426–35. doi:10.3967/bes2014.035

## **ARTIGO 2**

### **Deltametrina induz histotoxicidade hepática, intestinal e renal em morcegos frugívoros**

Artigo formatado de acordo com as normas da Revista *Environmental Toxicology*

## **Deltametrina induz histotoxicidade hepática, intestinal e renal em morcegos frugívoros**

### **RESUMO**

Deltametrina (DTM) é um piretroide sintético amplamente utilizado no manejo de diversas culturas devido sua ação inseticida. No entanto, esse piretroide pode contaminar o ambiente e causar danos à saúde de organismos não alvos, como por exemplo os morcegos frugívoros que entram em contato com esse tóxico através da água e alimentação. Porém a literatura científica apresenta escassez de dados que demonstram a toxicidade dos inseticidas e seus efeitos na fisiologia dos morcegos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a exposição oral de curto prazo do morcego frugívoro (*Artibeus lituratus*) a duas concentrações de DTM (0,02 e 0,04 mg/ kg do mamão) sobre parâmetros imunológicos e histopatológicos, através de análises de proliferação celular, atividade bactericida, patologias e estereologia hepática, renal e intestinal. O intestino dos animais expostos a ambas concentrações apresentou histopatologias pronunciadas sendo os infiltrados inflamatórios, degenerações e necrose as patologias mais frequentes, além de hiperplasia de células calciformes totais e produtoras de mucinas ácidas e aumento das células apoptóticas próximas a região da lâmina basal. No fígado, as alterações mais frequentes foram: vacuolização, hipertrofia nuclear, infiltrado inflamatório e esteatose. O fígado também apresentou aumento no diâmetro nuclear dos hepatócitos, o que indica maior atividade celular. Os rins dos animais expostos apresentaram infiltrado inflamatório, nefrosclerose benigna, vacuolização e necrose. Adicionalmente, a DTM induziu a redução de óxido nítrico, diminuiu o diâmetro glomerular e aumentou o percentual de glicogênio nos túbulos proximais. Não houve alterações nos parâmetros imunológicos avaliados. Nossos resultados sugerem que a exposição aguda a DTM em baixas concentrações, tem o potencial de induzir histotoxicidade em órgão vitais, como fígado, rim e intestino, de morcegos frugívoros.

**Palavras-chaves:** *Artibeus lituratus*, Chiroptera, toxicologia, pesticida, piretroide.

## 1 INTRODUÇÃO

Os inseticidas piretroides são amplamente utilizados na atividade agropecuária em todo o mundo, em substituição aos organoclorados e organofosforados. Esses inseticidas também são extensivamente utilizados em residências para o controle de insetos e na saúde pública para o controle de vetores de doenças [1]. Porém, resíduos de pesticidas no ambiente podem ser tóxicos e causar alterações fisiológicas em organismos não alvos, como mamíferos selvagens.

Dentre os principais pesticidas piretroides a deltametrina (DTM) é considerado o mais tóxico para vertebrados [5,6]. Os resíduos desse inseticida e de outros piretroides são encontrados regularmente em amostras de água de rios, sedimentos e em diferentes espécies de peixes. Esses resíduos normalmente estão acima do limite máximo permitido pela organização mundial de saúde [4,7]. Uma vez no ambiente, os piretroides, que possuem características lipofílicas, são rapidamente absorvidos através do trato gastrointestinal e respiratório, dos animais não alvos. Após a ingestão, as moléculas do inseticida atravessam os enterócitos e passam para a circulação entero-hepática por difusão. No fígado ocorre a biotransformação por reações de hidrólise da ligação éster, seguida por diversas reações no sistema enzimático citocromo P450 e reações de conjugação. Esse processo pode causar a bioacumulação dos resíduos em diferentes órgãos como o fígado e o músculo [5,8].

O bioacúmulo dos piretroides, como a DTM, ocorre preferencialmente nos músculos esqueléticos, tecido adiposo, cérebro e baço [5,8]. O processo de biotransformação e consequente bioacúmulo é considerado tóxico e leva a diversos danos. Peixes, ratos e camundongos quando expostos a doses baixas ou subletais da DTM apresentam estresse oxidativo, distúrbios no metabolismo de carboidratos, redução da atividade da acetilcolinesterase e aumento das transaminases hepáticas no plasma. Além disso, os animais apresentam diversas histopatologias no fígado, rins, intestino e também supressão da imunidade inata [9–11].

Através do forrageio os morcegos podem ser expostos aos resíduos de pesticidas, e quando comparados com outros mamíferos, são considerados potencialmente mais sensíveis a pesticidas [12]. Assim esse grupo pode apresentar alterações fisiológicas após exposição à pesticidas assim como peixes e camundongos,

sendo a redução da capacidade antioxidante [17,18] e a inibição da resposta imune inata [19] exemplos da toxicidade de inseticidas para morcegos frugívoros.

O morcego frugívoro *Artibeus lituratus* é uma espécie abundante na América latina e tem importante papel na dispersão de sementes. Quando essa espécie foi exposta a diferentes inseticidas (endossulfam, espinosina e fentiona) apresentou histopatologias hepáticas, como vacuolização e necrose [18,20,21]. Alterações fisiológicas acarretam perda de homeostase pois compromete o processo reprodutivo, na taxa de forrageio, na capacidade de resposta a algum patógeno [22,23].

Apesar da importância ecológica dos morcegos frugívoros, ainda são escassos [18,20,21] os estudos que avaliam os impactos dos inseticidas sobre a histopatologia nesses animais. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de baixas concentrações da formulação comercial do inseticida DTM sobre a resposta imune inata e histopatologias do intestino, fígado e rim do morcego frugívoro *A. lituratus*.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Químico**

O inseticida piretroide deltametrina (DTM) (formulação: [(S) -ciano-d-fenoxibenzil- (1R, 3R) -e- (2, 2dibromovinil) -2,2-dimetilciclo-propano-1-carboxilato], fabricado pela empresa Bayer Crop Science Ltda (Rio Grande do Sul, Brasil), foi obtido em loja comercial especializada.

### **2.2 Animais**

Foram capturados morcegos machos adultos (n = 17) da espécie *A. lituratus*, com redes de neblina na Mata do Paraíso da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (20° 45 'S e 42 ° 52'W), na cidade de Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil). Todos os animais foram identificados de acordo com a chave para identificação de morcegos brasileiros, pesados e mantidos em gaiolas de aço individuais (45 × 22 cm) em ciclos de temperatura e luz natural. As gaiolas foram colocadas no morcegário cercado por lona situada abaixo das árvores no quintal do museu de Zoologia, na UFV. Todos os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética Animal da Universidade Federal de Viçosa (Processo nº 45/2014) e do Governo

Brasileiro (SISBIO, Processo nº 30904-3), bem como os critérios internacionais para o cuidado e uso de animais.

### 2.3 Design experimental

Após captura, os animais foram mantidos por quatro dias em cativeiro para adaptação, antes de iniciar o experimento. Nesse momento os animais receberam mamão, *Carica papaya*, e água *ad libitum*. Após a fase de adaptação os animais foram divididos em três grupos experimentais: 1- 0,0 (Controle n = 6); 2- 0,02 mg de DTM / kg de mamão (DTM 0.02 n = 6); e 3- 0,04 mg de DTM/ kg de mamão (DTM 0.04 n=4). A exposição a DTM foi feita por um período de sete dias. Os mamões foram usados porque os morcegos frugívoros aceitam facilmente esta dieta em cativeiro [20].

O inseticida foi diluído em água e subsequentemente, os frutos foram lavados e a solução foi pulverizada diariamente (2 ml) de forma homogênea em toda a casca da fruta. Os frutos tratados foram mantidos suspensos em recipiente modificado de modo que não entrassem em contato com qualquer superfície que poderia perder a camada do pesticida. A concentração real do pesticida nas frutas foi mensurada em amostras contendo casca e polpa através do espectrômetro de massa triplo quadrupolo (Triple Quad LC / MS Agilent Technologies-6430). As análises apresentaram as concentrações descritas acima (*dados não mostrados- capítulo 1*).

Após a camada de DTM secar, as frutas foram oferecidas aos animais com a casca voltada para cima, de modo que durante a ingestão os morcegos estariam em contato direto com o inseticida. O fruto foi oferecido a cada noite em torno 18:00 horas, e água foi disponível *ad libitum*. O consumo alimentar foi monitorado diariamente colocando uma quantidade conhecida (150 mg) da fruta em cada gaiola. As sobras foram coletadas e pesadas todas as manhãs às 08h00.

Após os sete dias de exposição, os morcegos foram pesados e eutanasiados com deslocamento cervical seguido de decapitação. O plasma foi coletado e o fígado, rins e intestino foram removidos e pesados para análises histológicas posteriores, o baço foi retirado para o teste de proliferação celular.

## **2.4 Índice hepatossomático**

O fígado de cada morcego foi dissecado e pesado em balança digital com três casas decimais (peso úmido para 0,001 g). O índice hepatossomático foi calculado como uma porcentagem do peso do órgão em relação ao peso corporal total de cada indivíduo (peso do órgão / peso corporal total x 100).

## **2.5 Análises histológicas do intestino, fígado e rins**

Fragmentos dos órgãos (fígado, rins e intestino) foram fixados em solução fixadora Karnovsky e incluídos em glicol metacrilato (Historesin®, Leica, Alemanha). Foram realizados cortes semisseriados de 3 µm de espessura, com intervalo de 30 µm. Os cortes foram obtidos com o auxílio de micrótomo rotativo (Leica, Alemanha). As secções de fígado e rins foram coradas com hematoxilina e eosina. Os rins também foram submetidos a coloração de ácido periódico-Schiff (PAS) para detecção de glicogênio.

As secções do intestino foram submetidas à análise histoquímica utilizando coloração com PAS em conjunto com alcian blue (AB), para detecção de mucopolissacarídeos ácidos e neutros. Além disso, outras secções do intestino foram coradas com corante fluorescente acridine orange (0,02%) com iodeto de propídeo (1%). O acridine orange é um corante que marca células vivas e mortas, enquanto que o iodeto de propídeo marca apenas as células que perderam a integridade da membrana. As células vivas marcam-se uniformemente em verde e podem ser distinguidas das células apoptóticas, pois essas exibem coloração amarelo a laranja, dependendo do grau de perda de integridade da membrana devido à dupla coloração com o iodeto de propídeo. As imagens digitais foram capturadas utilizando fotomicroscópio (EVO Life Technologies, Carlsbad, Canadá) [25].

Após as colorações, foram obtidas imagens digitais (10 imagens/animal) em fotomicroscópio (Olympus CX30) para as análises histopatológicas e histomorfométricas dos tecidos. Todas as análises histopatológicas e histomorfométricas foram realizadas utilizando o software de análise de imagem Image Pro-Plus® 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

### 2.5.1 Análises Histopatológicas

As análises histopatológicas semi- quantitativas foram realizadas através do *histological health index* (HHI) [26]. Este método é baseado na severidade (*a*), fator de importância ( $\omega$ ) e padrão de reações (*rp*) das lesões nos tecidos. As alterações histopatológicas analisadas foram distribuídas em cinco padrões de reações e um fator de importância patológica entre 1 e 3 [27]. Esses números classificam as lesões reversíveis a irreversíveis. Além disso, foi atribuído, para cada alteração, um valor de severidade variando de 0 a 6 que é baseado nas quantificações numéricas (porcentagens) das patologias por animal (Tab. 1).

Tab. 1 Fator de importância e severidade patológica das lesões.

Fator de importância da patologia ( $\omega$ )	Classificação			
	Reversível	Moderada	Irreversível	
	1	2	3	
	Valor da severidade			
Severidade da lesão ( <i>a</i> )	Não observada	Alterações leves	Alteração moderada	Alteração grave
	0	1 ou 2	3 ou 4	5 ou 6

Com base nos valores semi- quantitativos de severidade das lesões e nos valores de importância pré-determinados foi calculado o índice de saúde de cada órgão ( $I_{ORG}$ ). Esse índice determina o nível de alteração histológica do fígado, rim e intestino de cada morcego, através da fórmula:  $I_{ORG} = \sum (a_{orgalt} \times \omega_{orgalt})$ , onde  $I_{ORG}$  é o índice de órgão ( $I_{FIG}$ : para o fígado,  $I_{RIM}$ : para os rins e  $I_{INT}$ : para intestino),  $a_{orgalt}$  é o valor de pontuação da severidade e  $\omega_{orgalt}$  é o fator de importância dentro de um único órgão de um morcego [3,4]. Por fim, foi calculada a média dos valores do  $I_{FIG}$ ,  $I_{RIM}$ ,  $I_{INT}$  por grupo experimental, e em seguida foram enquadradas na classificação descrita por [28] e modificado por [29]. Essa classificação descreve que: valores inferiores a 10, as estruturas histológicas são normais com alterações leves; valores entre 10-20, as estruturas são normais com alterações histológicas moderadas; valores entre 21-30, o tecido apresenta alterações histológicas pronunciadas; valores acima de 30 o tecido possui alterações histológicas severas.

A frequência (FQ%) de cada histopatologia foi calculada através da divisão do número de vezes que a lesão foi encontrada por morcego pelo número total de animais analisado:  $FQ\% = (\eta \text{ injúria} / \eta \text{ total}) \times 100$  onde  $\eta$  injúria é o número de morcegos com

lesão detectada e o  $\eta$  total é o número total de morcego analisado no grupo (Raskovic et al. 2014).

### 2.5.2 Análises histomorfométricas

As análises histomorfométricas do intestino, fígado e rim dos morcegos foram realizadas a partir de 10 fotos por animal capturadas das lâminas histológicas confeccionadas. No fígado foi mensurado o diâmetro de 30 núcleos de hepatócitos por animal. No intestino foi mensurado a espessura da camada muscular, da altura e da largura das vilosidades. Além disso, foi realizada a contagem do número total de células caliciformes, e das células caliciformes secretoras de mucinas mistas, neutras e ácidas.

A proporção de componentes do fígado, incluindo o citoplasma e o núcleo de hepatócitos, capilares sinusoidais e infiltrado inflamatório foram determinados por meio de uma grade quadriculada de 266 pontos (2660 pontos por animal), com pontos numerados (interseções de linhas) nos núcleos e citoplasma dos hepatócitos e nos capilares sinusóides.

