

Exposição Crônica ao Inseticida Piretroide Deltametrina: Implicações Hepáticas e Energéticas em Morcego Frugívoro *Artibeus lituratus*

Renata Maria Pereira de Freitas¹, Ariane Maria Rizzoli Moreno², Ana Carolina Neves², Mariana Moraes de Castro², Mariella Bontempo Freitas² e Jerusa Maria de Oliveira^{3*}

Recebido em 09/01/2023 – Aceito em 30/05/2023

¹ Universidade Federal de Goiás/UFG. Brasil. <rempfreitas@gmail.com>.

² Universidade Federal de Viçosa/UFV. Brasil. <riane.rm@hotmail.com, neves_anacarol@hotmail.com, marianammcbio@gmail.com, mariellafreitas@gmail.com>.

³ Universidade Federal de Alagoas/UFAL, Rede Nordeste de Biotecnologia. Brasil. <jerusa.amorim@iqb.ufal.br>.

* Contato principal.

RESUMO – Inseticidas piretroides foram incorporados no mercado como alternativa menos tóxica para animais não alvo. No entanto, a deltametrina, um inseticida dessa classe, é conhecida por causar toxicidade em exposição aguda e crônica em diferentes animais. Os morcegos são animais não alvo que estão constantemente expostos a pesticidas durante o forrageio e isso pode impactar sua sobrevivência. Objetivou-se avaliar o efeito da exposição crônica à deltametrina no estado redox e metabolismo energético de morcegos frugívoros da espécie *Artibeus lituratus*. Para isso os morcegos foram coletados (n=12) e separados em: grupo controle (Controle; n=6), alimentado com frutos não tratados; grupo deltametrina (DM; n = 6), alimentado com frutos tratados com deltametrina na concentração 1.00 mL/L mais espalhante adesivo (0,015 g/L). Após um período de exposição crônica (35 dias), o estado redox do fígado e rim, as alterações histológicas no fígado, a concentração de glicose e as reservas energéticas foram analisados. A exposição a doses comerciais de deltametrina induziu estresse oxidativo e alterações morfológicas no fígado, além de causar hipoglicemia e reduzir as reservas energéticas dos morcegos. Considerando que os morcegos estão expostos naturalmente aos pesticidas durante o forrageio, o impacto dessa exposição pode alterar as reservas energéticas e induzir alterações no funcionamento normal do fígado, prejudicando a sobrevivência desses animais e, conseqüentemente, os serviços ecossistêmicos prestados por eles.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; metabolismo energético; glicose.

Chronic Exposure to the Pyrethroid Insecticide Deltamethrin: Liver and Energetic Implications in Fruit Bats *Artibeus lituratus*

ABSTRACT – Pyrethroid insecticides have been incorporated into the market as a less toxic alternative for non-target animals. However, deltamethrin, an insecticide of this class, is known to cause acute and chronic exposure toxicity in different animals. Bats are non-target animals that are constantly exposed to pesticides while foraging and this can impact their survival. The objective was to evaluate the effect of chronic exposure to deltamethrin on the redox state and energy metabolism of fruit bats of the species *Artibeus lituratus*. For this, the bats were collected (n=12) and separated into: control group (Control; n=6), fed with untreated fruits; Deltamethrin group (DM; n = 6), fed with fruits treated with deltamethrin at a concentration of 1.00 mL/L plus adhesive spreader (0.015 g/L). After a period of chronic exposure (35 days), the redox status of the liver and kidney, histological changes in the liver, glucose concentration and energy reserves were analyzed. Exposure to commercial doses of deltamethrin induced oxidative stress and morphological changes in the liver, in addition to causing hypoglycemia and reducing energy reserves in bats. Considering that bats are naturally exposed to pesticides during foraging, the impact of this exposure can alter energy reserves and induce changes in the normal functioning of the liver, impairing the survival of these animals, and consequently the ecosystem services provided by them.

Keywords: Oxidative stress; energy metabolism; glucose.

