

KEMILLI PIO GREGÓRIO

**DANOS OXIDATIVOS E TECIDUAIS INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO
SUBCRÔNICA AO ACETATO DE CHUMBO EM MORCEGOS FRUGÍVOROS QUE
ATUAM NO REFLORESTAMENTO DA MATA ATLÂNTICA**

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

Orientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas

Coorientadora: Reggiani Vilela Gonçalves

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

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

T

G821d
2023
Gregório, Kemilli Pio, 1996-
Danos oxidativos e teciduais induzidos pela exposição
subcrônica ao acetato de chumbo em morcegos frugívoros que
atuam no reflorestamento da Mata Atlântica / Kemilli Pio
Gregório. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (42 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Mariella Bontempo Duca de Freitas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Animal, 2023.
Referências bibliográficas: f. 32-42.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.448>
Modo de acesso: World Wide Web.

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

CDD 22. ed. 599.45


KEMILLI PIO GREGÓRIO

**DANOS OXIDATIVOS E TECIDUAIS INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO
SUBCRÔNICA AO ACETATO DE CHUMBO EM MORCEGOS FRUGÍVOROS QUE
ATUAM NO REFLORESTAMENTO DA MATA ATLÂNTICA**


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

APROVADA: 28 de abril de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **KEMILLI PIO GREGORIO**
Data: 26/07/2023 12:28:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Kemilli Pio Gregório
Autora

Documento assinado digitalmente
 **MARIELLA BONTEMPO DUCA DE FREITAS**
Data: 26/07/2023 12:18:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mariella Bontempo Duca de Freitas
Orientadora

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

GREGÓRIO, Kemilli Pio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2023. **Danos oxidativos e teciduais induzidos pela exposição subcrônica ao acetato de chumbo em morcegos frugívoros que atuam no reflorestamento da mata atlântica.** Orientadora: Mariella Bontempo Freitas. Coorientadora: Reggiani Vilela Gonçalves.

O chumbo (Pb), metal pesado muito utilizado em diferentes atividades antropogênicas, é conhecido por ser um perigoso contaminante ambiental devido suas características não biodegradáveis e à sua alta toxicidade, mesmo em baixas concentrações. Sua contaminação é capaz de causar diversos danos bioquímicos e teciduais em organismos afetados. Morcegos, espécies-chaves para os ecossistemas, são recorrentemente afetados por contaminações de Pb por possuírem diferentes habitats e nichos ecológicos e devido seu modo de vida longo. Objetivou-se avaliar os efeitos induzidos pela exposição subcrônica de acetato de Pb em morcegos frugívoros. Morcegos machos da espécie *Artibeus lituratus* foram capturados e divididos aleatoriamente em dois grupos. Grupo 1: (Controle - CTR, n=7) recebeu solução salina 0,9% via injeção intraperitoneal e Grupo 2: (Chumbo – Pb, n=6) recebeu acetato de Pb (20 mg/kg) via injeção intraperitoneal. Ambos os grupos receberam as respectivas injeções uma vez a cada 7 dias, totalizando 3 injeções. Após 21 dias, os animais foram eutanasiados e os tecidos armazenados para análises oxidativas e teciduais. Nossos resultados mostraram que o Pb induziu aumento nos níveis de óxido nítrico (NO) e na atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD), e diminuição na capacidade antioxidante total (FRAP) no fígado. O tecido hepático apresentou também maior incidência de infiltrado inflamatório e congestão vascular e diminuição do diâmetro do núcleo de hepatócito. No rim foi observado aumento na atividade enzimática da Glutathione-S-transferase (GST) e maior incidência de dilatação de vasos sanguíneos. No testículo foi observado aumento nos níveis de malondialdeído (MDA). E no músculo peitoral observamos diminuição na atividade enzimática da catalase (CAT). Tais achados indicam que a exposição ao Pb pode estar interferindo no metabolismo e na reprodução de morcegos frugívoros.

Palavras-chave: Metal pesado. *Artibeus lituratus*. Ecotoxicologia. Estresse oxidativo. Histopatologia.

ABSTRACT

GREGÓRIO, Kemilli Pio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2023. **Oxidative and tissue damages induce by subchronic exposure to lead acetate in fruit bats that play in the reforestation of the Atlantic forest.** Adviser: Mariella Bontempo Freitas. Co-adviser: Reggiani Vilela Gonçalves.

Lead (Pb), a heavy metal widely used in different anthropogenic activities, is known to be a dangerous environmental contaminant due to its non-biodegradable characteristics and to its high toxicity, even at low concentrations. Its contamination is capable of causing several biochemical and tissue damages in affected organisms. Bats, key species for ecosystems, are recurrently affected by Pb contamination because they have different habitats and ecological niches, and because of their long-lived way of life. The objective was to evaluate the effects induced by subchronic exposure to Pb acetate in fruit bats. Male bats of the species *Artibeus lituratus* were captured and randomly divided into two groups. Group 1: (Control - CTR, n=7) received 0.9% saline solution via intraperitoneal injection and Group 2: (Lead - Pb, n=6) received Pb acetate (20 mg/kg) via intraperitoneal injection. Both groups received the respective injections once every 7 days, totaling 3 injections. After 21 days, the animals were euthanized and the tissues stored for oxidative and tissue analyses. Our results showed that Pb induced increased nitric oxide (NO) levels and Superoxide dismutase (SOD) enzyme activity, and decreased total antioxidant capacity (FRAP) in liver. The liver tissue also showed a higher incidence of inflammatory infiltrate and vascular congestion and decreased hepatocyte core diameter. In the kidney, an increase in Glutathione-S-transferase (GST) enzyme activity and a higher incidence of blood vessel dilatation were observed. In the testicle an increase in malondialdehyde (MDA) levels was observed. In the pectoral muscle we observed a decrease in catalase (CAT) enzyme activity. These findings indicate that Pb exposure may be interfering with the metabolism and reproduction of fruit bats.

Keywords: Heavy metal. *Artibeus lituratus*. Ecotoxicology. Oxidative stress. Histopathology.

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
2.1. Autorizações	9
2.2. Produtos químicos.....	9
2.3. Animais	9
2.4. Desenho experimental.....	10
2.5. Índices dos órgãos.....	10
2.6. Análises de estresse oxidativo	10
2.6.1. Preparação do tecido.....	10
2.6.2. Ensaio FRAP	11
2.6.3. Produção de Óxido Nítrico	11
2.6.4. Determinação de Malondialdeído.....	11
2.6.5. Atividade da Superóxido dismutase	12
2.6.6. Atividade da Catalase	12
2.6.7. Atividade da Glutathione S-transferase.....	13
2.6.8. Oxidação de Proteínas	13
2.6.9. Proteína Total	13
2.7. Histomorfometria.....	14
2.8. Análise estatística.....	14
3. RESULTADO	14
3.1. Massa corporal e índices teciduais.....	15
3.2. Estresse Oxidativo	15
3.2.1. Fígado	15
3.2.2. Rim	17
3.2.3. Testículo	19
3.2.4. Encéfalo.....	21
3.2.5. Músculo	23
3.3. Histologia.....	24
3.3.1. Fígado	24
3.3.2. Rim	25
4. DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÃO	31
6. REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

Metais pesados são elementos químicos que ocorrem naturalmente na crosta terrestre e apresentam elevado grau de reatividade e capacidade de bioacúmulo (Briffa et al., 2020). Dentre esses elementos, destaca-se o chumbo (Pb), muito utilizado para a fabricação de diversos produtos como cosméticos, medicamentos, tintas, tubos, baterias, pesticidas, fertilizantes e em atividades como a mineração (Abdel-Daim et al., 2020; Landrigan et al., 2000). Contudo, grandes concentrações desse metal foram e continuam sendo lançadas no meio ambiente atingindo diferentes ecossistemas (Briffa et al., 2020). Em áreas da Mata Atlântica brasileira, por exemplo, já foi detectado que o solo, o ar e a água estão contaminados com Pb (Nakazato et al., 2021; Vormittag et al., 2021; Zebral et al., 2022).

Em 2022, o Pb foi listado como o segundo metal na lista de prioridade de substâncias toxicológicas da Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (ATSDR) dos Estados Unidos. Existe uma grande preocupação quanto à contaminação ambiental por Pb em função de suas características não biodegradáveis, somada à sua alta toxicidade, mesmo em baixas concentrações (Tchounwou et al., 2012). Além disso, esse metal é apontado como responsável por cerca de 10% de toda a poluição ambiental causada por metais pesados (Collin et al., 2022). Devido a isso, nos últimos anos, alguns esforços, como a proibição global da produção e uso de gasolina contendo Pb, vem sendo adotada a fim de diminuir os impactos causados pelo Pb nos ecossistemas (Jie et al., 2022; Lacerda et al., 2023).

Diversos estudos têm demonstrado que tanto humanos quanto roedores expostos ao Pb, mesmo em baixas concentrações, podem sofrer danos em diversos órgãos como fígado, rim, testículos, cérebro e coração (Hassan et al., 2019; Javorac et al., 2022; Lakshmi et al., 2013). O Pb é capaz de induzir estresse oxidativo, aumentando a formação de radicais livres, e formando complexos inativos com enzimas fundamentais para as defesas antioxidantes dos organismos atingidos (Bokara et al., 2008; Sharma et al., 2010; Wang et al., 2012). Também é capaz de induzir alterações na estrutura de diferentes tecidos e aumentar a incidência de patologias (Abdelhamid et al., 2020; Hou et al., 2019). Ratos expostos a 20 mg/kg de acetato de Pb por meio de injeção intraperitoneal durante 5 dias apresentaram desbalanço redox com aumento de peroxidação lipídica e óxido nítrico e diminuição das atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e glutathione S-transferase (GST), e ainda aumentaram a incidência de patologias como infiltrado inflamatório e apoptose no tecido renal (Abdel Moneim et al., 2011). A exposição oral de ratos a 20 mg/kg de acetato de Pb

durante 10 dias induziu elevação nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de peroxidação lipídica no testículo e rim de animais expostos. No testículo, ocorreu degeneração com perda da função espermato gênica. No rim foi observado células inflamatórias entre túbulos e glomérulos degenerados (Kelainy et al., 2019). Já foi relatado também que o tecido hepático de ratos expostos intraperitonealmente a 15 mg/kg de acetato de Pb por 12 dias consecutivos exibiu diminuição das atividades da SOD, CAT e GST. Vacuolização dos hepatócitos, necrose periportal e infiltrados inflamatórios também foram observados no fígado de animais expostos (Ilesanmi et al., 2022).

Apesar da periculosidade associada à exposição excessiva ao Pb, existe uma lacuna nos estudos em relação aos efeitos causados pela contaminação ambiental desse metal em animais silvestres, principalmente aqueles de importância crítica para reflorestamento de áreas degradadas, como os morcegos Neotropicais. Morcegos estão constantemente mais expostos a metais pesados em função de seu ciclo de vida longo (podem viver mais de 20 anos na natureza), alta taxa metabólica basal (especialmente nectarívoros e frugívoros), dieta variada (pólen, néctar, frutas, insetos, pequenos vertebrados e sangue), ampla distribuição geográfica (em todo o globo com exceção dos polos), grande riqueza de espécies (mais de 1200 já descritas) e por, muitas vezes, coexistir com seres humanos em áreas antropizadas (de Souza et al., 2020; Zukal et al., 2015). Concentrações de Pb, variando entre 5,8 e 8,0 µg/g no fígado (Zocche et al., 2010), 5,68 e 69,7 µg/g no rim (Walker et al., 2007) e 0,33 e 53,15 µg/g no fígado, rim, estômago e ossos (Hernout et al., 2016) já foram mensuradas em diferentes espécies de morcegos no sul do Brasil, na Inglaterra e Países de Gales, respectivamente.