Nos rins foi mensurado o diâmetro médio dos glomérulos escolhidos aleatoriamente. A proporção de glicogênio nos túbulos proximais e distais foram determinados em 10 secções, por animal, aleatórias, através de uma grade quadriculada e contagem de 266 pontos (2660 pontos) coincidente.

## 2.6 Ensaio Imunológicos

### 2.6.1 Proliferação celular de esplenócitos

O baço dos animais foi removido assepticamente. As células esplênicas foram obtidas homogeneizando o baço em meio Dulbecco's Modified Eagle's médium (DMEM) estéril. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado por 5 minutos a 540 xg, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 5 mL de tampão de hemácia. Após 2 minutos em temperatura ambiente a suspensão foi centrifugada novamente (5 minutos a 540 xg). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso com 1 mL de PBS. Os esplenócitos foram marcados com éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) e cultivados por 24 e 48 horas em presença de concanavalina A ou apenas meio de cultura em estufa de CO<sub>2</sub>. Em seguida, a capacidade de proliferação celular foi

avaliada utilizando o citômetro de fluxo (BD FACS) (fonte). Foram analisadas dez mil células por amostra.

### 2.6.2 Atividade bactericida

Foram avaliados os aspectos solúveis da imunidade inata através da atividade bactericida *in vitro* do plasma dos morcegos contra a bactéria *Escherichia coli* [24]. As amostras de plasma foram diluídas (1:20) em meio de cultura enriquecido com 3mM de L-glutamina e 5% de soro fetal bovino. Para cada uma das amostras diluídas (14µL) foi adicionado 20 µL de uma suspensão de *E. coli* ( $10^{-4}$ ). Após incubação de 30 minutos a 37°C, 50 µL da mistura de plasma-bactérias foi espalhada em placas de agar (Agar-agar) e incubadas durante a noite a 37°C. Como controle foi utilizado 14µL do meio apenas com a suspensão bacteriana (fonte). As unidades formadoras de colônia foram contadas e a atividade bactericida foi definida como a porcentagem de bactérias mortas por grupo.

## 2.7 Produção de óxido nítrico nos rins

Amostras dos rins congeladas (100mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato pH 7,4 0,2 M mais 1M EDTA usando um homogeneizador (OMNI) e depois centrifugados (13, 8 g por 10 min a 4°C). O sobrenadante foi utilizado para mensurar nitrito como indicador da síntese de óxido nítrico (NO) a partir da reação de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de dicloridrato de naftileno diamina e 2,5% de ácido fosfórico). As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro de varredura de microplacas (Multiskan GO User Manual, Thermo Scientific, Ratastie 2 e Finlândia) (570 nm) e os valores foram expressos em µM.

## 2.8 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prism (versão 6.0, Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados foram avaliados pela análise de variância unidirecional (ANOVA) e as diferenças entre médias foram comparadas pelo teste de comparações múltiplas de *Bonferroni*. Os dados

foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em  $P \leq 0,05$ .

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Análises histopatológicas e histomorfométricas do intestino, fígado e rins**

As estruturas do intestino dos animais do grupo controle se apresentaram normais, com baixa frequência de patologias. No entanto, os morcegos expostos a DTM 0.02 e 0.04 apresentaram alta frequência das patologias: vacuolização, degeneração, hiperplasia de células caliciformes, necrose e infiltrado inflamatório (Tabela 2 e Figura 1). As alterações histológicas nesse tecido apresentaram índice de saúde do órgão ( $I_{INT}$ ) acima de 20 para os grupos DTM 0.02 e 0.04, que indica histopatologias pronunciadas. Além disso, esse valor foi superior ( $P \leq 0,0001$ ) ao valor do grupo controle (Figura 1-D).

O intestino dos animais do grupo DTM 0.04 também apresentaram hiperplasia de células caliciformes totais ( $P= 0,02$ ) (Figura 2-E) e das células secretoras de mucina ácida ( $P= 0,02$ ) (Figura 2-F) em relação ao controle. O número total de células caliciformes secretoras de mucinas mistas e neutras foram iguais entre os grupos, assim como a altura e largura das vilosidades e o comprimento da camada muscular (Tabela 3).

As secções coradas com acredine orange revelaram que o intestino dos morcegos expostos a DTM 0.02 e 0.04 continham maior evidência de células apoptóticas comparada ao grupo controle. Resultado evidenciado pela presença de núcleos apoptóticos (vermelho) (Figura 2).

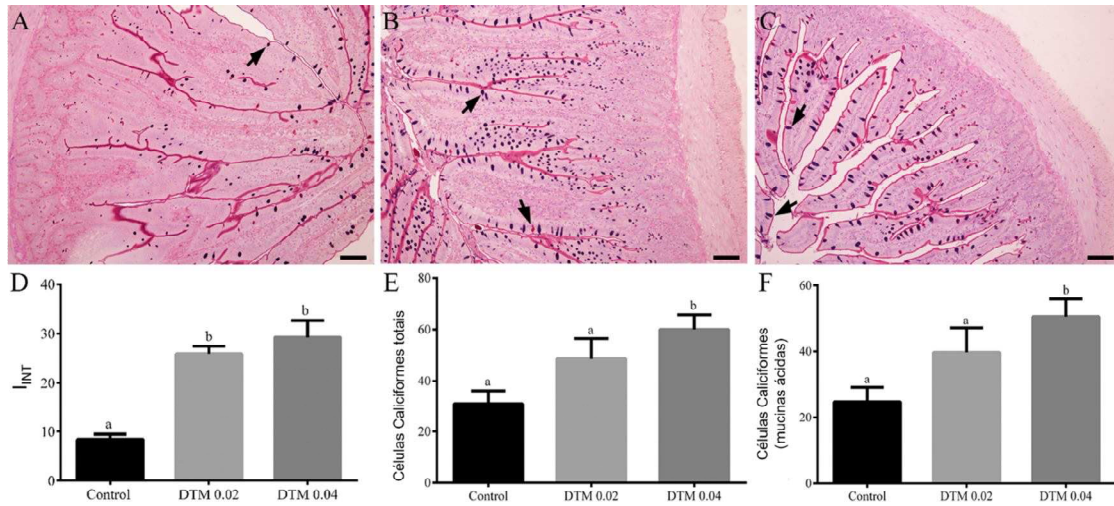


Figura 1 Micrografias de secções histológicas de intestinos de *A. lituratus* controles e expostos à doses de 0,02 e 0,04 mg de DTM/ Kg de mamão. (A) controle; (B) DTM 0,02; (C) DTM 0,04; Coloração: ácido periódico-Schiff (PAS) e alcian blue. Escala da barra= 50µm. Setas= células caliciformes. (D) Índice de saúde do intestino (I<sub>INT</sub>); (E) Número total de células caliciformes, (F) Número total de células caliciformes secretoras de mucinas ácidas.

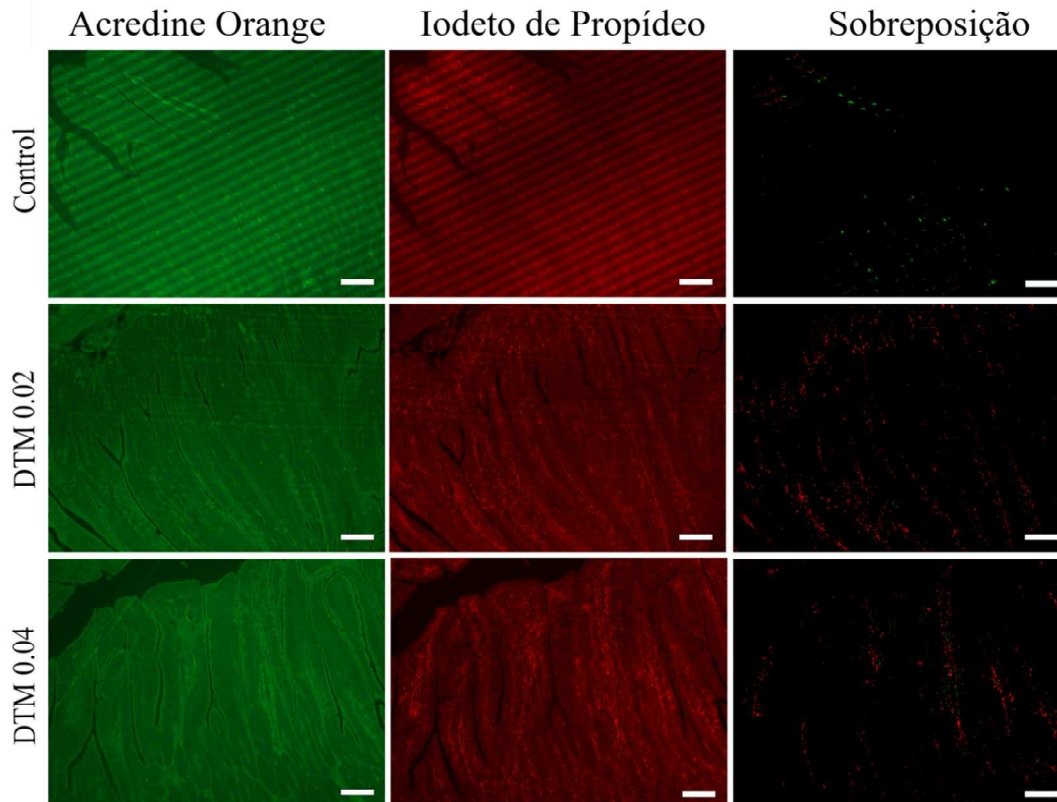


Figura 2 Secções histológicas do intestino dos morcegos *A. lituratus* controle e expostos à 0,02 e 0,04 mg de DTM / Kg de mamão. Coloração dupla, acredine orange com iodeto de propídeo para a detecção de apoptose. Control= grupo controle. Escala da barra=

100 $\mu$ m. Células coradas em verde= células vivas. Células coradas em vermelho= células apoptóticas.

O fígado dos animais do grupo controle apresentaram estrutura normal com alterações leves. Já o fígado dos animais dos grupos DTM 0.02 e DTM 0.04 apresentaram alta frequência das patologias: vacuolização e hipertrofia nuclear dos hepatócitos, degeneração dos cordões, congestão e expansão dos vasos sanguíneos. Nesse mesmo tecido os animais expostos à DTM apresentaram infiltrado inflamatório e esteatose (Tabela 2 e Figura 3). O fígado do grupo controle apresentou índice de saúde ( $I_{FIG}$ ) inferior a 10, considerado normal com alterações leves. O índice de órgão do fígado ( $I_{FIG}$ ) dos grupos DTM 0,02 e 0,04 foram superiores a 20 e maiores ( $P \leq 0,0001$ ) que o índice do grupo controle (Figura 3-D). Entretanto, o índice hepatossomático não alterou entre os morcegos do controle ( $4,03 \pm 0,113$ ), DTM 0.02 ( $4,09 \pm 0,188$ ) e DTM 0.04 ( $3,76 \pm 0,172$ ).

No fígado o diâmetro nuclear dos hepatócitos aumentou nos animais dos grupos DTM 0.02 e 0.04 ( $P \leq 0,0001$ ) quando comparado ao controle (Figura 3-F). A porcentagem de infiltrado inflamatório também aumentou no grupo DTM 0.04 (Figura 3-E). Não houve alterações na porcentagem de núcleos, citoplasma e capilares sinusóides nos animais dos dois grupos expostos em relação ao controle (Tabela 3).

Os rins dos animais do grupo controle apresentaram estrutura normal com alterações leves. Os rins dos morcegos dos grupos expostos à DTM 0.02 e 0.04 apresentaram alta frequência das patologias: redução glomerular, vacuolização citoplasmática, degeneração, redução tubular e hipertrofia nuclear (Tabela 2 e Figura 4). Assim, o índice de órgão do rim ( $I_{RIM}$ ) dos grupos DTM 0.02 e 0.04 foram superiores a 30 e maiores ( $P \leq 0,0001$ ) que o índice do grupo controle (Figura 4-A). Além disso, houve aumento da porcentagem de glicogênio no túbulo proximal do grupo DTM 0.04 ( $P = 0,04$ ) quando comparado ao controle (Figura 4- B). A porcentagem de glicogênio no túbulo distal foi semelhante entre os grupos (Tabela 3).

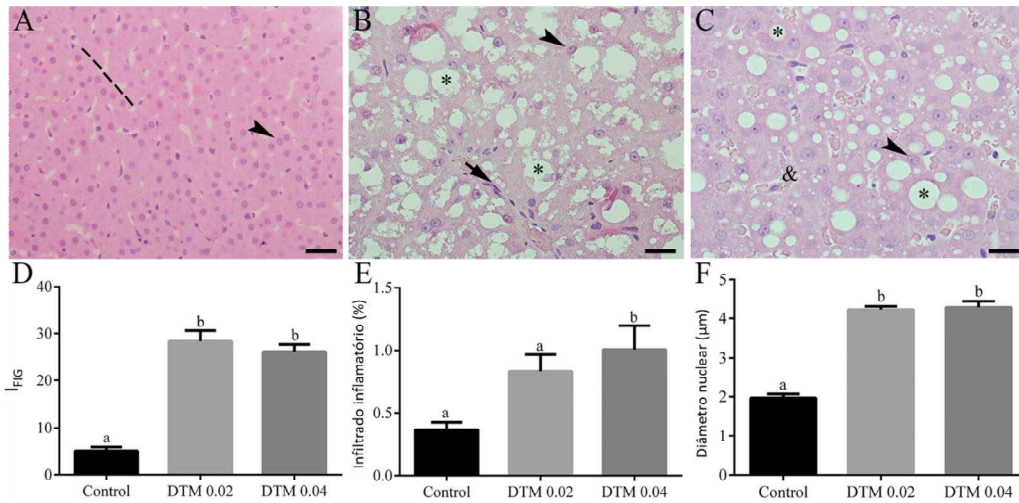


Figura 3- Efeito da DTM sobre o fígado de *A. lituratus*. Secções histológicas (A) controle; (B) DTM 0,02; (C) DTM 0,04. Coloração= Hematoxilina e Eosina; Escala da barra= 20µm. Linha pontilhada = organização dos hepatócitos, cabeça de seta= núcleo do hepatócito, setas pretas= infiltrado inflamatório, &= congestão e expansão dos vasos sanguíneos, asteriscos (\*) = esteatose. (D) Índice de saúde do fígado (I<sub>FIG</sub>); (E) Porcentagem de infiltrado inflamatório; (F) Diâmetro nuclear dos hepatócitos (µm).