Exposição Crônica al Insecticida Piretroide Deltametrina: Implicaciones Hepáticas y Energéticas en Murciélago Frugívoro *Artibeus lituratus*

RESUMEN – Los insecticidas piretroides se han incorporado al mercado como una alternativa menos tóxica para los animales no objetivo. Sin embargo, se sabe que la deltametrina, un insecticida de esta clase, causa toxicidad por exposición aguda y crónica en diferentes animales. Los murciélagos son animales no objetivo que están constantemente expuestos a pesticidas mientras se alimentan y esto puede afectar su supervivencia. El objetivo fue evaluar el efecto de la exposición crónica a deltametrina sobre el estado redox y el metabolismo energético de murciélagos frugívoros de la especie *Artibeus lituratus*. Para ello, se recolectaron los murciélagos (n=12) y se separaron en: grupo control (Control; n=6), alimentados con frutos sin tratar; Grupo de deltametrina (DM; n = 6), alimentado con frutos tratados con deltametrina a una concentración de 1,00 mL/L más aplicador adhesivo (0,015 g/L). Después de un período de exposición crónica (35 días), se analizó el estado redox del hígado y el riñón, los cambios histológicos en el hígado, la concentración de glucosa y las reservas de energía. La exposición a dosis comerciales de deltametrina indujo estrés oxidativo y cambios morfológicos en el hígado, además de causar hipoglucemia y reducir las reservas de energía en murciélagos. Teniendo en cuenta que los murciélagos están naturalmente expuestos a pesticidas durante la búsqueda de alimento, el impacto de esta exposición puede alterar las reservas de energía e inducir cambios en el funcionamiento normal del hígado, perjudicando la supervivencia de estos animales y, en consecuencia, los servicios ecosistémicos que brindan.

Palabras clave: Estrés oxidativo; metabolismo energético; glucosa.

Introdução

Os inseticidas piretroides surgiram como alternativa ao uso dos inseticidas mais tóxicos, por serem de maior eficácia e considerados de baixa toxicidade (Guardiola et al., 2014). A deltametrina (DM) é um importante inseticida piretroide que, devido à sua alta eficácia contra insetos alvos e baixa persistência no solo (Dietz et al., 2009; Li et al., 2019) tem sido amplamente utilizada em diversos cultivos pelo mundo, além do seu uso contra carrapatos, baratas, moscas e mosquitos (Davies et al., 2012 ; Liao et al., 2018). No entanto, é reconhecido que a presença de pesticidas no meio ambiente pode vir a causar efeitos letais e subletais em organismos não alvos (Desneux et al., 2007; Royauté et al., 2015; Freitas et al., 2021). Em ratos, a dose letal (LD₅₀) pode variar de 50 a 500 mg/kg (Santos et al., 2011); já em peixes amazônicos, a concentração letal (CL₅₀) pode variar de 6,69 a 183,51 µg/L, dependendo da espécie (de Souza et al., 2020).

Ações tóxicas da deltametrina, em concentrações baixas, já foram relatadas na literatura, como a indução de estresse oxidativo, o aumento das transaminases (alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase) plasmáticas (Amin e Hashem, 2012) e as alterações morfológicas nos hepatócitos de peixes

(Yildirim et al., 2006; Yang et al., 2020). Em camundongos e ratos, a formulação comercial de deltametrina causa efeitos genotóxicos (Chauhan et al., 2007), induz estresse oxidativo e é nefrotóxico e hepatotóxico (Chargui et al., 2012). A deltametrina também causa imunossupressão em peixes (Siwicki et al., 2010) e salamandras (Froese et al., 2009).

Os morcegos podem ser expostos a pesticidas durante o forrageamento, através da alimentação, ingestão de água contaminada e até mesmo por exposição de contato (Stahlschmidt et al., 2017). Declínios nas populações de morcegos em várias partes do mundo estão sendo associados à exposição a pesticidas (Bennett e Thies, 2007). A saúde dos morcegos é de grande importância, pois são animais que estão relacionados ao equilíbrio do ecossistema. Eles auxiliam na polinização, no controle de insetos praga, na dispersão de sementes e regeneração de florestas (Kasso et al., 2013).

A espécie *Artibeus lituratus*, pertencente à família Phyllostomidae, possui hábito alimentar predominantemente frugívoro e por isso se destaca como um bom dispersor de sementes (Melo et al., 2009; Nunes et al., 2017), sendo a maior parte dessas sementes de plantas pioneiras que contribuem para regeneração de áreas degradadas.