Morcegos desempenham um papel crucial na dinâmica de florestas Neotropicais. Eles atuam como polinizadores de inúmeras espécies de plantas florestais, pioneiras, e/ou espécies chaves na dinâmica dessas florestas (Kunz et al., 2011). Durante o voo, as espécies frugívoras dispersam sementes de plantas, favorecendo regeneração de florestas (Parolin et al., 2021) e, por isso, exercem um importante papel no reflorestamento ambiental como dispersores de sementes a longas distâncias (de Souza et al., 2020). Além disso, respondem bem às alterações causadas por contaminantes, e por isso, podem ser usados como bioindicadores potenciais de qualidade ambiental (Zukal et al., 2015). Os morcegos, também, podem ter um grande valor econômico, principalmente, quando associados à agricultura, pois se alimentam de grandes quantidades de insetos, inclusive daqueles considerados pragas agrícolas (Kunz et al., 2011), fazendo um controle natural.

Apesar de sua grande importância ecológica, estudos que fazem monitoramento de contaminações por metais pesados e seus efeitos fisiológicos em espécies de morcegos de

ecossistemas Neotropicais ainda são escassos. A maioria das pesquisas foram realizadas com pelo, pele e/ou guano de morcegos para detecção da presença de metais pesados nos ambientes, porém os estudos atuais fornecem poucas informações sobre o potencial tóxico do Pb nesses animais. Dessa forma, objetivou-se avaliar a toxicidade induzida por uma exposição subcrônica de acetato de Pb em adultos de *Artibeus lituratus* machos. Para isso foram avaliados os marcadores de homeostase redox no fígado, rim, testículo, encéfalo e músculo, e de parâmetros histopatológicos no fígado e no rim. Nosso estudo é o primeiro que utiliza a metodologia da exposição prolongada de Pb em morcegos em cativeiro para entender como morcegos frugívoros respondem aos efeitos induzidos pela contaminação ambiental ao Pb.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Autorizações

A pesquisa foi aprovada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio (SISBIO N° 78961-1) e pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Viçosa (registro N° 58/2021).

2.2. Produtos químicos

Acetato de Pb neutro trihidratado, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, (99,5% de pureza) foi obtido da Vetec Química (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os outros produtos químicos utilizados eram de grau analítico e adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) e Merck (Darmstadt, Alemanha). Água destilada foi usada como solvente para o acetato de Pb.

2.3. Animais

Morcegos machos adultos (N=13, peso corporal=60,65±1,41g), da espécie *Artibeus lituratus*, foram coletados por redes de neblina em fragmentos de Mata Atlântica na região de Viçosa, Minas Gerais. Após retirados das redes os morcegos foram pesados, identificados por meio de chave de identificação de morcegos brasileiros (Vizotto & Taddei, 1973) e transportados para o morcegário do Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa. No morcegário os animais foram randomicamente distribuídos em recintos

individuais de alvenaria com 2m², telados, mantidos em temperatura ambiente e ciclo de luz natural. Os animais receberam água *ad libitum* e mamão (*Carica papaya*) e permaneceram no morcegário durante todo o experimento (um grupo experimental foi alojado por vez no morcegário). Os recintos foram visitados diariamente para limpeza e substituição dos alimentos e água. O mamão a ser oferecido e as sobras diárias foram pesados para controle alimentar de cada animal.

2.4. Desenho experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos, Grupo 1 (Controle- CTR, n=7) recebeu injeção intraperitoneal (iip) de 0,7 mL de solução salina 0,9% NaCl semanalmente (total de 3x, 1x por semana) e Grupo 2 (Chumbo – Pb, n=6) recebeu injeção intraperitoneal de 0,7 ml de acetato de Pb (20 mg/kg) semanalmente (idem ao CTR). Antes da exposição, os morcegos ficaram em cativeiro por 5 dias para aclimatação, quando receberam água e frutas *ad libitum*. A exposição durou 21 dias. Após esse período os animais foram pesados e eutanasiados por deslocamento cervical seguido de decapitação e os órgãos, fígado, rins, testículos, encéfalo e músculo foram retirados. Metade do órgão foi conservado em solução Karnovsky para análise histológica. Já a outra metade foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer - 80°C para análise das enzimas antioxidantes e produtos do estresse oxidativo.

2.5. Índices dos órgãos

Fígado e testículo de cada animal foram pesados em balanças de precisão. Para cálculo do índice de cada órgão foi feita uma porcentagem: peso do órgão/peso corporal total multiplicado por 100.

2.6. Análises de estresse oxidativo

2.6.1. Preparação do tecido

Os órgãos foram homogeneizados (1:10) com um homogeneizador de tecidos (LH, OMNI) em tampão fosfato de potássio (0,2 M) com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mmol/L em pH 7,4, em seguida foi centrifugado (12.000 g por 10 minutos a 4° C). O

sobrenadante resultante foi utilizado para as análises de FRAP (poder antioxidante redutor férrico), dos níveis de óxido nítrico (NO) e malondialdeído (MDA), proteína total (PT) e para a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST). O *pellet* foi utilizado para análise de oxidação de proteínas por meio da quantificação das proteínas carboniladas. A leitura das análises foram feitas em leitor de microplacas (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

2.6.2. Ensaio FRAP

O ensaio FRAP é um método para detectar a atividade antioxidante total (Benzie & Strain, 1996). O reagente FRAP foi preparado usando o método previamente descrito. Em resumo, tampão de acetato 300 mM (pH 3,6), solução de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) 10 mmol/L em ácido clorídrico 40 mmol/L e cloreto de ferro (III) 20 mmol/L foram misturados, respectivamente, na proporção de 10: 1: 1. O reagente FRAP (190 µL) foi misturado com 10 µL da amostra e incubado a 37 °C por 4 min. A absorbância de cada um foi medida a 593 nm em um leitor de microplacas. Soluções aquosas de concentração conhecida de Sulfato de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (10–500 µmol/L) foram usadas para conversão da absorbância em concentrações micromolares de FRAP.

2.6.3. Produção de Óxido Nítrico

A produção de nitrito, subproduto do óxido nítrico (NO), foi quantificada de acordo com a reação padrão de Griess. Assim, 50 µL de sobrenadante de cada amostra foi colocado em microplaca e adicionado volume igual de reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% N-(1-Naftil) etilenodiamina e 2,5% H_3PO_4) à temperatura ambiente e incubado no escuro por 10 min (Tsikas, 2007). A absorbância foi determinada em um leitor de microplacas a 570 nm. A conversão da absorbância em concentrações micromolares de NO foi obtida a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (0–100 µmol/L) e expressa como concentrações de NO (µmol/L).

2.6.4. Determinação de Malondialdeído

A extensão da peroxidação lipídica (LPO) foi medida de acordo com Buege e Aust (1978), envolvendo a medição de malondialdeído total (MDA), que é o principal produto da

peroxidação lipídica. Resumidamente, 0,2 mL do sobrenadante dos tecidos foram homogeneizados em 0,4 mL de uma solução de ácido tricloroacético (15%) /ácido tiobarbitúrico (0,375%) /ácido clorídrico (0,6%). A mistura reacional total foi mantida em banho-maria fervente por 40 min. Após resfriamento no gelo, álcool butílico (0,6 mL) foi adicionado, a solução foi agitada em vórtex por 2 min e centrifugada (9000 g por 10 min), o precipitado foi removido. O sobrenadante foi usado para medir a absorvância a 540 nm no leitor de microplacas. A concentração de MDA foi determinada usando a curva padrão de concentrações conhecidas de 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (TMPO). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína.

2.6.5. Atividade da Superóxido dismutase

A atividade da SOD foi determinada pelo método baseado na redução do ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio, diminuindo assim a auto oxidação do pirogalol, segundo Dieterich et al. (2000). A mistura reacional continha 99 μL de tampão fosfato de potássio (5 mmol/L, pH 8) e 30 μL da amostra. Inicialmente foi adicionado 6 μL de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) e a reação foi iniciada pela adição de 15 μL de pirogalol (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) e incubado a 40°C durante 15 minutos. Na sequência foi adicionado 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para interromper a reação. A mistura de reação foi medida a 570 nm. A atividade de SOD foi calculada como unidades por miligrama de proteína, sendo U de SOD definido como a quantidade que inibiu a taxa de auto oxidação do pirogalol em 50%.

2.6.6. Atividade da Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada adaptando o método de Hadwan e Abed (2016) usando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como substrato. Em resumo, para procedimento da amostra teste, foi pipetado em microplaca 5 μL de amostra e adicionado 100 μL de peróxido de hidrogênio (20 mmol/L). Após 3 min 150 μL de molibdato de amônio (32,4 mmol/L) foram adicionados para interromper a reação. Já para o teste controle o peróxido de hidrogênio foi substituído por 100 μL de tampão fosfato de sódio e potássio (50 mmol/L, pH 7,0) e adicionado em 5 μL de amostra. A leitura foi feita a 374 nm no leitor de placas. Para calcular o valor da atividade da CAT, foi feita uma curva padrão com diluição seriada de H_2O_2 de valores conhecidos. Os valores da amostra teste foram subtraídos dos valores do teste controle e usados

para obter a atividade de CAT. A atividade de CAT foi expressa em U CAT por miligrama de proteína.

2.6.7. Atividade da Glutathione S-transferase

A atividade de GST foi mensurada baseado no método de Habig et al. (1974). A atividade da GST foi avaliada de acordo com a formação de 2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB) conjugado com glutathione S-transferase. Resumidamente, 1 mmol/L de CDBN foi adicionado ao tampão contendo 1 mmol/L de GSH e a alíquota (10 μ L) da amostra a ser testada. Após a adição de CDBN, a mudança foi monitorada a 340 nm por 60 s. O coeficiente de extinção molar usado para CDBN foi $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mmol/L} \times \text{cm}$. Uma unidade de atividade da GST foi definida como a quantidade de enzima que catalisou a formação de um μ mol de produto/min/mL. A atividade da GST foi expressa em μ mol/min/g.

2.6.8. Oxidação de Proteínas

O teor de carbonila da proteína foi medido usando o procedimento de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Levine et al., 1994) com base nos grupos carbonila reagindo com o DNPH. Os pellets resultantes dos homogenatos de extração anteriores foram utilizados para quantificação. No tubo A (amostra), contendo 0,5 mL de pellet foi adicionado 0,5 mL de solução DNPH 10 mmol/L diluída em ácido clorídrico (7%). No tubo B (branco), contendo 0,5 mL de pellet foi adicionado 0,5 mL de ácido clorídrico (7%). O conteúdo dos tubos foi misturado em vórtex e mantidos em temperatura ambiente no escuro, agitando-os a cada 15 minutos, durante 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de TCA 10% gelado a cada tubo, que foram centrifugados (3.000 g por 10 min a 25°C) e tiveram o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado três vezes com 1 mL de acetato de etila e etanol (1:1 v/v). Finalmente, 1 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 6% foi adicionado, os tubos foram agitados em vórtex para dissolver o sedimento e o sobrenadante foi medido a 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol por mg de proteína com base no coeficiente de extinção molar de $\epsilon_{370} = 22 \text{ L} \times \text{mmol}$.

2.6.9. Proteína Total

Proteína total foi determinada de acordo com (Lowry et al., 1951) usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

2.7. Histomorfometria

Fragmentos de fígado e rim de cada grupo foram retirados e imersos em fixador Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas e subsequentemente desidratados em crescentes séries de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) e incorporados em metacrilato de 2-hidroxietilo (Historesin®, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Sessões com uma espessura de 3 µm foram obtidas usando um micrótomo rotativo (RM2265 – LEICA), obtendo 10 cortes por fragmento. Os cortes de fígado e rim foram corados com eosina e hematoxilina (HE). Na sequência fotomicrografias (10 imagens por animal/tecido) foram obtidas em microscópio óptico Olympus CX 40 (Olympus, Tóquio, Japão).