Tabela 1 Frequências histopatológicas (FQ%) encontrados no intestino, fígado e rins de *A. lituratus* após exposição oral à DTM.

Variáveis	Tratamentos		
	Controle	DTM 0.02	DTM 0.04
<b>Intestino</b>			
Edema	0,00	0,00	0,00
Necrose	17,67	100,00	100,00
Vacuolização	100,00	100,00	100,00
Degeneração	0,00	100,00	100,00
Hiperplasia de células caliciformes	0,00	100,00	100,00
Infiltrado inflamatório	100,00	100,00	100,00
<i>Total FQ</i>	40,00±0,0 <sup>a</sup>	70,00± 4,47 <sup>b</sup>	84,00±5,10 <sup>b</sup>
<b>Fígado</b>			
Infiltrado inflamatório	0,00	33,33	80,00
Vacuolização hepatocelular	100,00	100,00	100,00
Hipertrofia de hepatócitos	0,00	100,00	100,00
Degeneração de cordões	0,00	100,00	100,00
Desordem dos cordões de hepatócitos	75,00	83,33	80,00
Congestão e expansão dos vasos sanguíneos	0,00	33,33	100,00
Esteatose	75,00	100,00	100,00
Necrose	0,00	83,00	80,00
<i>Total FQ</i>	44,40±0,00 <sup>a</sup>	77,80± 4,97 <sup>b</sup>	91,10±3,39 <sup>b</sup>
<b>Rim</b>			
Redução glomerular	33,33	80,00	75,00
Vacuolização citoplasmática	66,67	100,00	100,00
Degeneração tubular	66,67	100,00	100,00
Redução do túbulo	0,00	40,00	100,00
Infiltrado inflamatório	0,00	100,00	100,00
Nefrosclerose vascular benigna	66,67	80,00	100,00
Necrose tubular	0,00	80,00	100,00
Sangramento tubular	0,00	40,00	100,00
<i>Total FQ</i>	48,9±1,57 <sup>a</sup>	61,3±6,46 <sup>a</sup>	71,7±1,29 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Médias (Médias ± EPM) seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa do tratamento em relação ao controle.

Tabela 3 Histomorfometria do intestino, fígado e rim de *A. lituratus* controle e expostos à DTM durante sete dias.

Variáveis	Tratamentos		
	Controle	DTM 0.02	DTM 0.04
<b>Intestino</b>			
Altura do vilo ( $\mu\text{m}$ )	628,62 $\pm$ 32,01 <sup>a</sup>	620,00 $\pm$ 15,94 <sup>a</sup>	579,23 $\pm$ 47,39 <sup>a</sup>
Largura do vilo ( $\mu\text{m}$ )	159,62 $\pm$ 8,72 <sup>a</sup>	146,50 $\pm$ 3,90 <sup>a</sup>	134,70 $\pm$ 6,92 <sup>a</sup>
Espessura da muscular ( $\mu\text{m}$ )	121,39 $\pm$ 5,86 <sup>a</sup>	160,45 $\pm$ 23,72 <sup>a</sup>	150,96 $\pm$ 15,18 <sup>a</sup>
Células caliciformes secretora de mucinas mistas	4,75 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	6,55 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>	5,8 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>
Células caliciformes secretora de mucinas neutras	2,17 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	2,12 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>
<b>Fígado</b>			
Núcleo (%)	8,20 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>	7,27 $\pm$ 0,60 <sup>a</sup>	8,81 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>
Citoplasma (%)	73,10 $\pm$ 2,00 <sup>a</sup>	72,0 $\pm$ 2,82 <sup>a</sup>	70,9 $\pm$ 1,85 <sup>a</sup>
Capilares (%)	17,8 $\pm$ 1,58 <sup>a</sup>	18,5 $\pm$ 2,73 <sup>a</sup>	19,1 $\pm$ 2,02 <sup>a</sup>
<b>Rim</b>			
Diâmetro Glomerular ( $\mu\text{m}$ )	0,138 $\pm$ 0,0035 <sup>a</sup>	0,127 $\pm$ 0,0053 <sup>a</sup>	0,115 $\pm$ 0,006 <sup>b</sup>
Glicogênio do túbulo distal (%)	1,290 $\pm$ 0,190 <sup>a</sup>	1,030 $\pm$ 0,110 <sup>a</sup>	1,300 $\pm$ 0,280 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Médias (Médias  $\pm$  EPM) seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa do tratamento em relação ao controle.

### 3.4 Produção de óxido nítrico dos rins

Houve redução das concentrações de NO nos rins dos animais expostos à DTM 0.04 ( $P= 0,02$ ) comparado ao controle (Figura 4).

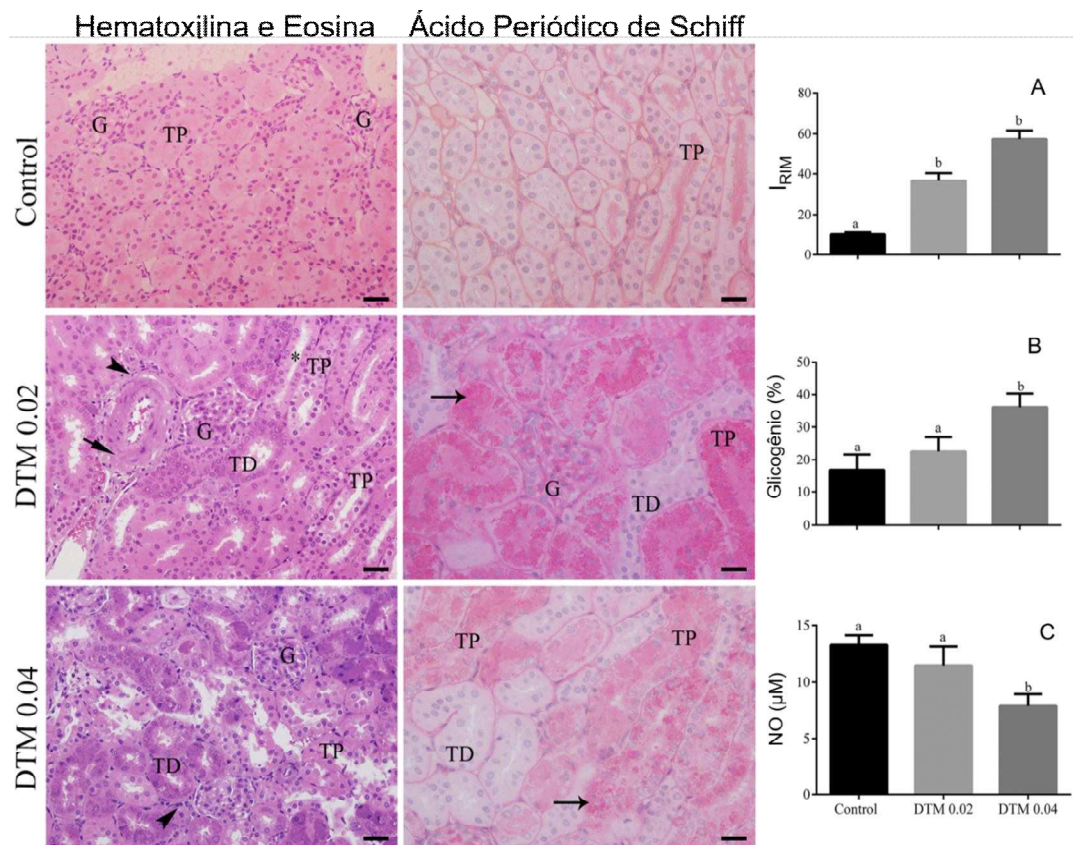


Figura 4 Efeito da DTM sobre os rins de *A. lituratus*. Secções histológicas Controle; DTM 0,02 mg /Kg mamão; DTM 0,04 mg /Kg mamão. Escala da barra= 20 µm. Cabeça de seta= infiltrado inflamatório, G= glomérulo, TD= túbulo distal, TP= túbulo proximal, setas pretas= glicogênio. (A) Índice de saúde do rim ( $I_{RIM}$ ); (B) porcentagem de glicogênio presente nos túbulos proximais, (C) Níveis de óxido nítrico (NO) renais.

### 3.5 Ensaios imunológicos

Os morcegos expostos às duas concentrações de DTM não apresentaram alterações na proliferação celular dos esplenócitos e na atividade bactericida do plasma (Figura 5).

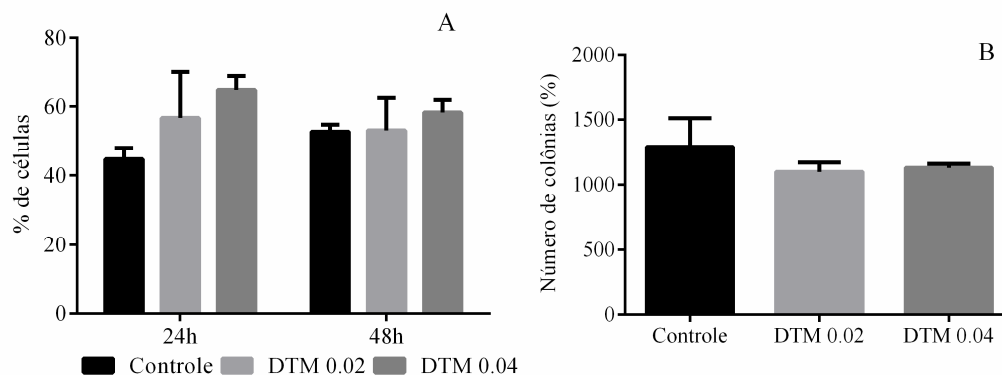


Figura 5 Efeito da deltametrina na atividade de proliferação celular do baço (A) e atividade bactericida (porcentagem do número total de colônias), (B) de *A. lituratus* controle e após exposição oral à DTM.

#### 4 DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos pela primeira vez o efeito do inseticida DTM sobre o sistema imune e alterações teciduais intestinais, hepáticas e renais em morcegos *A. lituratus*. Nossos resultados mostraram que baixas concentrações de DTM podem ser tóxicas para o intestino, fígado e rim de morcegos frugívoros, induzindo histopatologias pronunciadas. Esses resultados sugerem que frutas contaminadas com baixas concentrações de inseticidas podem promover alterações nos órgãos envolvidos no metabolismo desses animais.

Quando administrada via oral, a DTM é completamente dissolvida e rapidamente absorvida pelo sistema gastrointestinal, onde sofre sua primeira biotransformação [8], que pode causar injúrias intestinais. Nesse estudo, o intestino dos morcegos expostos à DTM 0.04 apresentou alterações histopatológicas pronunciadas. O tecido apresentou áreas com degeneração, vacuolização, infiltrado inflamatório, necrose e hiperplasia de células caliciformes. A hiperplasia das células caliciformes secretoras de mucinas ácidas foi a mais evidente. Histopatologias intestinais e hiperplasia de células caliciformes também foram descritas em peixes expostos agudamente ao piretroide lambda-cyhalothrin [9] e ao organoclorado ácido diclorofenoxiacético (2,4 D) [30]. A hiperplasia de células caliciformes é a primeira resposta do intestino para a presença de resíduos de inseticidas no lúmen. Essa alteração induz maior secreção de muco, que tem papel de facilitar a excreção do inseticida e auxiliar na manutenção da

integridade das células epiteliais intestinais [31]. O aumento de mucinas ácidas provavelmente foi uma resposta adaptativa, que permite eliminar os metabólitos do agente tóxico e proteger as camadas intestinais. A DTM também tem a capacidade de induzir apoptose utilizando diferentes vias de sinalização [32]. Assim, mesmo com o efeito protetor do muco das células caliciformes, a lâmina própria intestinal dos morcegos expostos a DTM mostrou maior evidência de células apoptóticas. Dessa forma, pode-se inferir que as concentrações DTM testadas causaram estresse tecidual no intestino dos morcegos, e induziu morte celular.

Os animais expostos à DTM apresentaram hipertrofia nuclear dos hepatócitos dos morcegos. O processo de biotransformação de xenobióticos exige maior atividade celular e conseqüentemente levam à hipertrofia das células. Os hepatócitos também apresentaram áreas com vacuolização, desordem na organização dos cordões dos hepatócitos, congestão e expansão dos vasos. Além disso, o fígado apresentou esteatose e aumento de infiltrado inflamatório. Alterações histopatológicas semelhantes foram descritas para ratos expostos à DTM [10], no morcego *A. lituratus* exposto aos inseticidas espinosina, fentiona e endossulfam [20,21,33] e em lagartos expostos por sete dias a baixas doses do piretroide beta-cipermetrina [34]. A vacuolização dos hepatócitos indica que a DTM causou desequilíbrio hídrico e iônico no tecido [35]. Além disso, a DTM causa distúrbios no metabolismo de carboidratos que pode levar a alterações na exportação de lipídios para o ambiente intracelular. Esse evento, induz o acúmulo excessivo de triglicérides no fígado e causa a esteatose. Adicionalmente, o inseticida utilizado nesse estudo induziu estresse oxidativo no fígado (*dados não mostrados-capítulo 1*), o que provavelmente gerou as histopatologias. Essas alterações comprometem as funções celulares e podem levar a necrose, reduzindo a saúde do órgão.