Em uma noite de forrageio, eles podem dispersar aproximadamente 14 mil sementes com potencial de germinação/ ha⁻¹ dia⁻¹, (Bianconi et al., 2007; Martins et al., 2014). Estudos de ecotoxicologia são realizados com essa espécie, uma vez que elas são de grande porte e apresentam dieta variada e boa adaptação em cativeiro (Brinati et al., 2016; Oliveira et al., 2018; Freitas et al., 2021).

Portanto, estudar os efeitos letais e subletais de pesticidas em morcegos é crucial para entender os riscos da exposição e traçar ações de conservação eficazes (de Souza et al., 2020; Oliveira et al., 2020; Torquetti et al., 2021). Neste sentido, o estudo do estado redox e do metabolismo energético são ferramentas relevantes como biomarcadores de efeito da exposição a pesticidas. A toxicidade de pesticidas piretroides está intimamente ligada à indução do estresse oxidativo (Yang et al., 2020; Oliveira et al., 2018). O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a eficiência de remoção das mesmas, na qual a geração é excessiva e não é controlada que consequentemente gera danos celulares (diestress) (Amoretti et al., 2002; Agrawal & Sharma, 2010). Níveis elevados de espécies reativas causam a oxidação de proteínas e lipídeos e danos no DNA (Barbosa et al., 2010).

Considerando os vários efeitos tóxicos da DM, a diversidade e a importância dos morcegos, observamos que a relação desse inseticida com esses animais ainda precisa ser conhecida e explorada. Sendo assim, objetivou-se avaliar os efeitos da intoxicação crônica a baixas concentrações da formulação comercial do inseticida deltametrina, em morcegos frugívoros da espécie *Artibeus lituratus*.

Material e Métodos

Químicos

A formulação comercial do piretroide do inseticida deltametrina [(s)-a-ciano-3-fenoxibenzil(R1-R2)-3-(2,2 dibromovinil)-2,2 dimetilciclo-propancarboxilato] (Decis®) foi obtida do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. O espalhador adesivo Will Fix (ácido dodecilbenzenossulfônico, 30 g/L, 3% m/v) é utilizado por agricultores para aumentar a eficiência de inseticidas e herbicidas, e foi adicionado aos tratamentos.

Desenho experimental e animais

Morcegos machos adultos da espécie *Artibeus lituratus* (n=12) foram capturados com redes de neblina na Mata do Paraíso Campus UFV (MG) no sudoeste do Brasil. Os morcegos (61-91 g de peso corporal) foram identificados com a Chave para Identificação de Morcegos Brasileiros (Vizotto e Taddei, 1973), separados e mantidos em gaiolas individuais de aço (45 x 22 cm) sob temperatura natural e ciclos de luz. Os morcegos foram alimentados com mamão (*Carica papaya*) e, após dois dias em cativeiro, foram divididos aleatoriamente em dois grupos com seis morcegos cada: grupo controle, alimentado com frutos não tratados (Controle); grupo deltametrina (DM), alimentado com frutos tratados com deltametrina a 1,00 mL/L mais espalhador adesivo (0,015 g/L). Os frutos foram imersos em um recipiente com calda de deltametrina, secos, cortados em duas partes (aproximadamente 200 g cada) e oferecidos aos animais durante o período de estudo de 35 dias com a casca voltada para cima, para simular a situação encontrada pelos morcegos na natureza. Os animais foram alimentados às 18h e receberam água *ad libitum*, disponível durante todo tratamento. Após 35 dias de tratamento, os morcegos foram eutanasiados, pesados e tiveram o fígado e o rim removidos e congelados a -80°C. O sangue foi coletado em tubos contendo heparina. Músculo peitoral, tecido adiposo e carcaça também foram utilizados para mensurar as reservas energéticas. Após a pesagem corporal, foi mensurado o índice hepatossomático (IHS = peso do tecido/peso corporal X 100). Todas as capturas, o transporte e os procedimentos experimentais foram realizados conforme instruções e autorização do IBAMA (Processo n° 30904-1).

Análise da atividade antioxidante

Preparação das amostras

Uma amostra de rins e fígado (100 mg) foi homogeneizada em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,4 (500 µL) e centrifugada (12.000 rpm a 4°C por 10 minutos) para determinações das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona S-transferase (GST), juntamente com produtos de peroxidação lipídica.