Nas imagens do fígado foram realizadas análises morfométricas. Foram feitas contagens de infiltração de leucócitos e congestão vascular totalizando 2660 pontos por animal. Além disso, foi mensurado o diâmetro total de 150 hepatócitos e núcleos de hepatócitos por animal. As análises foram feitas por grades com 266 interseções do software Image Pro Plus 4.5® (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Resultados foram expressos em porcentagem (%). Nos rins foram feitas análises morfométricas como: contagens de infiltração de leucócitos e dilatação de vasos sanguíneos totalizando 2660 pontos por animal. Além disso, foi mensurado a área total de 30 glomérulos por animal por animal para determinação da proporção da área glomerular ($\sum \text{área glomerular} \div \text{área total da imagem} \times 100$). As análises também foram feitas por grades com 266 interseções do software Image Pro Plus 4.5® (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Resultados foram expressos em porcentagem (%).

2.8. Análise estatística

A distribuição dos dados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk usando o programa GraphPad Prism (versão 8.0, Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os dados foram submetidos ao teste t para comparações de médias entre os grupos. Foi considerado um nível de significância 5% ($P < 0.05$).

3. RESULTADO

3.1. Massa corporal e índices teciduais

Os resultados mostram que, após a exposição ao acetato de Pb, a massa corporal, e os índices hepatossomático e gonadossomático não sofreram alterações significativas entre os morcegos dos grupos CTR e Pb. O consumo de mamão foi similar entre os grupos durante a exposição (Tabela 1).

Tabela 1. Massa corporal, índices hepatossomático e gonadossomático e consumo de mamão de *Artibeus lituratus* após iip de acetato de Pb.

	CTR	Pb
Massa corporal		
(g)	59.34 ± 2.10	62.17 ± 1.80
Índice		
hepatossomático	3.87 ± 0.25	4.04 ± 0.20
Índice		
gonadossomático	0.21 ± 0.02	0.16 ± 0.02
Consumo de		
mamão (g)	1.36 ± 0.02	1.34 ± 0.02

CTR: grupo controle, Pb: grupo chumbo. Os valores são a média ± EPM.

3.2. Estresse Oxidativo

3.2.1. Fígado

No fígado, observamos um aumento na atividade da SOD no grupo Pb ($p=0.0049$) em relação ao CTR (Fig. 1-D), sendo que CAT e GST não sofreram alterações significativas entre os grupos (Fig. 1-E e F) após a exposição. Também observamos uma diminuição nos níveis da capacidade antioxidante total (FRAP) no grupo Pb ($p= 0.0204$) em relação ao CTR (Fig. 1-G) e de NO entre os grupos Pb ($p= 0.0028$) e CTR (Fig. 1-C). MDA e PC não apresentaram alterações significativas entre os grupos CTR e Pb (Fig. 1-A e B) após exposição ao acetato de Pb.

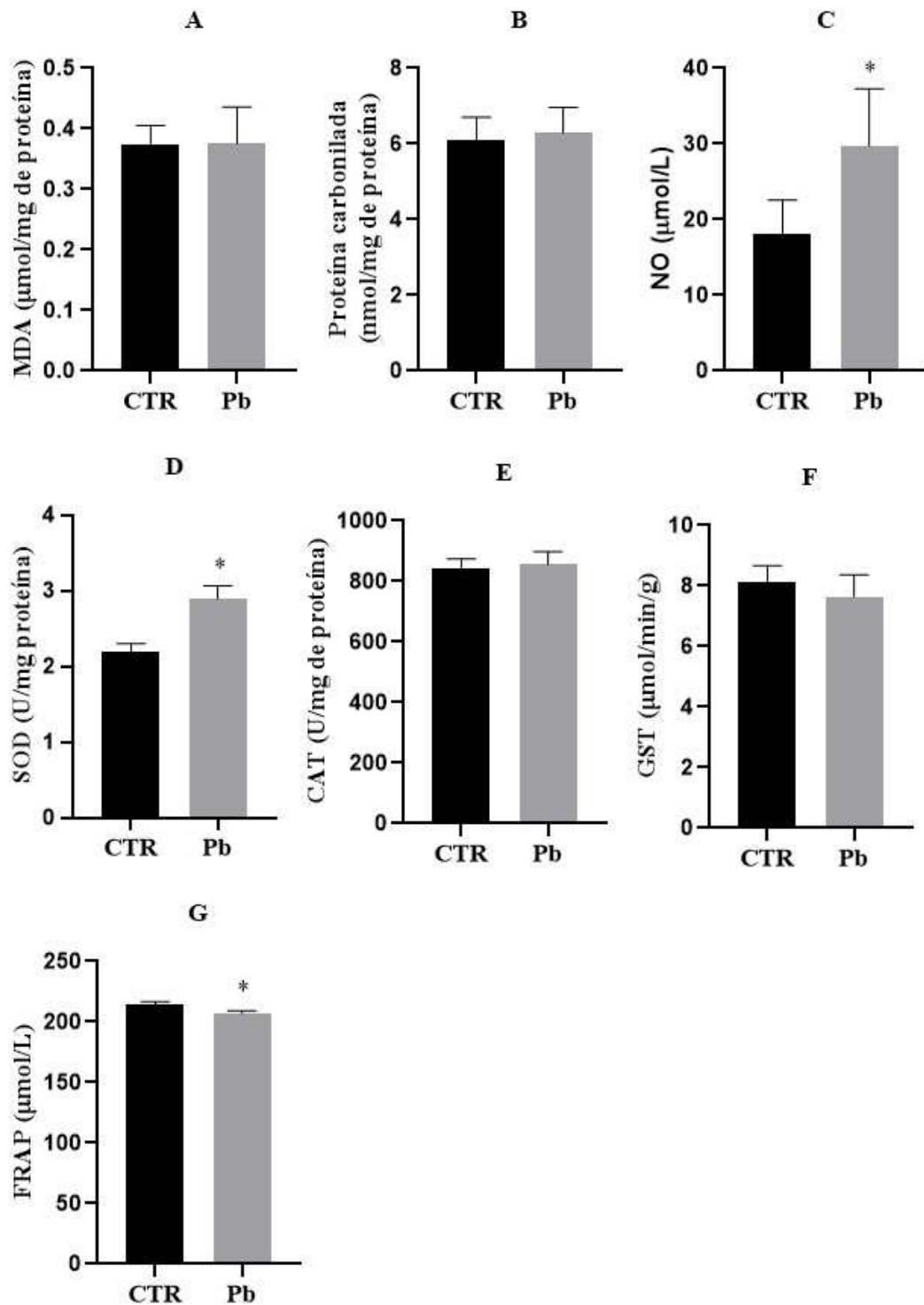


Figura 1. Efeitos da exposição ao acetato de Pb no fígado de *Artibeus lituratus* após 21 dias. (A) Malondialdeído - MDA; (B) proteína carbonilada - PC, (C) Óxido Nítrico - NO, (D) Atividade enzimática da Superóxido Dismutase - SOD, (E) Atividade enzimática da Catalase - CAT, (F) Atividade enzimática da Glutathiona S-transferase – GST, (G) capacidade antioxidante total-FRAP. CTR: grupo Controle, Pb: grupo acetato de Pb. * Indica diferença significativa entre o grupo Pb e o grupo CTR ($p < 0,05$). Os valores são a média \pm EPM.

3.2.2. Rim

No rim, observamos um aumento na atividade da GST no grupo Pb ($p=0.0118$) em relação ao CTR (Fig. 2-F). SOD, CAT, FRAP, MDA, NO e PC não mostraram alterações significativas entre os grupos CTR e Pb (Fig. 2-A, B, C, D, E e G) após exposição ao acetato de Pb.

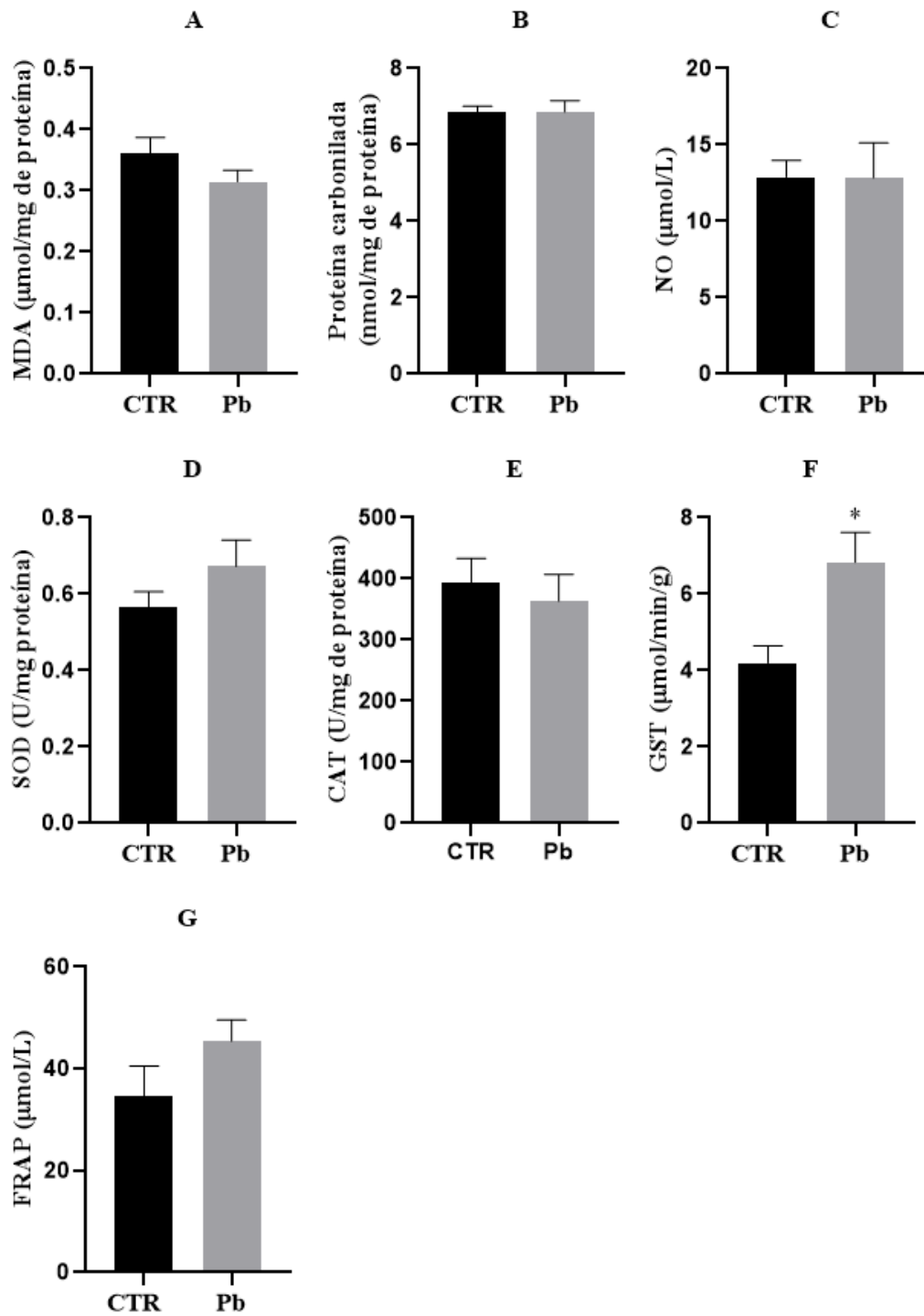


Figura 2. Efeitos da exposição ao acetato de Pb no rim de *Artibeus lituratus* após 21 dias. (A) Malondialdeído - MDA; (B) proteína carbonilada - PC, (C) Óxido Nítrico - NO, (D) Atividade enzimática da Superóxido Dismutase - SOD, (E) Atividade enzimática da Catalase - CAT, (F) Atividade enzimática da Glutathione S-transferase – GST, (G) capacidade antioxidante total-FRAP. CTR: grupo Controle, Pb: grupo acetato de Pb. * Indica diferença significativa entre o grupo Pb e o grupo CTR ($p < 0,05$). Os valores são a média \pm EPM.