A metabolização da deltametrina no fígado leva a alterações histopatológicas e estresse oxidativo, mas resulta na formação de compostos mais polares, o que facilita sua excreção pela urina [8]. Entretanto, esses compostos ainda podem gerar alterações renais. Os rins dos morcegos expostos à DTM apresentaram maior presença de infiltrados inflamatórios e redução do diâmetro glomerular. Os animais expostos à maior concentração do inseticida mostraram nefrosclerose vascular benigna e redução do nível de NO. A redução do nível de NO pode ser o principal motivo para a nefrosclerose que conseqüentemente pode levar a isquemia e vasoconstrição. Essas

alterações podem causar a redução do lúmen dos vasos e aumentar o recrutamento de leucócitos [35], como constatado pelo acréscimo de infiltrados inflamatórios nos rins dos grupos expostos. Os infiltrados podem liberar citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) e ocasionar injúria inflamatória glomerular [35].

Os rins dos morcegos também apresentaram vacuolização, necrose e destacamento nas células dos túbulos proximais. Além disso, os túbulos proximais dos morcegos expostos a maior concentração de DTM mostraram aumento no acúmulo de glicogênio. O acúmulo de glicogênio indica o início de uma degeneração mucóide tubular. Esses resultados concordam com outros estudos que também encontraram evidências de nefrotoxicidade em ratos e camundongos expostos a deltametrina [36,37], permitindo concluir que baixas concentrações de DTM são capazes de induzir histopatologias severas nos rins dos morcegos frugívoros.

Os parâmetros imunológicos avaliados, nesse estudo, não alteraram entre os grupos, provavelmente devido ao tempo de exposição a DTM. Os efeitos imunitóxicos causados por pesticidas são mais dependentes do tempo de exposição do que da dose [38]. Assim, sugere-se que a DTM provavelmente não foi capaz de ativar o sistema imune dos morcegos após sete dias de exposição. Entretanto, pesticidas piretroides induzem estresse oxidativo, que pode levar a supressão da imunidade inata e adquirida [38]. Os morcegos desse estudo, apresentaram aumento na síntese de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo em diferentes tecidos (*dados não mostrados-capítulo 1*) e várias histopatologias. Dessa forma, sugere-se que um prolongado tempo de exposição à DTM pode gerar alterações nas respostas imunes inata, conforme já observado em morcegos por outros autores [19,39]. Alterações no sistema imune podem tornar os animais mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças e infecções por organismos patogênicos [40,41].

Os resultados encontrados nesse estudo apontam que a exposição oral aguda à DTM em baixas concentrações causa alterações teciduais pronunciadas no intestino, fígado e rins nos morcegos frugívoros *A. lituratus*. Nas doses todos tecidos apresentaram processos degenerativos e áreas com infiltração de células imunes, além de necrose e apoptose de células do parênquima tecidual. As histopatologias podem gerar distúrbios no funcionamento dos órgãos, deixando os animais mais susceptíveis a alterações ambientais e doenças.

## REFERENCIAS

1. Santos MAT Dos, Areas MA, Reyes FGR. 2007. Piretróides - uma visão geral. *Aliment. e Nutr. - Brazilian J. Food Nutr.* 18:339–349.
2. Capel PD, Larson SJ, Winterstein TA. 2001. The behaviour of 39 pesticides in surface waters as a function of scale. 1269:1251–1269.
3. Hamers T, Smit MGD, Murk AJ, Koeman JH. 2001. Biological and chemical analysis of the toxic potency of pesticides in rainwater. *Chemosphere.* 45:609–624.
4. Schiesari L, Waichman a., Brock T, Adams C, Grillitsch B. 2013. Pesticide use and biodiversity conservation in the Amazonian agricultural frontier. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368:20120378.
5. Zhu P, Fan S, Zou JH, Miao H, Li JG, Zhang GW, Wu YN. 2014. Application of gas chromatography-mass spectrometry in analyzing pharmacokinetics and distribution of deltamethrin in miniature pig tissues. *Biomed. Environ. Sci.* 27:426–35.
6. Jabeen F, Chaudhry AS, Manzoor S, Shaheen T. 2015. Examining pyrethroids , carbamates and neonicotenoids in fish , water and sediments from the Indus River for potential health risks. *Env. Monit Assess.* s:29.
7. Ernst W, Jackman P, Doe K, Page F, Julien G, MacKay K, Sutherland T. 2001. Dispersion and toxicity to non-target aquatic organisms of pesticides used to treat sea lice on almon in net pen enclosures. *Mar. Pollut. Bull.* 42:432–443.
8. Kim KB, Anand SS, Kim HJ, White CA, Bruckner J V. 2008. Toxicokinetics and tissue distribution of deltamethrin in adult Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.* 101:197–205.
9. Velmurugan B, Selvanayagam M, Cengiz EI, Unlu E. 2007. Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 24:286–291.
10. Issam C, Intissar G, Fatma B, Samir HMYH, Zohra H, Hassen B. 2012. Oxidative Stress, Biochemical and Histopathological Alterations in the Liver and Kidney of Female Rats Exposed to Low Doses of Deltamethrin (DM): A Molecular Assessment. *Biomed. Environ. Sci.* 25:672–683.
11. Bhushan B, Saxena PN, Saxena N. 2013. Biochemical and histological changes in rat liver caused by cypermethrin and beta-cyfluthrin. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 64:57–67.
12. Stahlschmidt P, Brühl CA. 2012. Bats at risk? Bat activity and insecticide residue analysis of food items in an apple orchard. *Environ. Toxicol. Chem.* 31:1556–1563.

13. Jones G, Jacobs DS, Kunz TH, Wilig MR, Racey PA. 2009. Carpe noctem: The importance of bats as bioindicators. *Endanger. Species Res.* 8:93–115.
14. Stechert C, Kolb M, Bahadir M, Djossa BA, Fahr J. 2014. Insecticide residues in bats along a land use-gradient dominated by cotton cultivation in northern Benin, West Africa. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21:8812–8821.
15. Brinati A, Maria J, Viviane O, Oliveira S, Soares M, Bruno B, Carvalho M, Silva L, Eliana M, Queiroz L, Luiz S, Matta P. 2016. Low , Chronic Exposure to Endosulfan Induces Bioaccumulation and Decreased Carcass Total Fatty Acids in Neotropical Fruit Bats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*:1–6. doi:10.1007/s00128-016-1910-8.
16. Valdespino C, Sosa VJ. 2017. Effect of landscape tree cover, sex and season on the bioaccumulation of persistent organochlorine pesticides in fruit bats of riparian corridors in eastern Mexico. *Chemosphere.* 175:373–382.
17. Naidoo S, Vosloo D, Schoeman MC. 2015. Pollutant exposure at wastewater treatment works affects the detoxification organs of an urban adapter, the Banana Bat. *Environ. Pollut.* 208:830–839.
18. Oliveira JM, Brinati A, Divina L, Miranda L, Morais DB. 2017. Exposure to the insecticide endosulfan induces liver morphology alterations and oxidative stress in fruit-eating bats Short running title: Endosulfan exposure in fruit bats.:1–9. doi:10.1111/iepo.12223.
19. Lilley TM, Ruokolainen L, Meierjohann A, Kanerva M, Stauffer J, Laine VN, Atosuo J, Lilius EM, Nikinmaa M. 2013. Resistance to oxidative damage but not immunosuppression by organic tin compounds in natural populations of Daubenton’s bats (*Myotis daubentonii*). *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 157:298–305.
20. Amaral TS, Carvalho TF, Silva MC, Barros MS, Picanço MC, Neves CA, Freitas MB. 2012. Short-term effects of a spinosyn’s family insecticide on energy metabolism and liver morphology in frugivorous bats *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). *Brazilian J. Biol.* 72:299–304.
21. Amaral TS, Carvalho TF, Silva MC, Goulart LS, Barros MS, Picanço MC, Neves C a., Freitas MB. 2012. Metabolic and Histopathological Alterations in the Fruit-Eating Bat *Artibeus lituratus* Induced by the Organophosphorous Pesticide Fenthion. *Acta Chiropterologica.* 14:225–232.
22. Allinson G, Mispagel C, Kajiwara N, Anan Y, Hashimoto J, Laurenson L, Allinson M, Tanabe S. 2006. Organochlorine and trace metal residues in adult southern bent-wing bat (*Miniopterus schreibersii bassanii*) in southeastern Australia. *Chemosphere.* 64:1464–1471.
23. Afonso E, Tournant P, Foltête JC, Giraudoux P, Baurand PE, Roué S, Canella V, Vey D, Scheifler R. 2016. Is the lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros*) exposed to causes that may have contributed to its decline? A non-invasive approach. *Glob. Ecol. Conserv.* 8:123–137.

24. Irene Tieleman B, Williams JB, Ricklefs RE, Klasing KC. 2005. Constitutive innate immunity is a component of the pace-of-life syndrome in tropical birds. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 272:1715–1720.
25. Giri BR, Roy B. 2016. Cysticercus fasciolaris infection induced oxidative stress and apoptosis in rat liver : a strategy for host-parasite cross talk Cysticercus fasciolaris infection induced oxidative stress and apoptosis in rat liver : a strategy for host-parasite cross talk. *Parasitol. Res.* 115:2617–2624.
26. Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T. 1999. Histopathology in fish : proposal for a protocol to assess aquatic pollution . *J Fish Dis.* *J. Fish Dis.* 22:25–34.
27. Corbett PA, King CK, Mondon JA. 2015. Application of a quantitative histological health index for Antarctic rock cod (*Trematomus bernacchii*) from Davis Station, East Antarctica. *Mar. Environ. Res.* 109:28–40.
28. Zimmerli S, Bernet D, Burkhardt-Holm P, Schmidt-Posthaus H, Vonlanthen P, Wahli T, Segner H. 2007. Assessment of fish health status in four Swiss rivers showing a decline of brown trout catches. *Aquat. Sci.* 69:11–25.
29. Van Dyk JS, Pletschke B. 2011. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere.* 82:291–307.
30. Deniz N, Ertug Y, Akbulut C, Abar M, Günes S. 2014. The Histopathological Effects of 2 , 4- Dichlorophenoxyacetic Acid on Intestine Tissue of Zebrafish ( *Danio rerio* ) The Histopathological Effects of 2 , 4- Dichlorophenoxyacetic Acid on Intestine Tissue of Zebrafish ( *Danio rerio* ). *Elixir Pollut.* 74:27021–27024.
31. Kim YS, Ho SB. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12:319–330.
32. Kumar A, Sasmal D, Sharma N. 2015. An insight into deltamethrin induced apoptotic calcium, p53 and oxidative stress signalling pathways. *Toxicol. Environ. Health Sci.* 7:25–34.
33. Oliveira JM, Brinati A, Divina L, Miranda L, Morais DB. 2017. Exposure to the insecticide endosulfan induces liver morphology alterations and oxidative stress in fruit-eating bats Short running title: Endosulfan exposure in fruit bats. *Int. J. Exp. Pathol.*:1–9. doi:10.1111/iep.12223.
34. Chen L, Xu P, Diao J, Di S, Li R, Zhou Z. 2016. Distribution, Metabolism and Toxic Effects of Beta-Cypermethrin in Lizards (*Eremias argus*) Following Oral Administration. *J. Hazard. Mater.* 306:87–94.
35. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. 2010. *Patologia: Bases Patológicas das Doenças*. In Elsevier Editora Ltda., ed. Rio de Janeiro.
36. Shona SI, Asaar HM El, Zaki SM, Sayed WM. 2010. Morphological and Morphometric Renal Changes in the Adult Albino Rat Following Oral

Administration of Deltamethrin and the Possible Protective Role of Vitamin “ E .” *J. Appl. Sci. Res.* 4:280–290.

37. Grewal KK, Sandhu GS, Kaur R, Brar RS, Sandhu HS. 2010. Toxic impacts of cypermethrin on behavior and histology of certain tissues of albino rats. *Toxicol. Int.* 17:94–98.
38. Banerjee BD. 1999. The influence of various factors on immune toxicity assessment of pesticide chemicals. *Toxicol. Lett.* 107:21–31.
39. Guardiola FA, González-Párraga P, Meseguer J, Cuesta A, Esteban MA. 2014. Modulatory effects of deltamethrin-exposure on the immune status, metabolism and oxidative stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 36:120–129.
40. Kannan K, Yun SH, Rudd RJ, Behr M. 2010. High concentrations of persistent organic pollutants including PCBs, DDT, PBDEs and PFOS in little brown bats with white-nose syndrome in New York, USA. *Chemosphere.* 80:613–618.
41. Afonso E, Tournant P, Foltête JC, Giraudoux P, Baurand PE, Roué S, Canella V, Vey D, Scheifler R. 2016. Is the lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros*) exposed to causes that may have contributed to its decline? A non-invasive approach. *Glob. Ecol. Conserv.* 8:123–137.

### **ARTIGO 3**

## **Estresse oxidativo e histopatologias em testículo de morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*) expostos à deltametrina**

Artigo formatado de acordo com as normas da Revista *Ecotoxicology*

## **Estresse oxidativo e histopatologias em testículo de morcego frugívoro (*Artibeus lituratus*) exposto à deltametrina**

### **Resumo**

Deltametrina (DTM) é um inseticida piretroide utilizado na agricultura e no controle de vetores de doenças. Esse inseticida pode alterar o balanço redox e induzir estresse oxidativo testicular, além de inibir a produção de testosterona e consequentemente o número de espermatozoides. Por isso, este estudo objetivou investigar os efeitos da DTM sobre os testículos do morcego frugívoro *Artibeus lituratus*. Os morcegos foram alimentados por sete dias com mamão contaminada duas concentrações de DTM (0,02 e 0,04 mg/ kg no mamão). Após exposição, foram mensurados nos testículos dos animais os níveis de óxido nítrico (NO), a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona S-transferase. Além disso, foram mensurados os níveis da peroxidação lipídica, das proteínas carboniladas e histopatologias testiculares. Os testículos dos animais apresentaram estresse oxidativo com o aumento dos níveis de óxido nítrico, e da atividade das enzimas SOD e catalase CAT nos dois grupos expostos em relação ao controle. O epitélio germinativo dos testículos dos morcegos apresentou células apoptóticas e descamação celular. Além disso, na região tubular foi observado edema, necrose, picnose nuclear, agrupamento celular, redução no diâmetro do túbulo e na altura do epitélio seminífero. As células de Leydig dos animais expostos à maior concentração de DTM mostraram redução do diâmetro nuclear indicando atrofia celular. O estresse oxidativo testicular induzido pela DTM provavelmente levou a formação das histopatologias no tecido. Essas alterações mostram o início de uma degeneração que pode afetar o funcionamento do órgão.