Enzimas antioxidantes

A atividade de CAT foi medida pela diminuição da taxa de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (10 mmol/L) em um espectrofotômetro a 240 nm, registrado em intervalos de 60s (Aebi, 1984), em uma cubeta contendo alíquotas de sobrenadante, 50 mM tampão de fosfato de potássio pH 7,0 e peróxido de hidrogênio 10 mM recém-preparado. A atividade da catalase foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$.

A atividade de SOD foi medida usando um leitor de ELISA a 570 nm (Dieterich et al., modificado, 2000) com base na capacidade desta enzima de catalisar a reação de dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, assim, diminuir a taxa de auto-oxidação de pirogalol. Alíquotas de sobrenadante foram adicionadas a um poço contendo um tampão fosfato de potássio 50 mmol/L pH 7,0, 6 μL de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), ácido pirogálico (1,25 mM) e 150 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A atividade de SOD foi expressa em nmol/g.

A atividade de GST foi medida através da formação do conjugado GSH, 2,4-dinitrobenzeno, e estimada pela mudança de absorvância a 340 nm por 60 segundos em uma cubeta contendo tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (0,1 mol/L), glutationa reduzida (GSH) (0,1 mol/L) e alíquotas de sobrenadante. A formação do conjugado ocorre espontaneamente no substrato, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em uma reação não enzimática, e é acelerada pela atividade das enzimas GST. Uma unidade (U) da atividade enzimática é a quantidade de enzima GST que forma 1 mol/L de conjugados de GSH, 2,4-dinitrobenzeno, por minuto. O coeficiente de extinção molar de CDNB a 340 nm é 9,6/mM/cm, que foi utilizado para os cálculos (Habig et al., 1976). A atividade de GST foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$.

Determinação do produto da peroxidação lipídica

As substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico são principalmente produtos da peroxidação lipídica, e o malondialdeído (MDA) é um importante marcador para monitorar a taxa de peroxidação lipídica. Para tanto, o sobrenadante foi centrifugado, ao qual foi adicionada solução de

substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) [15% ácido tricloroacético (TCA), 0,375% ácido tiobarbitúrico e 0,25 mol/L HCl] em banho-maria a 90°C por 40 min, resfriado, e centrifugado a 5000 rpm. O sobrenadante foi usado para estimativa em 535 nm em um espectrofotômetro (Buege e Aust, 1978). O coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5/\text{Mcm}$ foi utilizado para o cálculo e os resultados foram expressos em MDA nmol/g.

Análises histológicas

Porções de fígado (n=5) foram coletadas e imediatamente fixadas em Carson-Formalin (0,9%) por 24 horas e processadas histologicamente com inclusão de glicol metacrilato (Historesin®, Leica). Um micrótomo rotativo foi utilizado para cortes histológicos semi-sequenciais com 3 μm de espessura. Em seguida, as preparações foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1% e testadas histoquimicamente com coloração de ácido periódico-Schiff (PAS). Após isso, as lâminas foram montadas com Entellan® (Merck). As análises foram realizadas utilizando as imagens digitais de campos aleatórios no fotomicroscópio Olympus BX50 (40x e 100x) e analisadas no programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Uma grade com 266 interseções foi colocada nas imagens, totalizando 2660 pontos por animal. Pontos coincidentes sob o capilar sinusoide, hepatócitos, macrófagos, vacúolos irregulares e regulares foram contados. A análise do diâmetro nuclear foi feita em 50 núcleos por animal. Todos os resultados das análises histológicas foram expressos em porcentagem.

Determinação de glicose plasmática

Para determinação da glicose plasmática, o sangue foi coletado em tubos heparinizados e imediatamente centrifugado (2000 rpm/15 minutos) para separação do plasma, sendo posteriormente armazenado a -20°C. A glicose plasmática foi determinada pelo método enzimático oxidase-glicose - GLUCOX 500 (Dole Reagents).

Determinação do glicogênio hepático e muscular

Para as determinações de glicogênio hepático e do músculo peitoral, uma porção de



aproximadamente 200 mg desses tecidos foi colocada em tubo de fundo cônico contendo KOH 30% e hidrolisada em banho-maria fervente por 1 hora, acrescentando 5 gotas de Na_2SO_4 saturado ao retirar do banho. Os tubos contendo essa solução foram centrifugados (2000 rpm/10 minutos), sendo descartado o sobrenadante. A dosagem do glicogênio das amostras foi realizada pelo método colorimétrico descrito por (Sjörgren et al., 1938) e quantificado em espectrofotômetro ($\lambda = 620$). A dextrose foi usada para calibração do ensaio e os resultados foram expressos em μmol glicosil-unidades/g.