3.2.3. Testículo

No testículo, observamos um aumento nos níveis de MDA no grupo Pb ($p= 0.0186$) em relação ao CTR (Fig. 3-A). SOD, CAT, GST, FRAP, NO e PC não apresentaram alterações significativas entre os grupos CTR e Pb (Fig. 3-B, C, D, E, F e G) após exposição ao acetato de Pb.

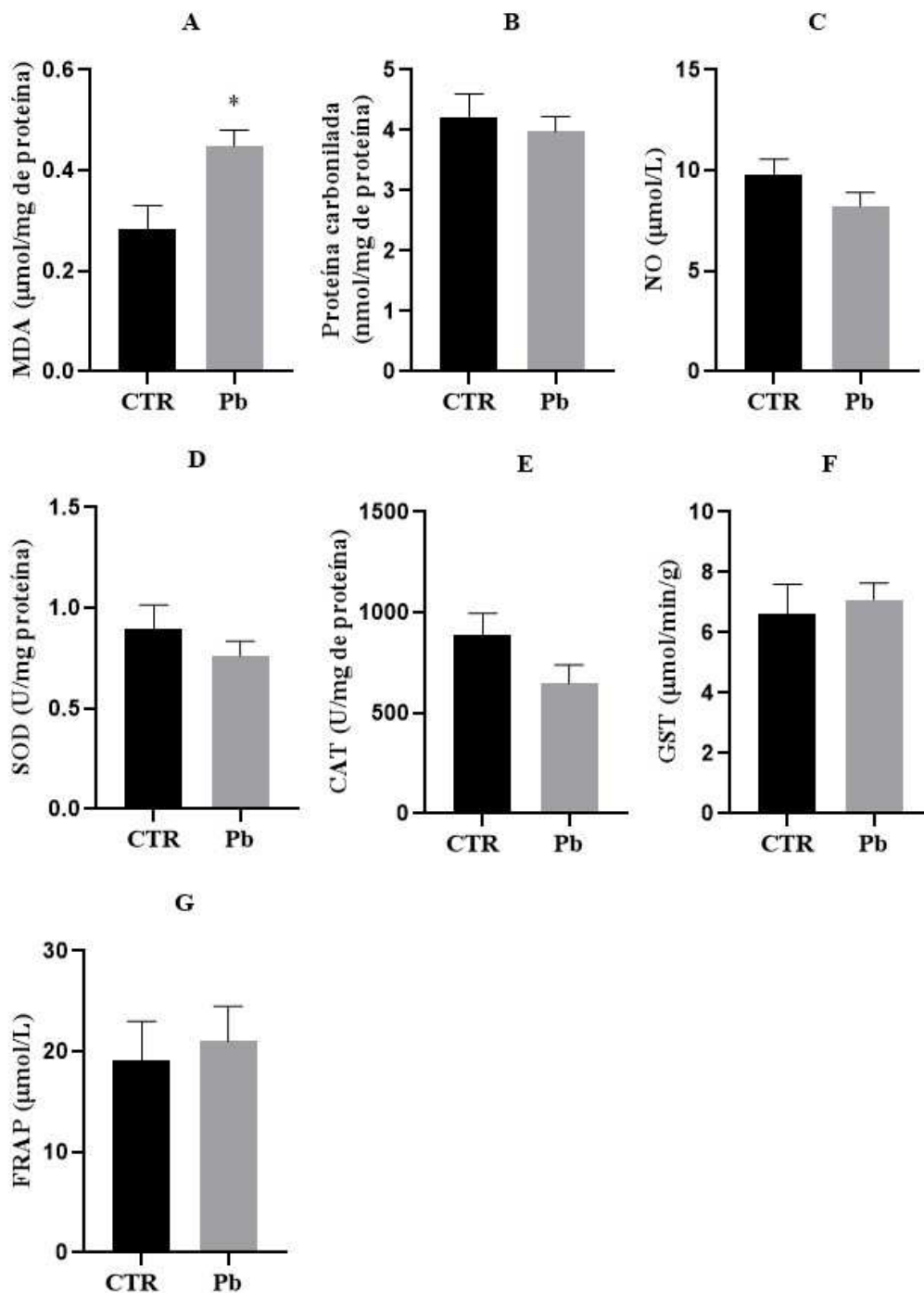


Figura 3. Efeitos da exposição ao acetato de Pb no testículo de *Artibeus lituratus* após 21 dias. (A) Malondialdeído - MDA; (B) proteína carbonilada - PC, (C) Óxido Nítrico - NO, (D) Atividade enzimática da Superóxido Dismutase - SOD, (E) Atividade enzimática da Catalase - CAT, (F) Atividade enzimática da Glutathiona S-transferase – GST, (G) capacidade antioxidante total - FRAP. CTR: grupo Controle, Pb: grupo acetato de Pb. * Indica diferença significativa entre o grupo Pb e o grupo CTR ($p < 0,05$). Os valores são a média \pm EPM.

3.2.4. Encéfalo

No encéfalo, não observamos diferenças significativas nos marcadores do status oxidativo entre os morcegos (*Artibeus lituratus*) dos grupos CTR e Pb (Fig. 4) após exposição ao acetato de Pb.

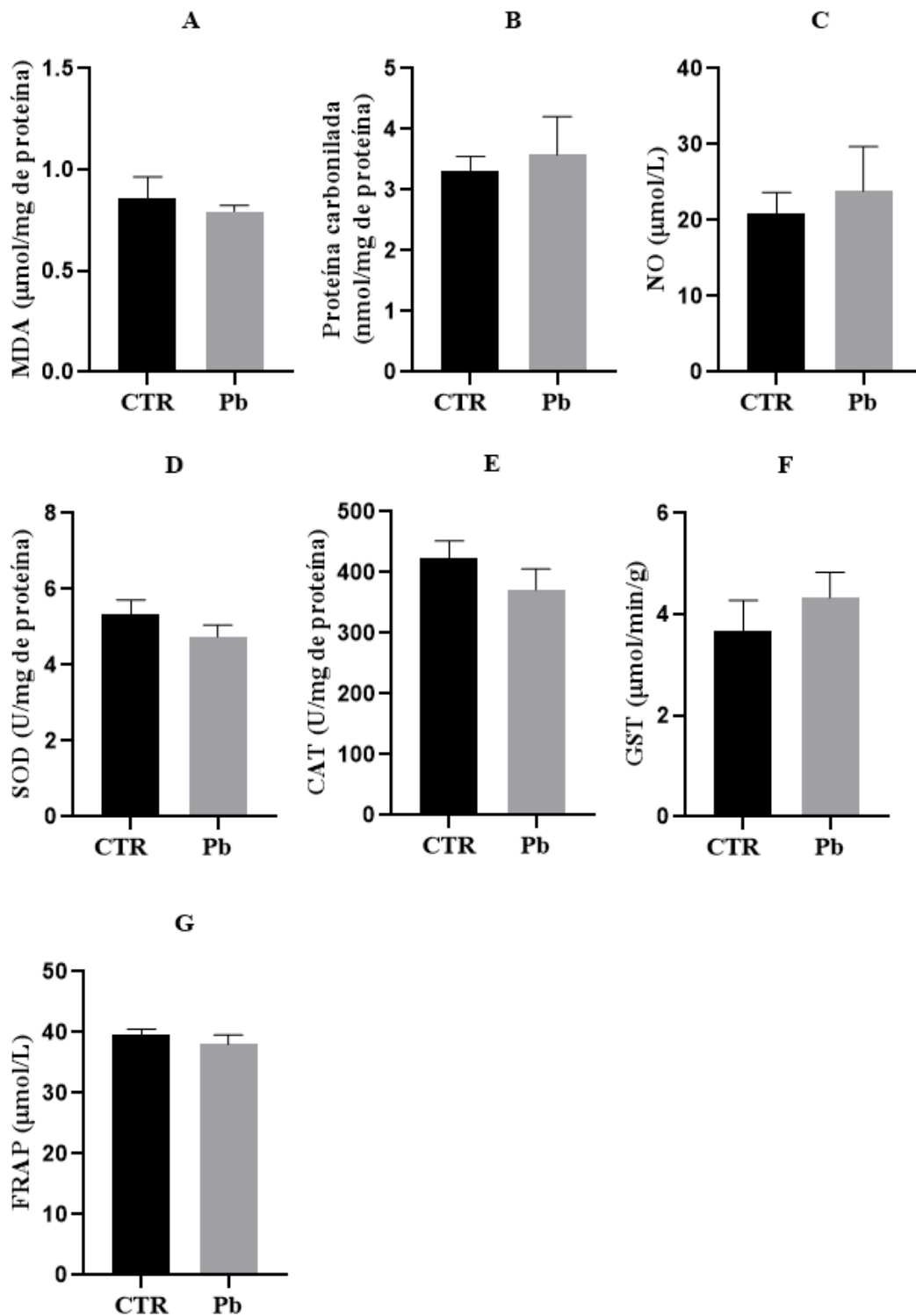


Figura 4. Efeitos da exposição ao acetato de Pb no encéfalo de *Artibeus lituratus* após 21 dias. (A) Malondialdeído - MDA; (B) proteína carbonilada - PC, (C) Óxido Nítrico - NO, (D) Atividade enzimática da Superóxido Dismutase - SOD, (E) Atividade enzimática da Catalase - CAT, (F) Atividade enzimática da Glutathiona S-transferase – GST, (G) capacidade antioxidante

total-FRAP. CTR: grupo Controle, Pb: grupo acetato de Pb. * Indica diferença significativa entre o grupo Pb e o grupo CTR ($p < 0,05$). Os valores são a média \pm EPM.

3.2.5. Músculo

No músculo, observamos uma diminuição na atividade da CAT no grupo Pb ($p= 0.035$) em relação ao CTR (Fig. 5- D). SOD, GST, FRAP, MDA e NO não sofreram alterações significativas entre os grupos CTR e Pb (Fig. 5-A, B, C, E e F) após exposição ao acetato de Pb.

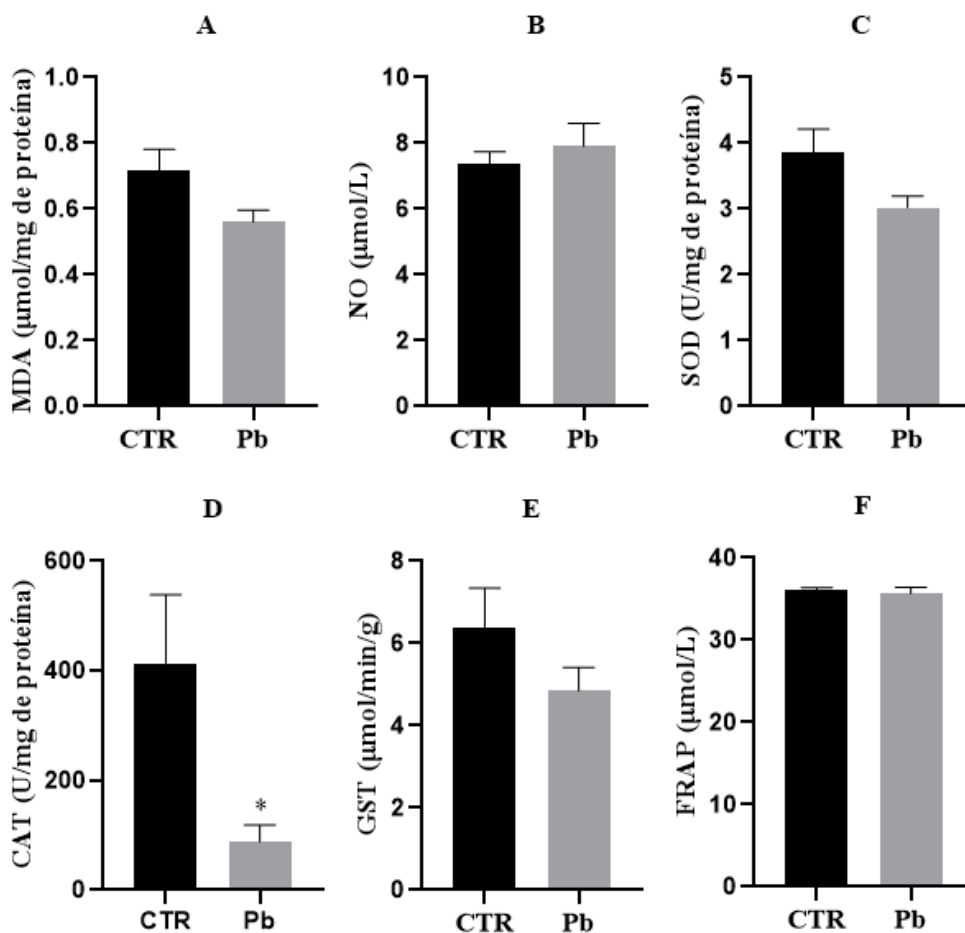


Figura 5. Efeitos da exposição ao acetato de Pb no músculo peitoral de *Artibeus lituratus* após 21 dias. (A) Malondialdeído - MDA; (B) Óxido Nítrico - NO, (C) Atividade enzimática da Superóxido Dismutase - SOD, (D) Atividade enzimática da Catalase - CAT, (E) Atividade enzimática da Glutathione S-transferase – GST, (F) capacidade antioxidante total-FRAP. CTR: grupo Controle, Pb: grupo acetato de Pb. * Indica diferença significativa entre o grupo Pb e o grupo CTR ($p < 0,05$). Os valores são a média \pm EPM.