**Palavra- chaves:** Chiroptera, óxido nítrico, reprodução, piretroide.

## **Introdução**

Resíduos de pesticidas chegam até organismos não-alvos, como humanos e animais selvagens, através da lixiviação, escoamento superficial, evaporação, erosão e alimentação (Capel et al. 2001, Hamers et al. 2001). Os resíduos então contaminam o meio ambiente e muitas vezes bioacumula nos tecidos animais não- alvos, como os morcegos (Kannan et al. 2010; Stechert et al. 2014; Dennis and Gartrell 2015; Brinati et al. 2016; Valdespino and Sosa 2017). A exposição e o bioacúmulo de pesticidas podem promover danos celulares, como por exemplo, o estresse oxidativo, a desregulação endócrina e a falha reprodutiva (Berny 2007; Wang et al. 2009b; Ahmad et al. 2011; Kumar et al. 2015).

A deltametrina (DTM) é um inseticida piretroide tipo II utilizado na agricultura e no controle de vetores de doenças (Santos et al. 2007). Resíduos desse inseticida e de outros piretroides são comumente encontrados em águas superficiais, no solo e em peixes (Osti et al. 2007; Schiesari et al. 2013). Em condições controladas, animais expostos a baixas e altas doses da DTM apresentaram histopatologias, indução de apoptose no fígado e rim, e aumento das transaminases hepáticas no plasma (Ahmad et al. 2011; Issam et al. 2012; Bhushan et al. 2013). Além disso, a contaminação ambiental por pesticidas piretroides também tem sido associada a distúrbios na reprodução animal e humana (Ahmad et al. 2011).

O inseticida DTM também pode reduzir o tamanho dos testículos e das vesículas seminais (Ahmad et al. 2011) e, induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente através da produção excessiva de óxido nítrico (NO). O óxido nítrico tem papel na regulação de diversas funções fisiológicas, inclusive no sistema endócrino. Esse radical atua sobre a espermatogênese, na maturação dos espermatozoides e na conservação das células germinativas (El-Gohary et al. 1999; Lue et al. 2003; Aitken and Roman 2008). Então, o desequilíbrio nas concentrações de NO testiculares, propiciada por xenobióticos pode ocasionar apoptose, redução da qualidade e motilidade espermática e a desregulação da síntese de testosterona (El-Gohary et al. 1999; Lue et al. 2003). Por isso, os piretroides também são considerados

como disruptores endócrinos, assim os organoclorados (Ahmad et al. 2011; Jin et al. 2011; Ismail and Mohamed 2012).

O morcego frugívoro *Artibeus lituratus* é uma espécie de grande porte com reprodução contínua entre as estações (Notini et al. 2015). Essa espécie é abundante e encontra-se em ambientes preservados ou urbanos em toda a América latina. Entretanto, assim como outros animais silvestres, *A. lituratus* está em constante contato com pesticidas no momento do forrageio (Stechert et al. 2014; Dennis and Gartrell 2015; Brinati et al. 2016; Valdespino and Sosa 2017). Esses animais são considerados sensíveis à exposição aos pesticidas (Stahlschmidt and Brühl 2012), o que os torna susceptíveis ao estresse oxidativo testicular, e conseqüentemente desregula a síntese de testosterona. Apesar da importância da saúde testicular para a reprodução da espécie, ainda não foi reportado na literatura científica os efeitos de pesticidas sobre os testículos de morcegos frugívoros. Por isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da toxicidade da formulação comercial do inseticida DTM em testículo de morcego frugívoro *A. lituratus*.

## **Materiais e Métodos**

### **Reagentes químicos**

O inseticida piretroide deltametrina ( $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ ) produzido pela empresa Bayer CropScience Ltda (Rio Grande do Sul, Brasil) foi comprado em loja comercial. A DTM apresenta composição quimicamente como [(S)-\_-cyano-d-phenoxybenzyl-(1R,3R)-e-(2,2dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclo-propane-1-carboxylate]. Todos os outros reagentes químicos foram comprados da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, US), Merck (Darmstadt, Alemanha) e Leica (Alemanha).

### **Animais e design experimental**

Morcegos machos adultos ( $n = 17$ ) da espécie *A. lituratus*, foram capturados com redes de neblina na Mata do Paraíso da Universidade Federal de Viçosa (UFV) ( $20^{\circ} 45' S$  e  $42^{\circ} 52' W$ ) (Viçosa, MG, Brasil). Todos os animais foram identificados com chave para

identificação de morcegos brasileiros, pesados e mantidos em gaiolas de aço individuais (45 × 22 cm) em ciclos de temperatura e luz natural. As gaiolas foram colocadas em uma casa cercada por lona situada abaixo das árvores no quintal do museu da zoologia João Moojen, na UFV.

Após captura os animais foram mantidos 4 dias em cativeiro para adaptação, antes de iniciar o experimento. Nesse momento os animais receberam mamão (*Carica papaya*) e água *ad libitum*. Após a fase de adaptação os animais foram divididos em três grupos experimentais: 1- 0,0 (Controle n = 6); 2- 0,02 mg / Kg de mamão (DTM 0.02 n = 6); e 3- 0,04 mg / Kg de mamão (DTM 0.04 n=4). A exposição a DTM foi feita por um período de sete dias. Os mamões foram usados porque os morcegos-da-fruta aceitam facilmente esta dieta em cativeiro (Amaral et al 2012).

A DTM foi ingerida pelos animais após aspersão da mesma sobre a casca do mamão. O inseticida foi diluído com água. Subsequentemente, os frutos foram lavados e a solução foi pulverizada diariamente (2 ml), de forma homogênea em toda a casca da fruta. Os frutos tratados foram mantidos suspensos num recipiente modificado de modo que eles não entrassem em contato com qualquer superfície e perderiam a camada do pesticida. As concentrações utilizadas foram prescritas pelo fabricante para aplicação em culturas de frutos.

Após a pulverização da deltametrina nas frutas a concentração real do pesticida foi mensurada (casca e polpa) através do espectrômetro de massa triplo quadrupolo (Triple Quad LC / MS Agilent Technologies-6430). As análises apresentaram as concentrações descritas acima (*dados não mostrados- ver capítulo 1*).

Os frutos foram divididos em pedaços e oferecidos aos animais com o lado da casca para cima, de modo que durante a ingestão os morcegos estariam em contato direto com o inseticida. O fruto foi oferecido a cada noite em torno 18:00 horas, e água foi disponíveis *ad libitum*. O consumo alimentar foi monitorado diariamente colocando uma quantidade conhecida (150 g) da fruta em cada gaiola. As sobras foram coletadas e pesadas todas as manhãs às 08h00.

Após sete dias de exposição, os morcegos foram pesados e eutanasiados com deslocamento cervical seguido de decapitação. Subsequentemente, os testículos foram removidos e pesados.

### **Avaliação do estresse oxidativo**

#### *Preparo das amostras*

O testículo dos morcegos *A. lituratus* foi homogeneizado (OMNI) em tampão fosfato de potássio (pH 7.4) 0.2 M com 1M EDTA e a suspensão centrifugada (13,8 g por 10 minutos à 4°C). O sobrenadante resultante foi utilizado para as análises dos níveis de óxido nítrico (NO), da atividade das enzimas superóxido sismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e do produto da peroxidação lipídica o Malondialdeído (MDA). As análises foram feitas em espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu) ou leitor de microplacas (Multiskan GO User Manual, Thermo Scientific, Ratastie 2 e Finlândia).

#### *Níveis de óxido nítrico*

O nitrito usado como indicador da síntese de NO foi detectado pelo Reativo de Griess. Desta forma, o sobrenadante das amostras foi adicionado em microplacas com igual volume do Reativo de Griess (1 % de sulfanilamida e 0,1 % naftil-etileno-diamina em 2,5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), incubado e em seguida realizado a determinação das absorbâncias em leitor de microplacas ( $\lambda = 540\text{nm}$ ). O nível de óxido nítrico das amostras foi determinado através da curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio.

#### *Atividade das enzimas antioxidantes*

A atividade da SOD foi mensurada nos testículos em leitor de microplacas ( $\lambda = 570\text{nm}$ ) (Dieterich et al. 2000), baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup> e o peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto oxidação do pirogalol. A atividade da CAT foi mensurada segundo Aebi (1984) através da taxa de queda da absorbância em 60 segundos do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (10 mM)

em tampão fosfato de potássio 0.2 M (pH 7.0) e homogeneizado de tecido em espectrofotômetro ( $\lambda = 240\text{nm}$ ). Para os cálculos foi utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio  $\epsilon_{240} = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ . A atividade da enzima GST foi mensurada de acordo com Habig et al. (1974), através da formação do conjugado glutathiona-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) pelo aumento da absorvância ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ) durante 60 s. O coeficiente de extinção molar do CDBN  $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  foi utilizado para os cálculos.

#### *Determinação do malondialdeído*

O conteúdo de malondialdeído (MDA) foi estimado conforme descrito por Buege & Aust (1978). O sobrenadante do tecido foi homogeneizado em solução de ácido tricloroacético (15%) / ácido tiobarbitúrico (0,375%) / ácido clorídrico (0,25 M). A mistura reacional total foi mantida em banho-maria em ebulição durante 40 minutos. Após refrigeração sobre o gelo, adicionou-se álcool butílico, e agitou fortemente no vortex durante 2 minutos. O precipitado retirado por centrifugação (10 minutos a 9,0 g), e a fase superior foi utilizada para medir a absorvância a 535 nm em leitor de microplacas. Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMPO).

#### *Oxidação de proteínas*

Grupos carbonil nas proteínas foram mensuradas segundo Levine et al. (1994). Foram utilizados os pellets resultantes dos homogeneizados dos tecidos preparados para as enzimas. Os danos às proteínas foram determinados baseados nos grupos carbonil da reação com DNPH e mensurados em leitor de microplacas ( $\lambda = 370\text{nm}$ ). O total de proteínas carboniladas (CP) foi calculado baseado no coeficiente de extinção molar de  $\epsilon_{370} = 22,000 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### **Análises histopatológicas e histomorfométricas**

Os testículos foram fixados em solução fixadora Karnovsky e incluídos em glicol metacrilato (Historesin®, Leica, Alemanha). Foram realizados cortes semisseriados de 3 µm de espessura, com intervalo de 30 µm. Os cortes foram obtidos com o auxílio de micrótomo rotativo (Leica, Alemanha). As secções dos testículos foram coradas com azul de toluidina. Após a coloração, foram obtidas imagens digitais (10 imagens/animal) no fotomicroscópio (Olympus CX30) para as análises histopatológicas e histomorfométricas. Todas as análises histopatológicas e histomorfométricas foram realizadas utilizando o software de análise de imagem Image Pro-Plus® 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

Outras secções histológicas dos testículos foram coradas com o corante fluorescente acridine orange (0,02%) com iodeto de propídeo (1%) para avaliar a presença de células apoptóticas. As imagens digitais (5 imagens/animal) foram capturadas através de fotomicroscópio de fluorescência (EVOS Life Technologies, Carlsbad, Canadá). As células vivas marcam-se uniformemente em verde e podem ser distinguidas das células apoptóticas, pois essas exibem coloração amarelo/laranja, dependendo do grau de perda de integridade da membrana, devido à dupla coloração com o iodeto de propídeo (Giri e Roy 2016).

#### *Análises Histopatológicas*

As análises histopatológicas semiquantitativas foram realizadas através do *histological health index* (HHI) (Bernet et al. 1999). Esse método é baseado na severidade (*a*), fator de importância ( $\omega$ ) e padrão de reações (*rp*) das lesões nos tecidos. As alterações histopatológicas analisadas foram distribuídas em cinco padrões de reações e um fator de importância patológica entre 1 e 3 (Corbett et al. 2015). Esses números classificam as lesões de reversíveis a irreversíveis. Além disso, foi atribuído, para cada alteração, um valor de severidade variando de 0 a 6 que é baseado nas quantificações numéricas (porcentagens) das patologias por animal (Tab. 1).

Tabela 1 Fator de Importância e severidade patológica das lesões.

<b>Fator de importância da patologia (<math>\omega</math>)</b>	<b>Classificação</b>			
	Reversível	Moderada	Irreversível	
	1	2	3	
<b>Valor da severidade</b>				
<b>Severidade da lesão (<math>a</math>)</b>	Não observada	Alterações leves	Alteração moderada	Alteração grave
	0	1 ou 2	3 ou 4	5 ou 6

Com base nos valores quantitativos de severidade das lesões e nos valores de importância pré-determinados foi calculado o índice de saúde do órgão ( $I_{ORG}$ ). Esse índice determina o nível de alteração histológica do testículo ( $I_{TEST}$ ) de cada morcego, através da fórmula:  $I_{TEST} = \sum (a_{orgalt} \times \omega_{orgalt})$ , onde,  $a_{orgalt}$  é o valor de pontuação da severidade e  $\omega_{orgalt}$  é o fator de importância dentro de um único órgão de um morcego [3,4]. Por fim, foi calculada a média dos valores do  $I_{TEST}$  por grupo experimental, que em seguida foram enquadradas nas classificações previamente descritas por (Zimmerli et al. 2007) e (Van Dyk and Pletschke 2011). Essa classificação descreve que: valores inferiores a 10, as estruturas histológicas são normais com alterações leves; valores entre 10-20, as estruturas são normais com alterações histológicas moderadas; valores entre 21-30, o tecido apresenta alterações histológicas pronunciadas; e valores superiores a 30 representam alterações histológicas severas.

A frequência (FQ%) de cada histopatologia foi calculada através da divisão do número de vezes que a lesão foi encontrada por morcego pelo número total de animais analisado:  $FQ\% = (\eta \text{ injúria} / \eta \text{ total}) \times 100$  onde  $\eta$  injúria é o número de morcegos com lesão detectada e o  $\eta$  total é o número total de morcego analisado no grupo (Raskovic et al. 2014).