Determinação da proteína tecidual

Para a determinação da proteína total hepática e muscular, uma porção conhecida do fígado e do músculo peitoral foi homogeneizada com solução fisiológica e tampão fosfato e mensurada segundo o método do kit colorimétrico do Kit BCA Protein assay Reagent (BCA-PIERCE).

Determinação dos lipídios totais

Uma porção conhecida (~200 mg) do fígado, tecido adiposo e muscular (músculo peitoral) foram homogeneizadas com 25 mL de uma solução de clorofórmio-metanol (2:1 mL) segundo Folch et al. (1957). Após a filtração e separação das fases por adição de salina, uma alíquota da fase clorofórmica (10 mL) foi utilizada para determinação dos lipídios totais por método gravimétrico.

Ácidos graxos da carcaça

Os ácidos graxos totais da carcaça foram determinados após a remoção do trato digestivo

da porção terminal do esôfago até o ânus, os rins e os órgãos reprodutores. As carcaças foram pesadas e digeridas em 200 mL de KOH 6 N por 4 a 6 dias, e posteriormente filtradas. Ao filtrado foi adicionado igual volume de álcool absoluto, resultando em uma solução de 50% KOH-etanol (v/v). Uma amostra dessa solução foi lavada três vezes com 40 mL de éter de petróleo em um béquer (100 mL), e a fase superior foi aspirada através de uma bomba de vácuo. A solução foi acidificada com 5 mL de H_2SO_4 e submetida à extração por clorofórmio, com três vezes o volume final. Uma alíquota de 50 mL dessa fase foi utilizada para determinar o teor de ácidos graxos totais pelo método gravimétrico (Folch et al., 1957).

Análises estatísticas

Para verificar se os dados tinham distribuição normal, eles foram submetidos ao teste de homogeneidade de variância pelo teste Shapiro-Wilk. As médias dos dados paramétricos entre os grupos foram comparadas com o teste *t* ao nível de significância de $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados com o software estatístico GraphPad Prism 5.01[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

Resultados

Peso corporal e índice de órgãos

Nenhum dos animais tratados com deltametrina na dose descrita apresentou sinais de morbidade ou mortalidade durante os estudos (Tabela 1). O peso corporal e o peso renal dos animais do grupo tratado com deltametrina foi menor em relação aos animais do grupo controle.

Tabela 1 – Dados biológicos de morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* tratados com deltametrina durante 35 dias.

Variáveis	Controle	Deltametrina
Peso corporal (g)	77,16 ± 2,39	65,66 ± 3,19*
Peso do fígado (g)	3,80 ± 0,39	2,79 ± 0,314
Peso do rim (g)	0,50 ± 0,03	0,35 ± 0,01*
Índice hepatossomático	4,93 ± 0,46	4,20 ± 0,29

Os valores são expressos como média ± EPM (n = 6). Comparação entre controle e deltametrina (* p < 0,05).



Enzimas antioxidantes e produtos de estresse oxidativo

As atividades de CAT e SOD no fígado dos animais tratados com deltametrina foram significativamente menores quando comparadas aos animais não tratados (Figura 1). As atividades de GST no fígado dos animais tratados com

deltametrina foram significativamente maiores quando comparadas aos animais não tratados (Figura 1). Em comparação com os animais controle, os níveis de peroxidação lipídica hepática foram aumentados nos animais tratados com deltametrina. No entanto, no rim de animais tratados com deltametrina nenhuma alteração foi significativa (Figura 1).