3.3. Histologia

3.3.1. Fígado

No fígado foi observado maior porcentagem de infiltrado inflamatório nos animais do grupo Pb ($p= 0.0122$) em relação aos animais do grupo CTR. A porcentagem de congestão vascular foi maior nos animais do grupo Pb ($p= 0.0009$) em relação aos animais do grupo CTR. Foi observado também diminuição no diâmetro do núcleo de hepatócito nos animais do grupo Pb ($p= 0.0110$) em relação aos animais do grupo CTR. Não foram observadas diferenças no diâmetro do hepatócito nos animais do grupo Pb (Fig. 6 e 7).

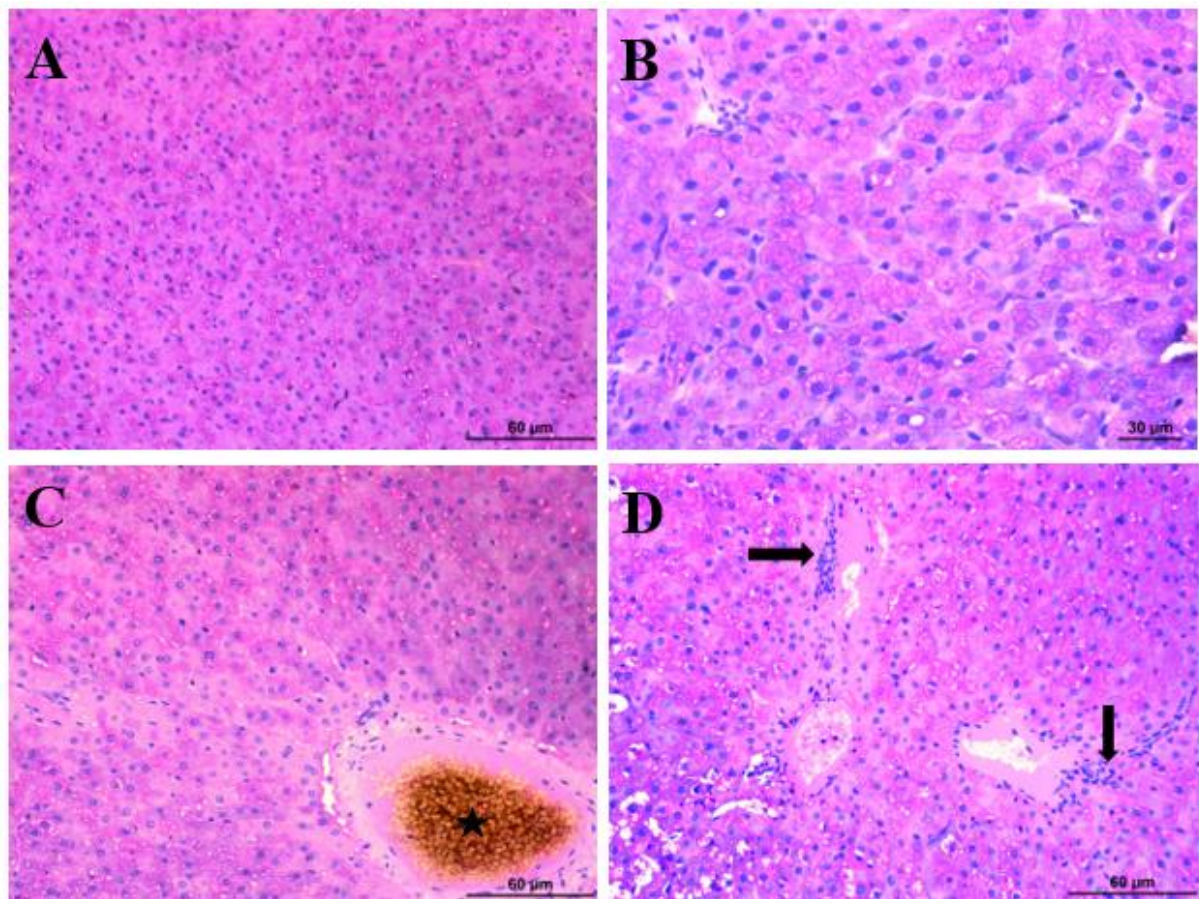


Figura 6. Fotomicrografia do tecido hepático de *Artibeus lituratus* dos grupos CTR e Pb. A) CTR; B) CTR; C) Pb: congestão vascular (estrela) D) Pb: infiltrado inflamatório (ponta da seta preta). Coloração com Hematoxilina e Eosina. A, C e D: barra de escala representa 60 µm. B: barra de escala representa 30 µm.

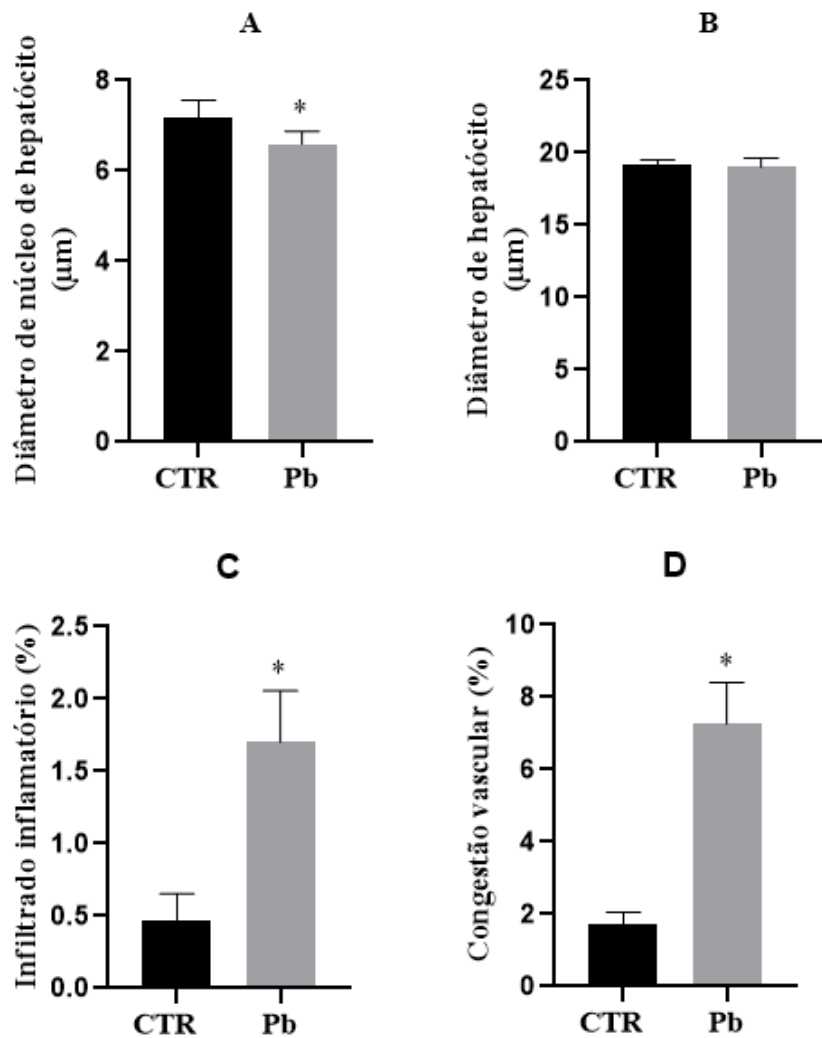


Figura 7. Efeitos da exposição ao acetato de Pb durante 21 dias sobre parâmetros histológicos no fígado de *Artibeus lituratus*. (A) Diâmetro de núcleo de hepatócito, (B) Diâmetro de hepatócito, (C) Infiltrado inflamatório, (D) Congestão vascular. CTR: grupo Controle, Pb: grupo acetato de Pb. * Indica diferença significativa entre o grupo Pb e o grupo CTR ($p < 0,05$). Os valores são a média \pm EPM.

3.3.2. Rim

No rim foi observado maior porcentagem de vasos sanguíneos dilatados nos animais do grupo Pb ($p= 0.0321$) em relação aos animais do grupo CTR. Não foram observadas diferenças na porcentagem de infiltrado inflamatório e na proporção da área glomerular entre os animais dos grupos CTR e Pb (Fig. 8 e 9).

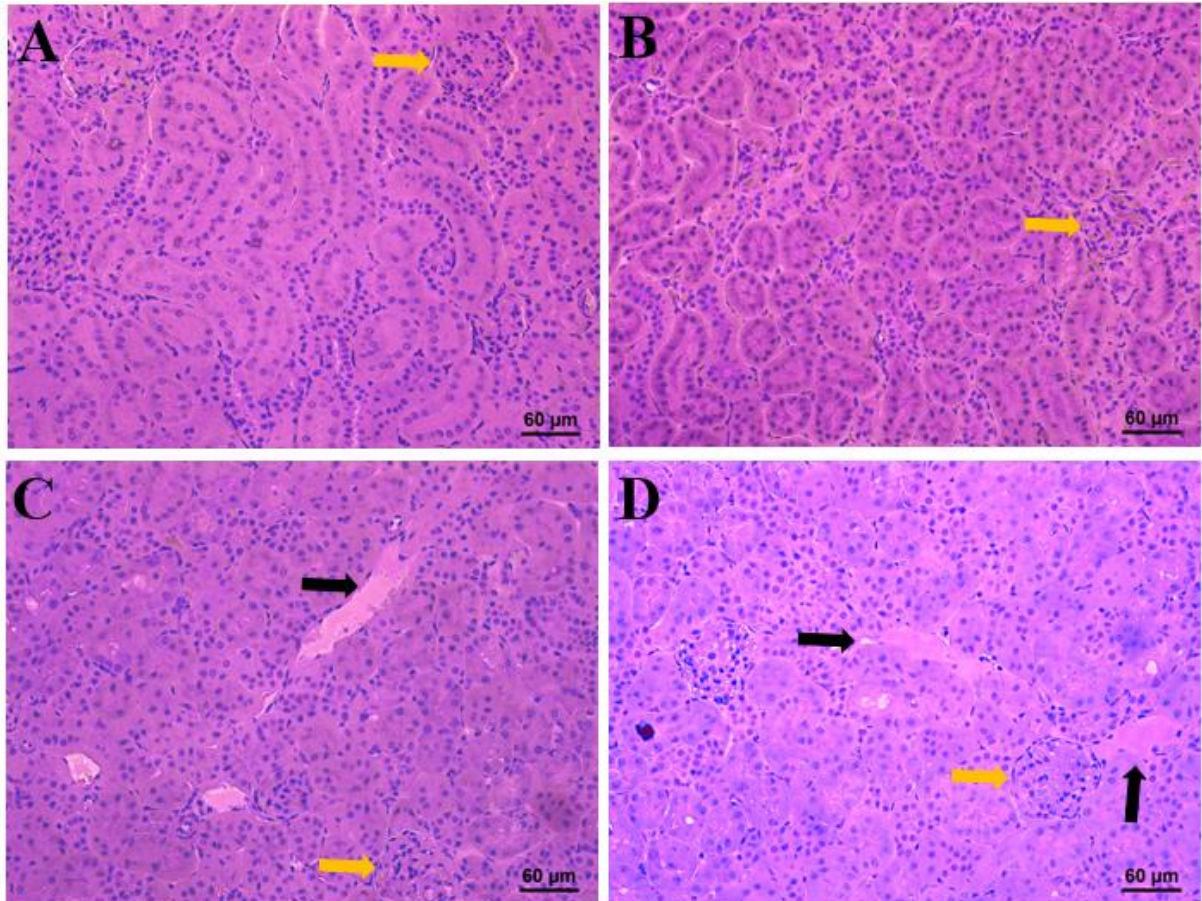


Figura 8. Fotomicrografia do tecido renal de *Artibeus lituratus* dos grupos CTR e Pb. A) CTR: glomérulo (ponta da seta amarela); B) CTR: glomérulo (ponta da seta amarela); C) Pb: glomérulo (asterisco) e dilatação vascular (ponta da seta preta); D) Pb: glomérulo (asterisco) e dilatação vascular (ponta da seta preta). Coloração com Hematoxilina e Eosina. Barra de escala representa 60 µm.