#### *Análises histomorfométricas*

As análises histomorfométricas dos testículos dos morcegos foram realizadas em 10 fotos por animal. A proporção de componentes dos testículos, incluindo parênquima tubular (epitélio germinativo, lúmen, e membrana basal), parênquima intertubular

(tecido conjuntivo, vasos) foram determinadas por meio de uma grade quadriculada de 266 pontos (2660 pontos por animal), com pontos numerados (interseções de linhas). O diâmetro de 30 núcleos aleatórios das células de Leydig também foram mensurados em cada animal.

O diâmetro médio do túbulo seminífero por animal foi estimado a partir da mensuração, ao acaso, de 10 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentaram contorno o mais circular possível. Essas medidas, foram expressas em  $\mu\text{m}$  e não levaram em consideração o estágio do ciclo do túbulo seminífero. Nas mesmas secções mensurou-se a altura do epitélio germinativo, que foi tomada da membrana basal até o lúmen tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo representa a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas expressas em  $\mu\text{m}$ .

### **Análise estatística**

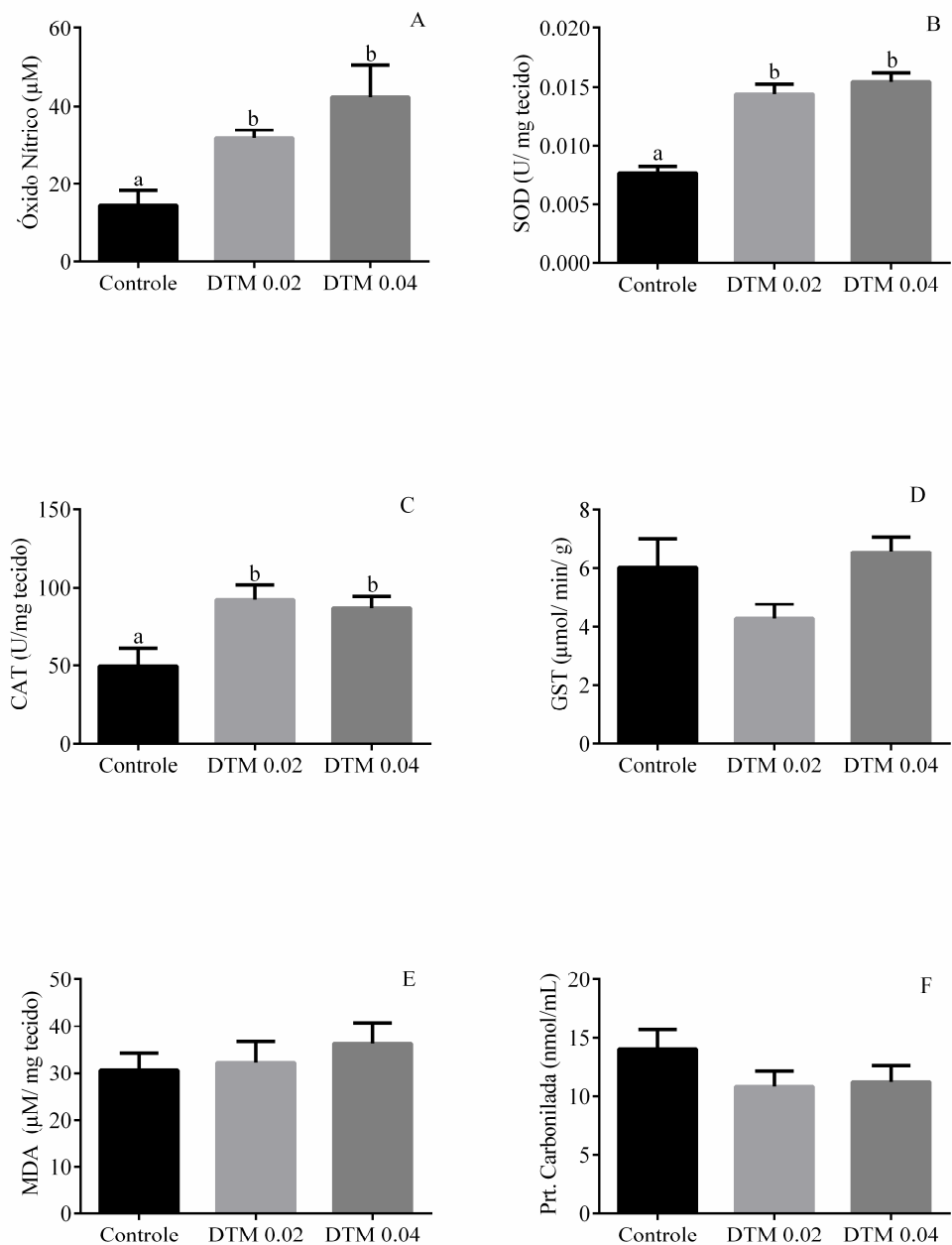
Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prism (versão 6.0, Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e estatisticamente avaliados pela análise de variância unidirecional (ANOVA). As diferenças entre médias dos grupos foram comparadas pelo teste de comparações múltiplas de *Bonferroni*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em  $P \leq 0,05$ . A análise de correlação de Pearson foi utilizada para examinar possíveis associações entre a enzima superóxido dismutase e o óxido nítrico.

## **Resultados**

### **Estresse oxidativo**

Os níveis de NO aumentaram nos testículos dos morcegos nos grupos DTM 0.02 ( $P=0,013$ ) e DTM 0.04 ( $P=0,0009$ ) em relação ao controle (Fig. 1-A). A atividade das enzimas SOD e CAT também aumentaram nos dois grupos DTM 0.02 ( $P \leq 0,0001$ ;  $P=0,019$ ) e DTM 0.04 ( $P \leq 0,0001$ ;  $P=0,03$ ) (Fig.1- B e C). Adicionalmente, houve uma correlação positiva ( $P < 0,0001$ ;  $r=0,93$ ) entre os níveis de NO e os níveis da atividade

de SOD. A atividade da enzima GST não diferiu entre os grupos (Fig. 1- D), bem como os níveis de MDA e proteínas carboniladas (Fig. 1- E e F).

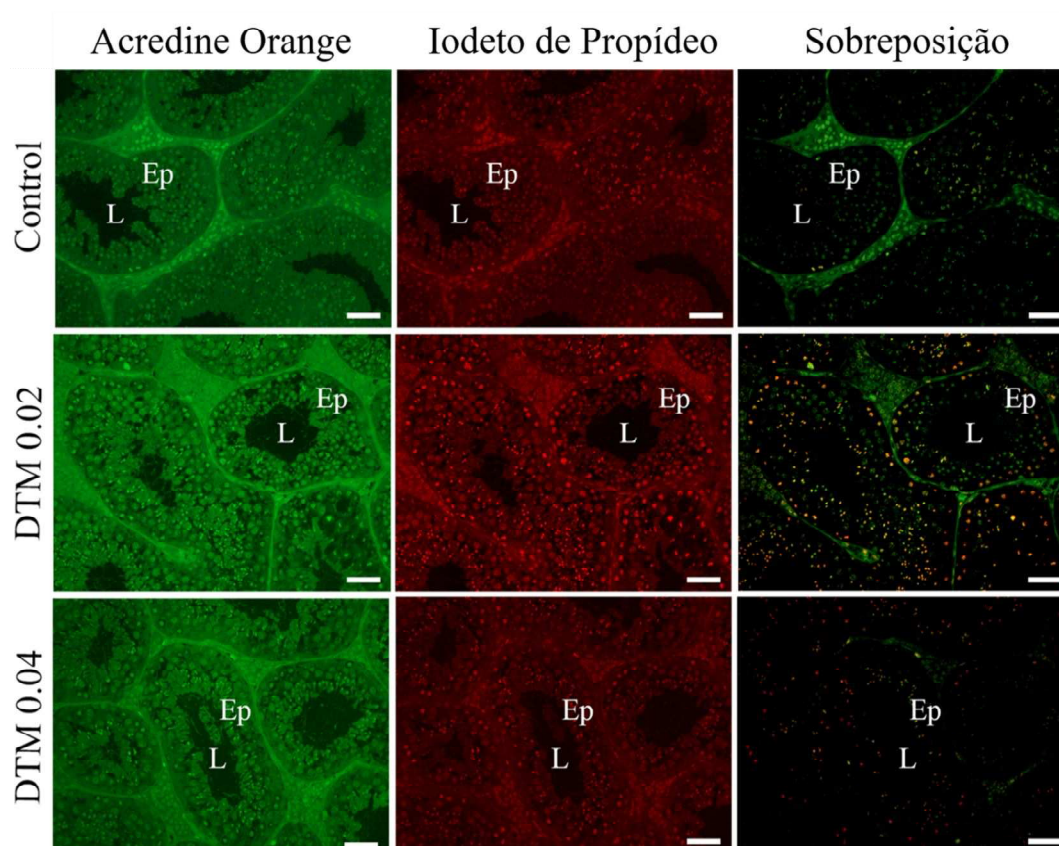


**Fig. 1-** Efeito da DTM sobre o estresse oxidativo testicular de *A. lituratus* após exposição oral. (A) óxido nítrico (NO), (B) atividade da superóxido dismutase (SOD), (C) atividade da catalase (CAT), (D) atividade da glutathiona S-transferase (GST), (E) malondialdeído (MDA), (F) proteínas carboniladas (Prt. carbonilada). <sup>a,b</sup>Letras

diferentes indicam diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) do tratamento em relação ao controle.

### Análises histológicas

Os morcegos expostos a DTM 0.02 e 0.04 mostraram maior evidência de células germinativas apoptóticas, comparada ao grupo controle. Resultado evidenciado pela presença de núcleos apoptóticos (vermelho e laranja/amarelo) nas fotomicrografias (Fig. 2).



**Fig. 2-** Secções histológicas dos testículos dos morcegos expostos à deltametrina. Coloração dupla, acredine orange com iodeto de propídeo para a detecção de apoptose. Control= grupo controle. Ep= epitélio germinativo. L= Lúmen. Escala da barra= 50 $\mu$ m. Células coradas em verde= células vivas. Células coradas em amarelo= início de apoptose. Células coradas em vermelho= células apoptóticas.

### *Histopatologia e Histomorfometria*

Os animais expostos a DTM 0.02 e 0.04 apresentaram alta frequência de patologias nos túbulos seminíferos como: edema, necrose, núcleo picnótico, degeneração, e deformação das células de Leydig (Tabela 2 e Fig. 3). Os túbulos seminíferos dos animais expostos à DTM 0.04 também mostraram maior desorganização das células germinativas. Essa desorganização foi evidenciada pela descamação celular nessa região (Fig. 3).

A DTM causou diversas histopatologias aumento o índice de órgão ( $I_{TEST}$ ) dos morcegos dos grupos DTM 0.02 ( $P= 0,0006$ ) e DTM 0.04 ( $P<0.0001$ ) em comparação com o controle (Tabela 2). O  $I_{TEST}$  do grupo controle foi inferior a 10, o que representa estruturas histológicas normais. Em contrapartida, os testículos dos animais expostos a DTM 0.02 apresentaram  $I_{TEST}$  acima de 20, que se refere a alterações histopatológicas pronunciadas. Já o grupo exposto a DTM 0.04 apresentou  $I_{TEST}$  acima de 30, considerado com alterações histopatológicas severas (Tabela 2).

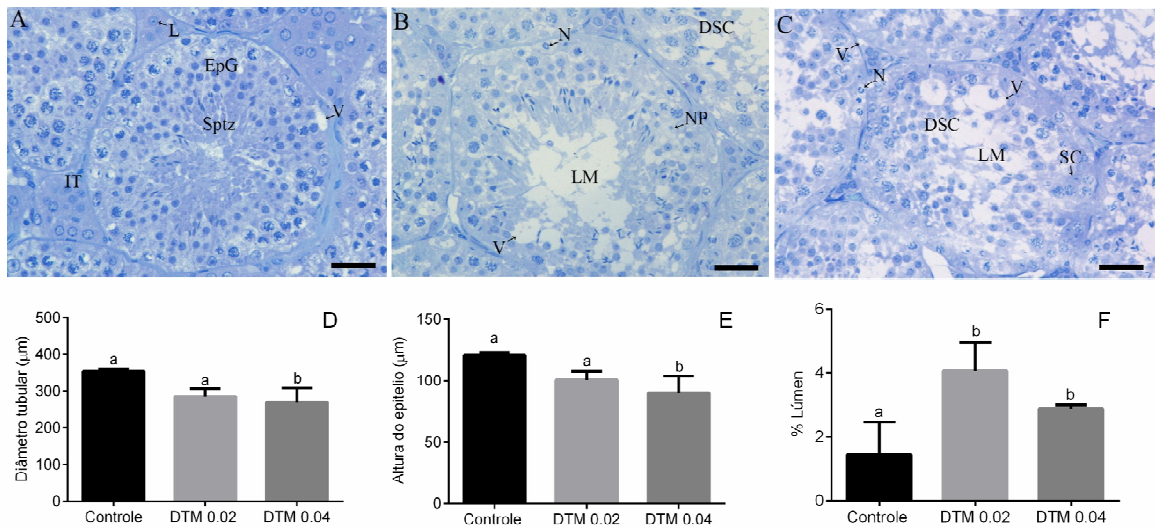
Os animais expostos a DTM 0.04 ( $P= 0,04$ ) apresentaram menor diâmetro dos túbulos e menor altura do epitélio germinativo ( $P= 0,04$ ) (Tabela 3), em relação ao grupo controle. Além disso, as proporções do lúmen aumentaram nos grupos DTM 0.02 ( $P= 0,001$ ) e DTM 0.04 ( $P= 0,02$ ) quando comparados ao controle (Tabela 3). A porcentagem do compartimento tubular, do epitélio germinativo e da membrana basal foi semelhante entre os grupos (Tabela 3).

No intertúbulo não houve alterações na porcentagem de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e células de Leydig entre os grupos (Tabela 3). Porém, as células de Leydig mostram redução no diâmetro nuclear dos animais expostos a DTM 0.04 ( $P= 0,01$ ) quando comparado ao controle (Tabela 3).

Tabela 2 Porcentagem da frequência (FQ%) das histopatologias encontradas nos testículos dos morcegos frugívoros *A. lituratus* após exposição oral à DTM.