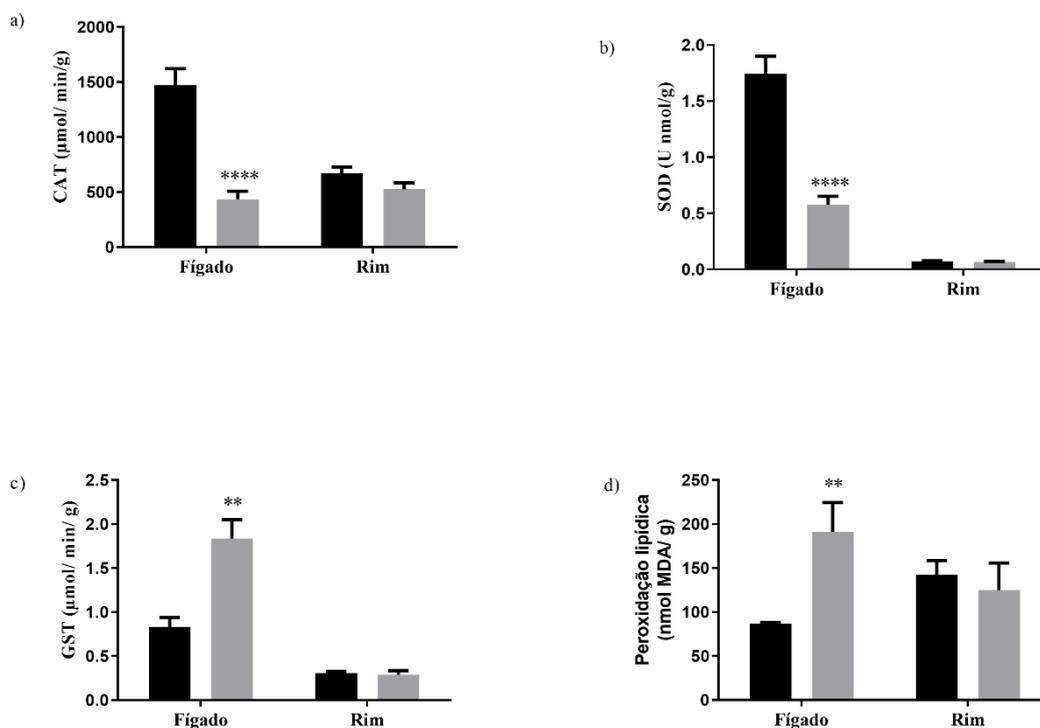


Figura 1 – Atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona S-transferase (GST) e níveis de malondialdeído no fígado e rim de morcegos (*Artibeus lituratus*) controle e tratados com deltametrina durante 35 dias. Os valores são média \pm EPM. (n = 6). Comparação entre controle e deltametrina (****p < 0,0001) (**p < 0,002).

Parâmetros histológicos

O fígado mostrou uma arquitetura tecidual semelhante à descrita para os mamíferos, com lóbulos e cordões hepáticos e vasos sanguíneos em arranjo regular. Os hepatócitos do grupo de animais tratados com deltametrina apresentaram gotículas lipídicas visíveis de diferentes tamanhos no citoplasma, sugerindo acúmulo de lipídios.

As células hepáticas dos animais tratados com deltametrina apresentaram diminuição da

área nuclear e do volume, aproximadamente 11% em relação ao grupo controle. A proporção de hepatócito, capilar sinusoide, macrófago, tecido conjuntivo, vacúolo circular e vacúolo irregular não foram diferentes do grupo controle (Tabela 2).

Concentração de glicose plasmática

A análise da concentração plasmática de glicose mostrou diminuição (p < 0,0001) nos animais que ingeriram deltametrina (Figura 2).

Tabela 2 – Valores morfométricos de hepatócitos em fígado de morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* tratados com deltametrina durante 35 dias.

	Controle	Deltametrina
Área Nuclear	45,94 ± 1,91	38,86 ± 1,51*
Volume (μm^3)	234,90 ± 14,43	182,68 ± 10,52*
Hepatócito (%)	6,35 ± 0,43	7,44 ± 0,38
Capilar sinusoide (%)	0,57 ± 0,11	0,55 ± 0,09
Célula de Kupffer (%)	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,04
Tecido conjuntivo (%)	0,08 ± 0,03	0,13 ± 0,07
Vacúolo circular (%)	0,03 ± 0,01	0,24 ± 0,21
Vacúolo irregular (%)	2,04 ± 0,47	1,50 ± 0,34

Os valores são expressos como média ± EPM (n = 6). Comparação entre controle e deltametrina (* p < 0,02).