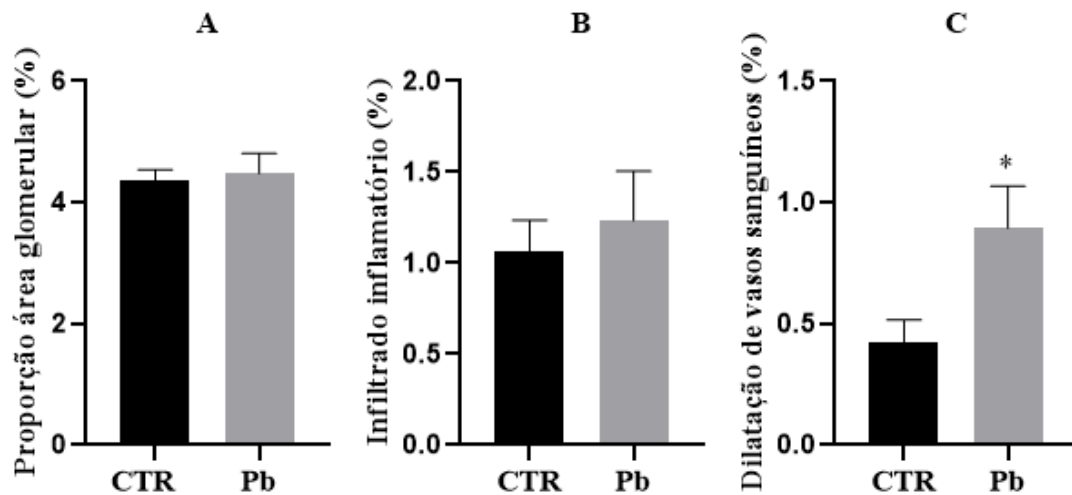


Figura 9. Efeitos da exposição ao acetato de Pb durante 21 dias sobre parâmetros histológicos no rim de *Artibeus lituratus*. (A) Proporção área glomerular, (B) Infiltrado inflamatório, (C) Dilatação de vasos sanguíneos. CTR: grupo Controle, Pb: grupo acetato de Pb. * Indica diferença significativa entre o grupo Pb e o grupo CTR ($p < 0,05$). Os valores são a média \pm EPM.

4. DISCUSSÃO

Este estudo investigou como morcegos frugívoros respondem aos efeitos induzidos pela contaminação experimental ao Pb, a fim de se investigar a toxicidade deste metal em concentrações ambientais, às quais morcegos estão expostos na natureza. Nossos resultados mostraram que morcegos da espécie *Artibeus lituratus* expostos semanalmente a 20 mg/kg de acetato de Pb durante 21 dias apresentaram alterações nos marcadores de estresse oxidativo NO no fígado e MDA no testículo, nos níveis da atividade enzimática da SOD no fígado, GST no rim e CAT no músculo e na capacidade antioxidante total no fígado. Também observamos diminuição no diâmetro do núcleo de hepatócito, aumento da incidência de infiltrado inflamatório e congestão vascular no fígado e aumento da incidência de vasos sanguíneos dilatados no rim. As alterações variaram de acordo com cada tecido. Fígado e testículo foram os órgãos mais afetados. Tais alterações indicam a toxicidade do Pb, em concentrações ambientais, em morcegos. E podem interferir no metabolismo e na reprodução desses animais.

O fígado é responsável por diversas funções vitais no metabolismo, como a biotransformação de xenobióticos. Dessa forma, muitas substâncias, após chegarem no fígado para serem metabolizadas, podem causar danos oxidativos e teciduais (Ponce-Canchihuamán

et al., 2010). Em nosso estudo observamos que o fígado, foi um dos principais órgãos afetados pela exposição. Isso pode ser devido ao seu papel no metabolismo dos organismos, por se tornar um dos principais alvo do estresse oxidativo induzido pelo Pb (Matović et al., 2015). Nosso estudo mostrou que a exposição de *A. lituratus* ao Pb induziu aumento nos níveis de NO nos animais do grupo Pb em relação aos animais do grupo CTR. A presença do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) desencadeia uma série de reações, produzindo o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), um agente oxidante (Valez et al., 2013). Aumento nos níveis de radicais livres como NO e EROS geram um aumento na atividade de enzimas e outros fatores antioxidantes no tecido para se proteger de seus possíveis efeitos deletérios (Barbosa et al., 2010). Nosso estudo observou um aumento na atividade da SOD nos animais que receberam Pb. A SOD é uma das enzimas da linha de frente no combate a EROS, responsável por decompor radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Al-Megrin et al., 2020). Em conformidade com nossos estudos, alterações nos níveis de NO e na atividade da SOD foram observadas no fígado de ratos expostos a 20 mg/kg de acetato de Pb por injeção intraperitoneal, durante 14 dias (Albasher et al., 2020). Apesar do aumento da atividade da SOD, foi observado uma diminuição nos níveis da capacidade antioxidante total do fígado dos morcegos tratados com Pb. Este resultado indica comprometimento das demais defesas antioxidantes totais hepáticas. O aumento na atividade da SOD e diminuição nos níveis da capacidade antioxidante total não são contraditórios. A capacidade antioxidante total envolve uma série de outras enzimas e moléculas antioxidantes como GSH e α -tocoferol, que podem ter, junto com a SOD, atuado no combate aos radicais livres (Prior & Cao, 1999) oriundos da presença do Pb no tecido, mas atingiram seus estados de exaustão e diminuíram suas atividades.

As análises histológicas do fígado demonstraram danos importantes após a exposição ao Pb. Foi observado maior incidência de infiltrado inflamatório e congestão vascular nos animais do grupo Pb comparado aos animais do grupo CTR. E uma diminuição no diâmetro do núcleo dos hepatócitos dos animais do grupo Pb comparados com os animais do grupo CTR. A maior incidência de infiltrado inflamatório e congestão vascular, somado aos níveis mais elevados de NO, reforça que o tecido hepático dos animais do grupo Pb passava por um processo inflamatório. Durante processos inflamatórios é comum os vasos sanguíneos dilatarem para permitir uma maior migração de mediadores inflamatórios e células de defesa até as regiões possivelmente lesadas (Liu et al., 2012). Quando ativadas, pela presença de Pb, por exemplo, células de defesa como macrófagos secretam NO e aumentam os níveis desse radical tóxico para o tecido (Abdel Moneim, 2016). Em conformidade com nosso estudo, ratos expostos oralmente a 50 mg/kg de acetato de Pb durante 60 dias também apresentaram dilatação

de capilares sinusóides e maior incidência de infiltrados leucocitários no fígado (Abo-EL-Sooud et al., 2022). Codornas expostas oralmente a 50, 250, 500 e 1000 mg/kg de acetato de Pb durante 49 dias apresentaram diminuição na atividade enzimática da SOD, CAT e GST, e aumento nos níveis de MDA, sugerindo que exposições mais prolongadas podem prejudicar o sistema antioxidante e conseqüentemente o tecido. Dilatação de capilar sinusóide, vacuolização, congestão severa dos sinusóides e hepatócitos necróticos também foram observados no fígado (Kou et al., 2020). Se o processo inflamatório persistir por muito tempo ele pode estimular morte celular no tecido (Anderton et al., 2020). A diminuição no diâmetro do núcleo dos hepatócitos dos animais do grupo Pb pode ser indicativo de que as células estavam passando pelas primeiras etapas da série de alterações morfológicas que levam até a morte celular (Elmore, 2007; He et al., 2009). Tem sido mostrado que o Pb pode induzir fatores pró-inflamatórios que induzem morte celular (Abdel-Emam & Ali, 2022; Li et al., 2023).

O rim é outro importante órgão que ajuda na eliminação de contaminantes, e fica assim suscetível aos danos oriundos da presença desses no tecido (George et al., 2017). Neste órgão, foi observado aumento na atividade de GST nos animais do grupo Pb. A GST é parte de uma superfamília de enzimas que atua na desintoxicação celular e na prevenção de danos oxidativos (Hayes & Pulford, 1995; Tew & Townsend, 2012). Seu aumento pode indicar uma resposta adaptativa do tecido em resposta a presença de Pb. Não foram observadas alterações nos marcadores de estresse oxidativo como NO, MDA e PC, indicando que o sistema antioxidante, composto por inúmeras enzimas, agiu sobre possíveis EROS/ERNS para garantir a manutenção do estado redox do rim e evitar conseqüentes danos. Contudo, outros estudos relataram que ratos expostos, por injeção intraperitoneal, a 20 mg/kg de acetato de Pb por 5 dias (Abdel Moneim et al., 2011), por injeção intraperitoneal a 5 mg/kg de nitrato de Pb por 30 dias (Lakshmi et al., 2013) e oralmente a 50 mg/kg de nitrato de Pb por 50 dias (Sharma et al., 2010) tiveram a atividade enzimática da GST e os níveis de GSH diminuídos nos rins. Além disso, o tecido renal apresentou maior incidência de vasos sanguíneos dilatados nos morcegos do grupo Pb. Essa alteração pode indicar que a taxa de filtração glomerular estava aumentada a fim de eliminar o Pb do tecido. Uma eventual dilatação da arteríola aferente dos néfrons poderia permitir maior fluxo sanguíneo para a filtração glomerular e conseqüente secreção do xenobiótico (Leatherby et al., 2021). Reforçando nossos resultados, ratos expostos oralmente a 60 mg/kg de nitrato de Pb durante 30 dias apresentaram maior incidência de infiltrados inflamatórios e alta dilatação dos vasos sanguíneos (Bidanchi et al., 2022).