Histopatologias	Tratamentos		
	Controle	DTM 0.02	DTM 0.04
Edema	0,00	100,00	100,00
Necrose	14,29	100,00	100,00
Núcleo Picnótico	14,29	100,00	100,00
Agrupamento Celular	0,00	0,00	60,00
Vacuolização	100,00	100,00	100,00
Degeneração	71,43	100,00	100,00
Desorganização do túbulo	57,14	100,00	100,00
Deformação das células de Leydig	0,00	66,67	100,00
<i>Total FQ%</i>	20,88 ± 3,64 <sup>a</sup>	51,28 ± 1,62 <sup>b</sup>	60,00 ± 1,54 <sup>b</sup>
<i>I<sub>TEST</sub></i>	4,17 ± 0,30 <sup>a</sup>	28,3 ± 4,16 <sup>b</sup>	45,80 ± 5,32 <sup>b</sup>

Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa do tratamento em relação ao controle.



**Fig. 3** Alterações histopatológicas em testículos de *A. lituratus* exposto à DTM. (A) Controle; (B) DTM 0,02 mg/kg mamão; (C) DTM 0,03 mg/Kg mamão. N= necrose, DSC= descamação das células do túbulo seminífero, NP= núcleo picnótico, V= vacuolização, SPTZ= espermatozoides, L= Células de Leydig, EpG= epitélio germinativo, SC= Células de Sertoli, LM= lúmen. Escala da barra= 20µm. Coloração, azul de toluidina. Diâmetro do Túbulo seminífero (D), Altura do epitélio seminífero (E), Porcentagem de Lúmen (F).

Tabela 3 Efeito da DTM sobre a histomorfometria dos testículos e peso corporal dos morcegos frugívoros *A. lituratus* após exposição oral.

Variáveis	Tratamentos		
	Controle	DTM 0.02	DTM 0.04
Massa corporal pré-exposição (g)	69,43 ± 2.23 <sup>a</sup>	73,63 ± 3.90 <sup>a</sup>	72,28 ± 2.57 <sup>a</sup>
Massa corporal pós-exposição (g)	68,93 ± 1,30 <sup>a</sup>	68,91 ± 2,18 <sup>a</sup>	64,6 ± 3,27 <sup>a</sup>
Compartimento tubular (%)	67,70 ± 1,13 <sup>a</sup>	67,90 ± 2,14 <sup>a</sup>	68,60 ± 1,38 <sup>a</sup>
Compartimento intertubular (%)	12,2 ± 1,28 <sup>a</sup>	10,4 ± 0,97 <sup>a</sup>	10,10 ± 2,47 <sup>a</sup>
Membrana basal (%)	5,33 ± 0,35 <sup>a</sup>	5,61 ± 0,38 <sup>a</sup>	5,78 ± 0,34 <sup>a</sup>
Tecido conectivo (%)	9,00 ± 0,91 <sup>a</sup>	7,63 ± 1,10 <sup>a</sup>	8,27 ± 1,83 <sup>a</sup>
Vasos sanguíneos (%)	1,78 ± 0,33 <sup>a</sup>	1,78 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,70 ± 0,30 <sup>a</sup>
Células de Leydig (%)	1,78 ± 0,28 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,30 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,34 <sup>a</sup>
Diâmetro nuclear das células de Leydig (µm)	12,40 ± 0,45 <sup>a</sup>	12,00 ± 0,27 <sup>a</sup>	10,50 ± 0,45 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) do tratamento em relação ao controle.

Tabela 3 Efeito da DTM sobre a histomorfometria dos testículos e peso corporal dos morcegos frugívoros *A. lituratus* após exposição oral.

Variáveis	Tratamentos		
	Controle	DTM 0.02	DTM 0.04
Massa Corporal pré-exposição (g)	69,43 ± 2.23 <sup>a</sup>	73,63 ± 3.90 <sup>a</sup>	72,28 ± 2.57 <sup>a</sup>
Massa Corporal pós-exposição (g)	68,93 ± 1,30 <sup>a</sup>	68,91 ± 2,18 <sup>a</sup>	64,6 ± 3,27 <sup>a</sup>
Compartimento tubular (%)	67,70 ± 1,13 <sup>a</sup>	67,90 ± 2,14 <sup>a</sup>	68,60 ± 1,38 <sup>a</sup>
Compartimento intertubular (%)	12,2 ± 1,28 <sup>a</sup>	10,4 ± 0,97 <sup>a</sup>	10,10 ± 2,47 <sup>a</sup>
Parênquima tubular			
Lúmen (%)	0,45 ± 0,28 <sup>a</sup>	4,05 ± 0,90 <sup>b</sup>	2,87 ± 0,13 <sup>b</sup>
Membrana basal (%)	5,33 ± 0,35 <sup>a</sup>	5,61 ± 0,38 <sup>a</sup>	5,78 ± 0,34 <sup>a</sup>
Diâmetro do túbulo (µm)	354,00 ± 7,53 <sup>a</sup>	285,00 ± 21,50 <sup>a</sup>	270,00 ± 38,70 <sup>b</sup>
Altura do epitélio seminífero (µm)	121,00 ± 2,35 <sup>a</sup>	101,00 ± 6,93 <sup>a</sup>	90,10 ± 13,70 <sup>b</sup>
Parênquima intertubular			
Tecido conectivo (%)	9,00 ± 0,91 <sup>a</sup>	7,63 ± 1,10 <sup>a</sup>	8,27 ± 1,83 <sup>a</sup>
Vasos sanguíneos (%)	1,78 ± 0,33 <sup>a</sup>	1,78 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,70 ± 0,30 <sup>a</sup>
Células de Leydig (%)	1,78 ± 0,28 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,30 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,34 <sup>a</sup>
Diâmetro nuclear das células de Leydig (µm)	12,40 ± 0,45 <sup>a</sup>	12,00 ± 0,27 <sup>a</sup>	10,50 ± 0,45 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) do tratamento em relação ao controle.

## Discussão

Os testículos são órgãos com baixa vascularização e por isso baixa tensão de oxigênio, o que torna a disputa intensa por esse elemento entre as células. Essa característica faz com que o órgão seja vulnerável ao estresse oxidativo induzido por xenobióticos, com consequentes desordens hormonais e perda da qualidade e quantidade de espermatozoides (Aitken and Roman 2008). No presente, estudo morcegos machos da espécie *A. lituratus* que se alimentaram com frutas contaminadas com DTM apresentaram estresse oxidativo e histopatologias pronunciadas nos testículos. Esses resultados mostram que a toxicidade de inseticidas pode afetar a saúde do órgão reprodutor de morcegos.

Nesse estudo, os níveis de NO aumentaram nos testículos dos morcegos, assim como a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT. Entretanto, não houve alteração na atividade da enzima GST, na peroxidação lipídica e nas proteínas carboniladas nos grupos tratados com DTM. Resultados semelhantes foram descritos em testículos de ratos e cultivo de células testiculares expostas a DTM (El-Gohary et al. 1999; Abdallah et al. 2010; Ben Halima et al. 2014). O aumento nos níveis de NO pode induzir a formação do radical peroxinitrito ( $\text{ONNO}^\cdot$ ) como resultado de sua ligação com o radical superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ), e induzir maiores injúrias. Além disso, NO é um regulador da esteroidogênese testicular, regula a secreção de testosterona, atuando na espermatogênese, na maturação e degeneração das células germinativas. Assim o desequilíbrio em suas concentrações afeta as células testiculares promovendo alterações na fertilidade de machos (El-Gohary et al. 1999; Lue et al. 2003; Aitken and Roman 2008). O aumento da atividade da SOD foi um reflexo ao aumento dos níveis de NO. A SOD aumentada controla a formação de peroxinitrito e evita a formação de outras ROS e consequentemente maiores danos celulares. Em adição, a atividade da enzima CAT é catalisar a reação da transformação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio diminuindo a ação oxidante da molécula e regulando a homeostase redox (Droge 2002). Normalmente a atividade testicular da CAT é baixa (Bauché et al. 1994; Aitken and Roman 2008), porém a maior atividade dessa enzima encontrada nesse estudo pode indicar uma resposta adaptativa do órgão para evitar danos celulares causados pelo aumento da síntese de  $\text{H}_2\text{O}_2$  causada por xenobióticos.

As concentrações da formulação comercial de DTM na qual os morcegos foram expostos induziu estresse oxidativo testicular. Porém, o aumento da atividade das enzimas SOD e CAT possivelmente evitou a oxidação de lipídios e proteínas. O que pode explicar a falta de alteração na atividade da enzima GST nos animais expostos. Isso porque a GST está envolvida nas reações de fase II da atividade antioxidante, reduzindo a produção da peroxidação lipídica através da redução de hidroperóxidos (Hayes et al. 2004). Além disso, morcegos possuem alta capacidade antioxidante e mecanismos moleculares que compensam o excesso de síntese ROS que ocorrem normalmente em seus processos metabólicos. Dessa forma, esses animais apresentam maior auxílio na proteção contra oxidação de macromoléculas (Arenas-Ríos et al. 2007;

Wilhelm Filho et al. 2007; Salmon et al. 2009). No entanto, apesar de possuir em alta capacidade antioxidante, a exposição prolongada dos morcegos a baixas concentrações de DTM, ou outro inseticida, pode aumentar a síntese de ROS nos testículos dos morcegos. Em decorrência disso, a atividade das enzimas antioxidantes pode diminuir e conseqüentemente aumentar a ocorrência da oxidação de lipídios e proteínas. Assim como foi relatado para outros mamíferos em exposição prolongada a pesticidas piretroides (Wang et al. 2009b; Ben Slima et al. 2013; Kanbur et al. 2016).

Os resultados das análises histológicas dos testículos dos morcegos confirmam os achados bioquímicos. As células dos túbulos seminíferos dos morcegos expostos à DTM apresentaram maior evidência de apoptose, bem como em camundongos expostos aos piretroides lambda-cialothrin e a DTM (Issam et al. 2009; Oshoke 2016). A apoptose nesse tecido ocorre principalmente pela produção excessiva de ROS causada pelo piretroide. O principal radical envolvido na geração do estresse oxidativo testicular é o NO (El-Gohary et al. 1999; Ismail and Mohamed 2012; Kumar et al. 2015). O aumento desse radical induz a morte celular devido à desmineralização de purinas e pirimidinas, aumentando a quebra de fitas ou inibindo as enzimas envolvidas na reparação do DNA (El-Gohary et al. 1999). Adicionalmente, os túbulos seminíferos dos morcegos apresentaram picnose nuclear e ocorrência de necrose. A picnose nuclear é caracterizada por arredondamento e condensação do núcleo celular e pode originar alterações genéticas que possivelmente implicam na redução do número de espermatozoides. A necrose também contribui para a perda de células, porém nos testículos a apoptose é a principal via de morte celular causada por xenobióticos (El-Gohary et al. 1999). As patologias supracitadas também foram identificadas em animais experimentais (ratos, camundongos e peixes) expostos por longo período a piretroides (Issam et al. 2009; Kumar and Nagar 2014; Pullanna and Philip 2014; Oshoke 2016). O efeito das baixas concentrações de DTM nos testículos dos morcegos, aumentou os níveis de NO, o que provavelmente causou apoptose e necrose nas células germinativas testiculares.

Nos túbulos seminíferos dos morcegos também foi identificado edema, agrupamento celular e vacuolização. A vacuolização pode indicar um desequilíbrio iônico e hídrico, e resulta em degeneração tecidual. Em decorrência da degeneração, os túbulos

seminíferos dos animais expostos à DTM mostraram descamação das células germinativas. A descamação provavelmente induziu a redução da espessura dos túbulos e a altura do epitélio, que conseqüentemente refletiu no aumento do lúmen dos túbulos seminíferos. A altura e diâmetro dos túbulos estão diretamente relacionados com a fertilidade, assim a redução desses parâmetros pode comprometer a maturação das células germinativas durante o processo da espermatogênese, e conseqüentemente reduzir a fertilidade (Russell et al 1993). Diante desses resultados, infere-se que a exposição de morcegos a baixas concentrações de DTM pode comprometer a integridade das células germinativas testiculares.

Adicionalmente, as células de Leydig dos morcegos expostos à maior dose apresentou redução do diâmetro nuclear. Resultados semelhantes foram descritos para ratos e camundongos expostos aos piretroides  $\beta$ -cipermetrina, cipermetrina e deltametrina (Wang et al. 2009a; Jin et al. 2011; Ismail and Mohamed 2012). Nas células de Leydig, o estresse oxidativo desregula a síntese de testosterona através de deformações na membrana do retículo endoplasmático liso e inchaço mitocondrial com conseqüente redução na transcrição de genes envolvidos na síntese e transporte de colesterol (Lue et al. 2003; Wang et al. 2009a; Jin et al. 2011; Ismail and Mohamed 2012). Assim, diante das outras alterações histológicas encontradas e da redução do diâmetro nuclear das células de Leydig, sugere-se que provavelmente houve uma redução da atividade dessas células. Além disso, os piretroides diminuem a expressão de receptores androgênicos nas células de Sertoli. A redução da expressão desses receptores leva a menor celularidade e redução da altura do epitélio germinativo, como observado nos morcegos desse estudo. O desequilíbrio hormonal também pode reduzir a motilidade espermática, diminuir o número de espermatozoides viáveis e estimular a perda da qualidade de fertilização espermática (Zhang et al. 2007; Ahmad et al. 2011; Orlu 2014; Oshoke 2016). Diante das alterações histológicas encontradas, sugere-se que a exposição à DTM provavelmente compromete a síntese de hormônios em morcegos frugívoros. Essas alterações afetam a capacidade reprodutiva desses animais, demonstrando que morcegos frugívoros podem ser vulneráveis à exposição a piretroide.

## **Conclusão**

Os resultados encontrados, demonstram que a exposição oral aguda do morcego *A. lituratus* a baixas concentrações da DTM provoca estresse oxidativo testicular, apoptose, descamação das células nos túbulos seminíferos e atrofia das células de Leydig. Além disso, os animais que alimentaram de frutas com DTM 0,04 mg/kg mostraram maior ocorrência de alterações testiculares. Isso demonstra que, maiores concentrações podem ser mais tóxicas para os animais.