O testículo, ao ser atingido por metais pesados pode ter sua função reprodutiva comprometida (Al-Attar, 2011; Vukelić et al., 2023; Zhang et al., 2021). Nosso estudo observou

elevação no nível de MDA nos animais do grupo Pb. MDA é um dos produtos da peroxidação lipídica (Cui et al., 2018). Isso sugere que o Pb atingiu o tecido, aumentou a formação de EROS e induziu a peroxidação lipídica, que pode prejudicar a estrutura das membranas lipídicas das células testiculares (Kelainy et al., 2019; Sudjarwo et al., 2017). O testículo de *A. lituratus* não apresentou alterações nos demais marcadores, assim como relatado por outros autores, após exposição ao Pb. Contudo, o aumento nos níveis de MDA pode indicar que o Pb causou toxicidade no testículo. O estresse oxidativo é apontado como um dos principais mecanismos de toxicidade do Pb (Bidanchi et al., 2022). Diferentes estudos mostram que ratos intoxicados com acetato de Pb apresentaram alterações nos níveis de marcadores de danos oxidativos e na atividade das enzimas antioxidantes testiculares. Ratos expostos pela via intraperitoneal a 20 mg/kg de acetato de Pb por 3 semanas sofreram aumento nos níveis de MDA e NO e também diminuição nos níveis da atividade enzimática da SOD, CAT e GST (Udefa et al., 2020). A exposição oral a 20 mg/kg de acetato de Pb durante 56 dias também induziu aumento nos níveis dos marcadores NO e MDA e diminuição na atividade enzimática da SOD e GST em ratos (Hassan et al., 2019). Aumento nos níveis de MDA e diminuição na atividade enzimática da SOD, CAT e GST também foram reportadas em ratos expostos oralmente a 100 mg/kg de acetato de Pb durante 3 semanas (Elsheikh et al., 2020).

No encéfalo, o Pb é conhecido por ser neurotóxico por meio da indução de estresse oxidativo e leva conseqüentemente a neurodegeneração (Gautam & Flora, 2010; Khalil et al., 2018; Lalith Kumar & Muralidhara, 2014; Udi et al., 2022). Porém, nosso estudo não observou nenhuma alteração nos marcadores de danos oxidativos, na atividade das enzimas e na capacidade antioxidante total no encéfalo de *A. lituratus* expostos ao Pb nesta concentração ambientalmente relevante por 21 dias. Isso pode indicar uma resposta adaptativa do tecido, a presença do Pb, processo conhecido como eustresse. Esta resposta adaptativa tem uma importante função de defesa contra o estresse oxidativo. Neste processo de eustresse, os organismos respondem a presença de baixo nível de estressores, como toxinas, aumentando a expressão de enzimas antioxidantes e a capacidade de reparos (Niki, 2016).

No músculo peitoral, importante tecido para a capacidade de voo dos morcegos, a demanda energética é muito alta. Isso pode acarretar em níveis altos de EROS e ERNS, bem como atividade enzimática elevada para combater tais compostos (Cao & Jin, 2020). Contudo, a presença de contaminantes como Pb nos tecidos pode inibir a função das enzimas oxidantes (Gurer & Ercal, 2000). Pb é conhecido por se ligar a oligoelementos essenciais para a estrutura e atividade das enzimas, mudando suas conformações, inativando-as e impossibilitando dessa maneira suas respectivas funções (Lakshmi et al., 2013). Confirmando essa tendência, nossos

resultados mostraram uma diminuição na atividade enzimática da CAT nos animais do grupo Pb em relação aos animais do grupo CTR. CAT é uma enzima da linha de defesa antioxidante dos tecidos combatente de peróxido de hidrogênio, convertendo-o em água (H₂O) e oxigênio (O₂) (Ighodaro & Akinloye, 2018; Kouam et al., 2022). Assim, a diminuição na sua atividade pode resultar em aumentos nos níveis de danos em exposições mais prolongadas. Outros trabalhos também mostraram que a exposição oral ao acetato de Pb causou diminuição na atividade enzimática da CAT e de outras enzimas como SOD e GST no músculo cardíaco de ratos (Aksu et al., 2017; Bozdağ & Eraslan, 2020).

Pouca ou nenhuma alteração foi observada em relação ao balanço oxidante do rim, encéfalo e músculo. Isso sugere que morcegos frugívoros potencialmente possuem um forte sistema de reparação de danos oxidativos. Esse sistema envolve altos níveis de componentes antioxidantes, quando comparados a outros mamíferos (Schneeberger et al., 2013). Os morcegos frugívoros são capazes de produzir níveis mais elevados de enzimas antioxidantes endógenas somadas a antioxidantes exógenos, oriundos da sua dieta, baseada principalmente em folhas e frutos de espécies florestais, ricas em compostos antioxidantes, fornecendo assim uma forte barreira antioxidante para o animal, culminando em níveis mais baixos de estresse oxidativo em comparação com morcegos que possuem outros tipos de dieta (Schneeberger et al., 2014). Este fator parece ter contribuído para a proteção tecidual no rim, encéfalo e músculo de morcegos contra o excesso de EROS e ERNS geradas em função da exposição ao Pb.

5. CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo que avalia o efeito tóxico do Pb em morcegos frugívoros em cativeiro. Nós observamos aumento nos níveis de NO e da atividade enzimática da SOD e diminuição na capacidade antioxidante total no fígado, danos oxidativos no testículo com aumento nos níveis de MDA e alteração na atividade enzimática da GST no rim e da CAT no músculo peitoral de *Artibeus lituratus*. O Pb também induziu diminuição no diâmetro do núcleo de hepatócito, aumento da incidência de infiltrado inflamatório e congestão vascular no fígado e aumento da incidência de vasos sanguíneos dilatados no rim. Portanto, tais achados indicam que a dose avaliada de Pb é tóxica para morcegos frugívoros. Mais análises como hormonais e moleculares precisam ser feitas bem como estudos com outras doses para investigar as vias pelas quais o Pb causa toxicidade em morcegos Neotropicais com importante papel ecológico, especialmente em ambientes florestais ameaçados.

6. REFERÊNCIAS

- Abdel-Daim, M. M., Alkahtani, S., Almeer, R., & Albasher, G. (2020). Alleviation of lead acetate-induced nephrotoxicity by *Moringa oleifera* extract in rats: highlighting the antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic activities. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(27), 33723–33731. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09643-x>
- Abdel-Emam, R. A., & Ali, M. F. (2022). Effect of L-carnitine supplementation on lead acetate-induced liver cell apoptosis and inflammation: role of caspase-3 and glycogen synthase kinase-3 β enzymes. *Life Sciences*, 291(September 2021), 120277. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120277>
- Abdel Moneim, A. E. (2016). *Indigofera oblongifolia* prevents lead acetate-induced hepatotoxicity, oxidative stress, fibrosis and apoptosis in rats. *PLoS ONE*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158965>
- Abdel Moneim, A. E., Dkhil, M. A., & Al-Quraishy, S. (2011). The protective effect of flaxseed oil on lead acetate-induced renal toxicity in rats. *Journal of Hazardous Materials*, 194, 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.07.097>
- Abdelhamid, F. M., Mahgoub, H. A., & Ateya, A. I. (2020). Ameliorative effect of curcumin against lead acetate-induced hemato-biochemical alterations, hepatotoxicity, and testicular oxidative damage in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(10), 10950–10965. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07718-3>
- Abo-EL-Sooud, K., Abd-Elhakim, Y. M., Hashem, M. M. M., El-Metwally, A. E., Hassan, B. A., & El-Nou, H. H. M. (2022). Ameliorative effects of quercetin against hepatic toxicity of oral sub-chronic co-exposure to aluminum oxide nanoparticles and lead-acetate in male rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 737–747. <https://doi.org/10.1007/s00210-022-02351-y>

- Aksu, D. S., Saglam, Y. S., Yildirim, S., & Aksu, T. (2017). Effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice on kidney, liver, heart and testis histopathological changes, and the tissues lipid peroxidation and antioxidant status in lead acetate-treated rats. *Cellular and Molecular Biology*, 6(10), 33–43. <https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.10.5>
- Al-Attar, A. M. (2011). Antioxidant effect of vitamin E treatment on some heavy metals-induced renal and testicular injuries in male mice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(1), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.10.004>
- Al-Megrin, W. A., Alkhuriji, A. F., Yousef, A. O. S., Metwally, D. M., Habotta, O. A., Kassab, R. B., Moneim, A. E. A., & El-Khadragy, M. F. (2020). Antagonistic efficacy of luteolin against lead acetate exposure-associated with hepatotoxicity is mediated via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic activities. *Antioxidants*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/antiox9010010>
- Albasher, G., Al Kahtani, S., Alwahibi, M. S., & Almeer, R. (2020). Effect of *Moringa oleifera* Lam. methanolic extract on lead-induced oxidative stress-mediated hepatic damage and inflammation in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16), 19877–19887. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08525-6>
- Anderton, H., Wicks, I. P., & Silke, J. (2020). Cell death in chronic inflammation: breaking the cycle to treat rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology*, 16(9), 496–513. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0455-8>
- Barbosa, kiriaque B. F., Maria, N., Costa, B., De Cássia, R., Alfenas, G., Oliveira, S., Paula, D. E., Paula, V., Minim, R., & Bressan, J. (2010). Revista de Nutrição Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. In *Rev. Nutr* (Vol. 23, Issue 4).
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.

- Bidanchi, R. M., Lalrindika, L., Khushboo, M., Bhanushree, B., Dinata, R., Das, M., Nisa, N., Lalrinzuali, S., Manikandan, B., Saeed-Ahmed, L., Sanjeev, S., Murthy, M. K., Roy, V. K., & Gurusubramanian, G. (2022). Antioxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic action of ellagic acid against lead acetate induced testicular and hepato-renal oxidative damages and pathophysiological changes in male Long Evans rats. *Environmental Pollution*, 302(February), 119048. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119048>
- Bokara, K. K., Brown, E., McCormick, R., Yallapragada, P. R., Rajanna, S., & Bettaiya, R. (2008). Lead-induced increase in antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in developing rat brain. *BioMetals*, 21(1), 9–16. <https://doi.org/10.1007/s10534-007-9088-5>
- Bozdağ, M., & Eraslan, G. (2020). The effect of diosmin against lead exposure in rats‡. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393(4), 639–649. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01758-4>
- Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. In *Heliyon* (Vol. 6, Issue 9). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>
- Cao, T., & Jin, J. P. (2020). Evolution of Flight Muscle Contractility and Energetic Efficiency. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01038>
- Collin, S., Baskar, A., Geevarghese, D. M., Ali, M. N. V. S., Bahubali, P., Choudhary, R., Lvov, V., Tovar, G. I., Senatov, F., Koppala, S., & Swamiappan, S. (2022). Bioaccumulation of lead (Pb) and its effects in plants: A review. *Journal of Hazardous Materials Letters*, 3. <https://doi.org/10.1016/j.hazl.2022.100064>
- Cui, X., Gong, J., Han, H., He, L., Teng, Y., Tetley, T., Sinharay, R., Chung, K. F., Islam, T., Gilliland, F., Grady, S., Garshick, E., Li, Z., & Zhang, J. (2018). Relationship between free and total malondialdehyde, a well-established marker of oxidative stress, in various

types of human biospecimens. *Journal of Thoracic Disease*, *10*(5), 3088–3197.

<https://doi.org/10.21037/jtd.2018.05.92>

de Souza, M. B., de Souza Santos, L. R., Borges, R. E., Nunes, H. F., Vieira, T. B., Pacheco, S. M., & de Melo e Silva, D. (2020). Current Status of Ecotoxicological Studies of Bats in Brazil. In *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 104, Issue 4, pp. 393–399). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02794-0>

Dieterich, S., Bieligk, 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*(1), 33–39. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.1.33>

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Elsheikh, N. A. H., Omer, N. A., Yi-Ru, W., Mei-Qian, K., Ilyas, A., Abdurahim, Y., & Wang, G. L. (2020). Protective effect of betaine against lead-induced testicular toxicity in male mice. *Andrologia*, *52*(7). <https://doi.org/10.1111/and.13600>

Gautam, P., & Flora, S. J. S. (2010). Oral supplementation of gossypin during lead exposure protects alteration in heme synthesis pathway and brain oxidative stress in rats. *Nutrition*, *26*(5), 563–570. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.06.008>

George, B., You, D., Joy, M. S., & Aleksunes, L. M. (2017). Xenobiotic transporters and kidney injury. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 116, pp. 73–91). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.01.005>

Gurer, H., & Ercal, N. (2000). Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radical Biology and Medicine*, *29*(10), 927–945.

[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00413-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00413-5)

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, *249*(22), 7130–7139. <https://doi.org/10.1016/s0021->

9258(19)42083-8

- Hadwan, M. H., & Abed, H. N. (2016). Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in Brief*, *6*, 194–199.
<https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.12.012>
- Hassan, E., El-Neweshy, M., Hassan, M., & Noreldin, A. (2019). Thymoquinone attenuates testicular and spermatotoxicity following subchronic lead exposure in male rats: Possible mechanisms are involved. *Life Sciences*, *230*, 132–140.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.067>
- Hayes, J. D., & Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part i. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *30*(6), 445–520. <https://doi.org/10.3109/10409239509083491>
- He, B., Lu, N., & Zhou, Z. (2009). Cellular and Nuclear Degradation during Apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, *21*, 900–912. <https://doi.org/10.1038/nature08365>.Reconstructing
- Hernout, B. V., Arnold, K. E., McClean, C. J., Walls, M., Baxter, M., & Boxall, A. B. A. (2016). A national level assessment of metal contamination in bats. *Environmental Pollution*, *214*, 847–858. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.079>
- Hou, G., Surhio, M. M., Ye, H., Gao, X., Ye, Z., Li, J., & Ye, M. (2019). Protective effects of a Lachnum polysaccharide against liver and kidney injury induced by lead exposure in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, *124*, 716–723.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.133>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, *54*(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>

- Ilesanmi, O. B., Adeogun, E. F., Odewale, T. T., & Chikere, B. (2022). Lead exposure-induced changes in hematology and biomarkers of hepatic injury: protective role of Trévo™ supplement. *Environmental Health and Toxicology*, *37*(2).
<https://doi.org/10.5620/eaht.2022007>
- Javorac, D., Tatović, S., Anđelković, M., Repić, A., Baralić, K., Djordjevic, A. B., Mihajlović, M., Stevuljević, J. K., Đukić-Ćosić, D., Ćurčić, M., Antonijević, B., & Bulat, Z. (2022). Low-lead doses induce oxidative damage in cardiac tissue: Subacute toxicity study in Wistar rats and Benchmark dose modelling. *Food and Chemical Toxicology*, *161*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112825>
- Jie, X., Yao, Z., Wang, C., Qiu, D., Chen, Y., Zhang, Y., Ma, B., & Gao, W. (2022). Progress in Waste Lead Paste Recycling Technology from Spent Lead–Acid Battery in China. In *Journal of Sustainable Metallurgy* (Vol. 8, Issue 3, pp. 978–993). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s40831-022-00576-y>
- Kelainy, E. G., Laila, I. M. I., & Ibrahim, S. R. (2019). *The effect of ferulic acid against lead-induced oxidative stress and DNA damage in kidney and testes of rats*.
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-06099-6/Published>
- Khalil, S. R., Khalifa, H. A., Abdel-Motal, S. M., Mohammed, H. H., Elewa, Y. H. A., & Mahmoud, H. A. (2018). Spirulina platensis attenuates the associated neurobehavioral and inflammatory response impairments in rats exposed to lead acetate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *157*, 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.068>
- Kou, H., Ya, J., Gao, X., & Zhao, H. (2020). The effects of chronic lead exposure on the liver of female Japanese quail (*Coturnix japonica*): Histopathological damages, oxidative stress and AMP-activated protein kinase based lipid metabolism disorder. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *190*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110055>
- Kouam, A. F., Masso, M., Kouoh, F. E., Fifen, R., Njingou, I., Tchana, A. N., Njayou, F. N.,

- & Moundipa, P. F. (2022). Hydro-ethanolic extract of *Khaya grandifoliola* attenuates heavy metals-induced hepato-renal injury in rats by reducing oxidative stress and metals-bioaccumulation. *Heliyon*, 8(11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11685>
- Kunz, T. H., de Torrez, E. B., Bauer, D., Lobova, T., & Fleming, T. H. (2011). Ecosystem services provided by bats. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1223, Issue 1, pp. 1–38). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06004.x>
- Lacerda, D., Pestana, I. A., Santos Vergilio, C. dos, & de Rezende, C. E. (2023). Global decrease in blood lead concentrations due to the removal of leaded gasoline. In *Chemosphere* (Vol. 324). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138207>
- Lakshmi, B. V. S., Sudhakar, M., & Aparna, M. (2013). Protective potential of Black grapes against lead induced oxidative stress in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35(3), 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.01.008>
- Lalith Kumar, V., & Muralidhara. (2014). Ameliorative Effects of Ferulic Acid Against Lead Acetate-Induced Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunctions and Toxicity in Prepubertal Rat Brain. *Neurochemical Research*, 39(12), 2501–2515. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1451-7>
- Landrigan, P. J., Boffetta, P., & Apostoli, P. (2000). The reproductive toxicity and carcinogenicity of lead: A critical review. *American Journal of Industrial Medicine*, 38(3), 231–243. [https://doi.org/10.1002/1097-0274\(200009\)38:3<231::AID-AJIM2>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1097-0274(200009)38:3<231::AID-AJIM2>3.0.CO;2-O)
- Leatherby, R. J., Theodorou, C., & Dhanda, R. (2021). Renal physiology: blood flow, glomerular filtration and plasma clearance. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 22(7), 439–442. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2021.05.003>

- Li, Y., Cai, W., Ai, Z., Xue, C., Cao, R., & Dong, N. (2023). Protective effects of sinomenine hydrochloride on lead-induced oxidative stress, inflammation, and apoptosis in mouse liver. *Environmental Science and Pollution Research*, *30*(3), 7510–7521. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22386-1>
- Liu, C. M., Sun, Y. Z., Sun, J. M., Ma, J. Q., & Cheng, C. (2012). Protective role of quercetin against lead-induced inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF- κ B pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1820*(10), 1693–1703. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.06.011>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Matović, V., Buha, A., Dukić-Ćosić, D., & Bulat, Z. (2015). Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food and Chemical Toxicology*, *78*, 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.011>
- Nakazato, R. K., Lourenço, I. S., Esposito, M. P., Lima, M. E. L., Ferreira, M. L., Campos, R. de O. A., Rinaldi, M. C. S., & Domingos, M. (2021). Trace metals at the tree-litter-soil-interface in Brazilian Atlantic Forest plots surrounded by sources of air pollution. *Environmental Pollution*, *268*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115797>
- Niki, E. (2016). Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *595*, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.017>
- Parolin, L. C., Lacher, T. E., Bianconi, G. V., & Mikich, S. B. (2021). Frugivorous bats as facilitators of natural regeneration in degraded habitats: A potential global tool. In *Acta Oecologica* (Vol. 111). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2021.103748>
- Ponce-Canchihuamán, J. C., Pérez-Méndez, O., Hernández-Muñoz, R., Torres-Durán, P. V., & Juárez-Oropeza, M. A. (2010). *Protective effects of Spirulina maxima on hyperlipidemia*

and oxidative-stress induced by lead acetate in the liver and kidney.

<http://www.lipidworld.com/content/9/1/35>

Prior, R. L., & Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11–12), 1173–1181.

[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00203-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00203-8)

Schneeberger, K., Czirják, G. Á., & Voigt, C. C. (2014). Frugivory is associated with low measures of plasma oxidative stress and high antioxidant concentration in free-ranging bats. *Naturwissenschaften*, 101(4), 285–290. <https://doi.org/10.1007/s00114-014-1155-5>

Schneeberger, K., Czirjk, G., & Voigt, C. C. (2013). Inflammatory challenge increases measures of oxidative stress in a free-ranging, long-lived mammal. *Journal of Experimental Biology*, 216(24), 4514–4519. <https://doi.org/10.1242/jeb.090837>

Sharma, V., Sharma, A., & Kansal, L. (2010). The effect of oral administration of *Allium sativum* extracts on lead nitrate induced toxicity in male mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 928–936. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.002>

Sudjarwo, S., Sudjarwo, G., & Koerniasari, K. (2017). Protective effect of curcumin on lead acetate-induced testicular toxicity in Wistar rats. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 12(5), 381–390. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.213983>

Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. In *EXS* (Vol. 101, pp. 133–164).

https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6

Tew, K. D., & Townsend, D. M. (2012). Glutathione-S-transferases as determinants of cell survival and death. *Antioxidants and Redox Signaling*, 17(12), 1728–1737.

<https://doi.org/10.1089/ars.2012.4640>

Tsikis, 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. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 851(1–2), 51–70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>
- Udefa, A. L., Amama, E. A., Archibong, E. A., Nwangwa, J. N., Adama, S., Inyang, V. U., Inyaka, G. U. uti, Aju, G. J., Okpa, S., & Inah, I. O. (2020). Antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of hydro-ethanolic extract of *Cyperus esculentus* L. (tigernut) on lead acetate-induced testicular dysfunction in Wistar rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 129(July). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110491>
- Udi, O. A., Oyem, J. C., Ebeye, O. A., Chris-Ozoko, L. E., Igbigbi, P. S., & Olannye, D. U. (2022). The effects of aqueous extract of *ocimum gratissimum* on the cerebellum of male wistar rats challenged by lead acetate. *Clinical Nutrition Open Science*, 44, 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.nutos.2022.06.001>
- Valez, V., Cassina, A., Batinic-Haberle, I., Kalyanaraman, B., Ferrer-Sueta, G., & Radi, R. (2013). Peroxynitrite formation in nitric oxide-exposed submitochondrial particles: Detection, oxidative damage and catalytic removal by Mn-porphyrins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 529(1), 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.10.012>
- Vormittag, E., Saldiva, P., Anastacio, A., & Barbosa, F. (2021). High levels of metals/metalloids in blood and urine of residents living in the area affected by the dam failing in Barra Longa, District, Brazil: A preliminary human biomonitoring study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 83. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103566>
- Vukelić, D., Djordjevic, A. B., Anđelković, M., Repić, A., Baralić, K., Ćurčić, M., Đukić-Ćosić, D., Boričić, N., Antonijević, B., & Bulat, Z. (2023). Derivation of benchmark doses for male reproductive toxicity in a subacute low-level Pb exposure model in rats. *Toxicology Letters*, 375(January), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2023.01.001>
- Walker, L. A., Simpson, V. R., Rockett, L., Wienburg, C. L., & Shore, R. F. (2007). Heavy

- metal contamination in bats in Britain. *Environmental Pollution*, 148(2), 483–490.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.12.006>
- Wang, J., Yang, Z., Lin, L., Zhao, Z., Liu, Z., & Liu, X. (2012). Protective effect of naringenin against lead-induced oxidative stress in rats. *Biological Trace Element Research*, 146(3), 354–359. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9268-6>
- Zebral, Y. D., Costa, P. G., de Souza, M. M., & Bianchini, A. (2022). Avian blood and feathers as biological tools to track impacts from trace-metals: Bioaccumulation data from the biggest environmental disaster in Brazilian history. *Science of the Total Environment*, 807. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151077>
- Zhang, Z., Yu, J., Xie, J., Liu, D., Fan, Y., Ma, H., Wang, C., & Hong, Z. (2021). Improvement roles of zinc supplementation in low dose lead induced testicular damage and glycolytic inhibition in mice. *Toxicology*, 462(August), 152933.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152933>
- Zocche, J. J., Leffa, D. D., Damiani, A. P., Carvalho, F., Ávila Mendonça, R., dos Santos, C. E. I., Appel Bouffleur, L., Ferraz Dias, J., & de Andrade, V. M. (2010). Heavy metals and DNA damage in blood cells of insectivore bats in coal mining areas of Catarinense coal basin, Brazil. *Environmental Research*, 110(7), 684–691.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.06.003>
- Zukal, J., Pikula, J., & Bandouchova, H. (2015). Bats as bioindicators of heavy metal pollution: History and prospect. In *Mammalian Biology* (Vol. 80, Issue 3, pp. 220–227). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2015.01.001>