## **Aprovação de ética**

Este artigo não contém estudos com participantes humanos realizados por nenhum dos autores. Todos os procedimentos realizados no presente estudo respeitaram os padrões éticos do Comitê de Ética animal da Universidade Federal de Viçosa (Processo nº 45/2014) e do Governo Brasileiro (SISBIO, Processo nº 30904-3), bem como os critérios internacionais para o cuidado e uso de animais.

## **Referências**

- Abdallah F Ben, Hamden K, Galeraud-Denis I, et al (2010) An in vitro study on reproductive toxicology of Deltamethrin on rat spermatozoa. *Andrologia* 42:254–259. doi: 10.1111/j.1439-0272.2009.00986.x
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126.
- Ahmad L, Khan A, Khan MZ (2011) Pyrethroid-Induced Reproductive Toxicopathology in Non-Target Species. *Pak Vet J* 32:1–9.
- Aitken RJ, Roman SD (2008) Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Adv Exp Med Biol* 636:154–171. doi: 10.4161/oxim.1.1.6843
- Amaral TS, Carvalho TF, Silva MC, et al (2012) Short-term effects of a spinosyn's family insecticide on energy metabolism and liver morphology in frugivorous bats *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). *Brazilian J Biol* 72:299–304. doi: 10.1590/S1519-69842012000200010
- Arenas-Ríos E, León-Galván MA, Mercado PE, et al (2007) Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in the testis of the Mexican big-eared bat

- (*Corynorhinus mexicanus*) during its annual reproductive cycle. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 148:150–158. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.04.003
- Bauché F, Fouchard MH, Jégou B (1994) Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett* 349:392–396. doi: 10.1016/0014-5793(94)00709-8
- Ben Halima N, Ben Slima A, Moalla I, et al (2014) Protective effects of oat oil on deltamethrin-induced reprotoxicity in male mice. *Food Funct* 5:2070. doi: 10.1039/C4FO00190G
- Ben Slima A, Ali M Ben, Barkallah M, et al (2013) Antioxidant properties of *Pelargonium graveolens* L'Her essential oil on the reproductive damage induced by deltamethrin in mice as compared to alpha-tocopherol. *Lipids Health Dis* 12:30. doi: 10.1186/1476-511X-12-30
- Bernet D, Schmidt H, Meier W, et al (1999) Histopathology in fish : proposal for a protocol to assess aquatic pollution . *J Fish Dis*. *J Fish Dis* 22:25–34. doi: 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x
- Berny P (2007) Pesticides and the intoxication of wild animals. *J Vet Pharmacol Ther* 30:93–100. doi: 10.1111/j.1365-2885.2007.00836.x
- Bhushan B, Saxena PN, Saxena N (2013) Biochemical and histological changes in rat liver caused by cypermethrin and beta-cyfluthrin. *Arh Hig Rada Toksikol* 64:57–67. doi: 10.2478/10004-1254-64-2013-2184
- Brinati A, Maria J, Viviane O, et al (2016) Low , Chronic Exposure to Endosulfan Induces Bioaccumulation and Decreased Carcass Total Fatty Acids in Neotropical Fruit Bats. *Bull Environ Contam Toxicol* 1–6. doi: 10.1007/s00128-016-1910-8
- Capel PD, Larson SJ, Winterstein TA (2001) The behaviour of 39 pesticides in surface waters as a function of scale. 1269:1251–1269. doi: 10.1002/hyp.212
- Corbett PA, King CK, Mondon JA (2015) Application of a quantitative histological health index for Antarctic rock cod (*Trematomus bernacchii*) from Davis Station, East Antarctica. *Mar Environ Res* 109:28–40. doi: 10.1016/j.marenvres.2015.05.011
- Dennis GC, Gartrell BD (2015) Nontarget Mortality of New Zealand Lesser Short-tailed bats (*Mystacina tuberculata*) Casused by Diphacionone. *J Wildl Dis* 51:177–186. doi: 10.7589/2013-07-160
- Dieterich S, Bieligk U, Beulich K, et al (2000) Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart : Increased Expression of Catalase in the End-Stage

- Failing Heart. *Circulation* 101:33–39. doi: 10.1161/01.CIR.101.1.33
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47–95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001
- El-Gohary M, Awara WM, Nassar S, Hawas S (1999) Deltamethrin-induced testicular apoptosis in rats: the protective effect of nitric oxide synthase inhibitor. *Toxicology* 132:1–8. doi: S0300-483X(98)00114-0 [pii]
- Ernst W, Jackman P, Doe K, et al (2001) Dispersion and toxicity to non-target aquatic organisms of pesticides used to treat sea lice on salmon in net pen enclosures. *Mar Pollut Bull* 42:432–443. doi: 10.1016/S0025-326X(00)00177-6
- Giri BR, Roy B (2016) *Cysticercus fasciolaris* infection induced oxidative stress and apoptosis in rat liver : a strategy for host-parasite cross talk *Cysticercus fasciolaris* infection induced oxidative stress and apoptosis in rat liver : a strategy for host-parasite cross talk. *Parasitol Res* 115:2617–2624. doi: 10.1007/s00436-016-5008-3
- Habig WH, Pabst MJ, William B. Jakoby (1974) Glutathione S- Transferases. *J Biol Chem* 25:7130–7139.
- Hamers T, Smit MGD, Murk AJ, Koeman JH (2001) Biological and chemical analysis of the toxic potency of pesticides in rainwater. *Chemosphere* 45:609–624. doi: 10.1016/S0045-6535(01)00017-0
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2004) Glutathione Transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51–88. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857
- Ismail MF, Mohamed HM (2012) Deltamethrin-induced genotoxicity and testicular injury in rats: Comparison with biopesticide. *Food Chem Toxicol* 50:3421–3425. doi: 10.1016/j.fct.2012.07.060
- Issam C, Intissar G, Fatma B, et al (2012) Oxidative Stress, Biochemical and Histopathological Alterations in the Liver and Kidney of Female Rats Exposed to Low Doses of Deltamethrin (DM): A Molecular Assessment. *Biomed Environ Sci* 25:672–683. doi: 10.3967/0895-3988.2012.06.009
- Issam C, Samir H, Zohra H, et al (2009) Toxic responses to deltamethrin (DM) low doses on gonads, sex hormones and lipoperoxidation in male rats following subcutaneous treatments. *J Toxicol Sci* 34:663–670. doi: 10.2131/jts.34.663
- Jin Y, Wang L, Ruan M, et al (2011) Cypermethrin exposure during puberty induces oxidative stress and endocrine disruption in male mice. *Chemosphere* 84:124–130. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.02.034

- Kanbur M, Siliğ Y, Eraslan G, et al (2016) The toxic effect of cypermethrin, amitraz and combinations of cypermethrin-amitraz in rats. *Environ Sci Pollut Res* 23:5232–5242. doi: 10.1007/s11356-015-5720-z
- Kannan K, Yun SH, Rudd RJ, Behr M (2010) High concentrations of persistent organic pollutants including PCBs, DDT, PBDEs and PFOS in little brown bats with white-nose syndrome in New York, USA. *Chemosphere* 80:613–618. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.04.060
- Kumar A, Nagar M (2014) Histomorphometric study of testis in deltamethrin treated albino rats. *Toxicol Reports* 1:401–410. doi: 10.1016/j.toxrep.2014.07.005
- Kumar A, Sasmal D, Sharma N (2015) An insight into deltamethrin induced apoptotic calcium, p53 and oxidative stress signalling pathways. *Toxicol Environ Health Sci* 7:25–34. doi: 10.1007/s13530-015-0217-1
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Schacter E (1994) Carbonyl Assays for Determination of Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzymol* 233:346–257.
- Lue Y, Sinha Hikim AP, Wang C, et al (2003) Functional role of inducible nitric oxide synthase in the induction of male germ cell apoptosis, regulation of sperm number, and determination of testes size: Evidence from null mutant mice. *Endocrinology* 144:3092–3100. doi: 10.1210/en.2002-0142
- Notini AA, Farias TO, Talamoni SA, Godinho HP (2015) Annual male reproductive activity and stages of the seminiferous epithelium cycle of the large fruit-eating *Artibeus lituratus* ( Chiroptera : Phyllostomidae ). *Zool* 32:195–200. doi: 10.1590/S1984-46702015000300003
- Orlu EE (2014) Deltamethrin-induced Alterations in Sperm Morphology and Spermatogenesis Impairment in Adult Sprague-Dawley Rats. *7:2324–2331*.
- Oshoke FI (2016) Sub-chronic toxicity study of synthetic Pyrethroids ( Lambda-cyhalothrin ) on reproductive organs of male Wistar rats. *4:38–45*.
- Ost SC, Varoli FMF, Matushima ER, Bernardi MM (2007) Comparative Studies of Delthametrin Acute Toxicity Toxicity in Exotic and Brazilian Fish. *J Braz Soc Ecotoxicol* 2:101–106.
- Pullanna K, Philip GH (2014) Reproductive performance of zebrafish ( *Danio rerio* ) exposed to deltamethrin : Fecundity , histological and hormonal end points. *1:253–268*.
- Rašković B, Poleksić V, Višnjić-Jeftić Ž, Skorić S, Gačić Z, Djikanović V, Jarić I,

- Lenhardt M. (2015) Use of histopathology and elemental accumulation in different organs of two benthophagous fish species as indicators of river pollution. *Environ Toxicol.* 30(10):1153-61.
- Russell LD, Ettlín RA, Hikim APS, Clegg, ED. *Histological and histopathological evaluation of the testis*, Cache River Press, Florida, 199.
- Salmon AB, Leonard S, Masamsetti V, et al (2009) The long lifespan of two bat species is correlated with resistance to protein oxidation and enhanced protein homeostasis. *FASEB J* 23:2317–26. doi: 10.1096/fj.08-122523
- Santos MAT Dos, Areas MA, Reyes FGR (2007) Piretróides - uma visão geral. *Aliment e Nutr - Brazilian J Food Nutr* 18:339–349.
- Schiesari L, Waichman a., Brock T, et al (2013) Pesticide use and biodiversity conservation in the Amazonian agricultural frontier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368:20120378. doi: 10.1098/rstb.2012.0378
- Stahlschmidt P, Brühl CA (2012) Bats at risk? Bat activity and insecticide residue analysis of food items in an apple orchard. *Environ Toxicol Chem* 31:1556–1563. doi: 10.1002/etc.1834
- Stechert C, Kolb M, Bahadir M, et al (2014) Insecticide residues in bats along a land use-gradient dominated by cotton cultivation in northern Benin, West Africa. *Environ Sci Pollut Res* 21:8812–8821. doi: 10.1007/s11356-014-2817-8
- Valdespino C, Sosa VJ (2017) Effect of landscape tree cover, sex and season on the bioaccumulation of persistent organochlorine pesticides in fruit bats of riparian corridors in eastern Mexico. *Chemosphere* 175:373–382. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.071
- Van Dyk JS, Pletschke B (2011) Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere* 82:291–307. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.10.033
- Wang L-S, Wang L, Wang L, et al (2009a) Effect of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate on the wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Environ Toxicol* 24:296–303. doi: 10.1002/tox
- Wang XZ, Liu SS, Sun Y, et al (2009b) Beta-cypermethrin impairs reproductive function in male mice by inducing oxidative stress. *Theriogenology* 72:599–611. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.04.016
- Wilhelm Filho D, Althoff SL, Dafré AL, Boveris A (2007) Antioxidant defenses,

- longevity and ecophysiology of South American bats. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* 146:214–220. doi: 10.1016/j.cbpc.2006.11.015
- Zhang SY, Ito Y, Yamanoshita O, et al (2007) Permethrin may disrupt testosterone biosynthesis via mitochondrial membrane damage of leydig cells in adult male mouse. *Endocrinology* 148:3941–3949. doi: 10.1210/en.2006-1497
- Zimmerli S, Bernet D, Burkhardt-Holm P, et al (2007) Assessment of fish health status in four Swiss rivers showing a decline of brown trout catches. *Aquat Sci* 69:11–25. doi: 10.1007/s00027-006-0844-3

### 3 - CONCLUSÕES GERAIS

Este foi o primeiro estudo que verificou os efeitos tóxicos da exposição oral a baixas concentrações de DTM em morcegos frugívoros *A. lituratus*. Os animais expostos apresentaram hiperglicemia, redução das reservas de glicogênio e esteatose hepática, indicando alterações no metabolismo de carboidratos. As concentrações das transaminases alanina e aspartato aminotransferases no plasma dos animais aumentaram, refletindo os danos celulares no fígado e músculo peitoral.

O piretroide DTM também aumentou a síntese de espécies reativas, o peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico e conseqüentemente levou ao estresse oxidativo no fígado, músculo peitoral e testículos dos morcegos. O músculo peitoral foi o tecido mais sensível aos efeitos da DTM, pois além de apresentar alterações nas enzimas antioxidante, o tecido sofreu oxidação de proteínas e lipídios. Esses resultados, geraram danos ao tecido que podem comprometer a capacidade do voo dos morcegos.

O desbalanço entre espécies reativas de oxigênio e antioxidantes, e o processo de biotransformação da DTM no organismo, provavelmente foram responsáveis pelas alterações histopatológicas encontradas no fígado, intestino, rim e testículos dos animais expostos. O estresse oxidativo resultante, possivelmente também foi responsável por causar apoptose nas células germinativas dos túbulos seminíferos, e no intestino dos morcegos expostos.

Os animais não apresentaram alterações nos parâmetros imunológicos avaliados. Provavelmente devido ao tempo de exposição. Entretanto, ainda são necessários maiores estudos sobre imunotoxicologia em morcegos.

Portanto, os resultados desta pesquisa mostram que a exposição oral de morcegos frugívoros a baixas concentrações da formulação comercial do inseticida DTM pode alterar o metabolismo de carboidratos, causar injúrias no fígado, músculo peitoral, rins, intestino e testículo (Anexo 1). Assim, baixas concentrações de DTM podem ser tóxicas para morcegos frugívoros, e comprometer a saúde desses animais.

# ANEXO 1