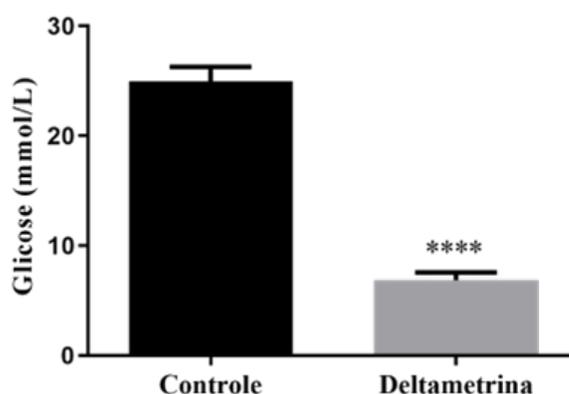


Figura 2 – Níveis de glicose plasmática dos morcegos (*Artibeus lituratus*) controle e tratados com deltametrina durante 35 dias. Os valores são média ± EPM. (n = 6). Comparação entre controle e deltametrina (****p < 0,0001).

Determinação do glicogênio hepático e muscular

A concentração de glicogênio do fígado e músculo peitoral não apresentou diferenças significativas entre os grupos (Tabela 3).

Determinação dos lipídios totais

As concentrações de gordura em animais expostos a deltametrina nos tecidos hepático,

músculo peitoral e tecido adiposo, não tiveram diferença significativa quando comparados ao grupo controle (Tabela 3).

Ácidos graxos da carcaça

As concentrações de ácidos graxos na carcaça foram significativamente reduzidas nos animais tratados com deltametrina em comparação com o grupo controle (p < 0,0001) (Figura 3).

Tabela 3 – Valores de glicogênio e lipídios teciduais de morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* tratados com deltametrina durante 35 dias.

	Controle	Deltametrina
Glicogênio hepático	137,25 ± 32,81	109,59 ± 22,04
Glicogênio muscular	35,64 ± 9,32	27,42 ± 4,58
Gordura do fígado	8,23 ± 1,43	9,24 ± 1,34
Gordura do músculo	6,26 ± 0,67	8,03 ± 0,74
Gordura do tecido adiposo	65,07 ± 11,20	56,08 ± 3,26

Os valores são expressos como média ± EPM (n = 6).

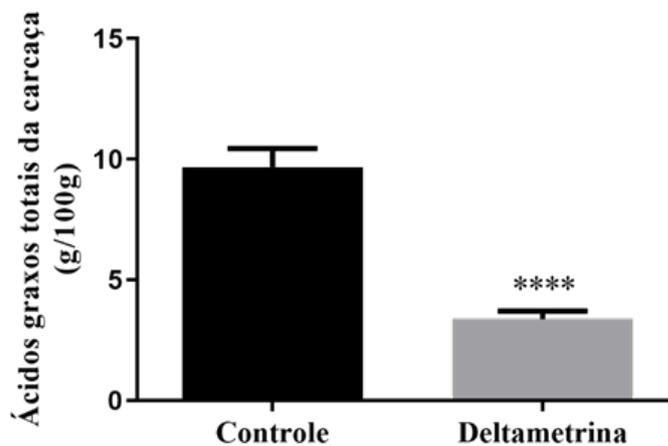


Figura 3 – Níveis de ácidos graxos totais da carcaça de morcegos (*Artibeus lituratus*) controle e tratados com deltametrina durante 35 dias. Os valores são média ± EPM. (n = 6). Comparação entre controle e deltametrina (****p < 0,0001).

Discussão

O estresse oxidativo está intimamente relacionado com o metabolismo energético e o envelhecimento celular (Frisard & Ravussin, 2006). Existe uma relação entre a produção de radicais livres e a taxa metabólica específica de cada espécie (Cutler, 1985; Ku et al., 1993). Morcegos têm uma taxa metabólica elevada comparada a mamíferos não-voadores de tamanho semelhante (Magalhães et al., 2007; Munshi-South e Wilkinson, 2010), e teorias sugerem adaptações para driblar o estresse oxidativo celular e o envelhecimento (Chionh et al., 2019). Porém, morcegos também são naturalmente expostos a pesticidas durante o forrageamento, o que consequentemente pode

induzir o estresse oxidativo (Jones et al., 2009; Oliveira et al., 2020).

Essa relação entre o estresse oxidativo, o metabolismo energético e a exposição a pesticida ainda é pouco estudada em morcegos. Nesses animais, a exposição aguda a baixas concentrações de deltametrina induz estresse oxidativo no músculo peitoral, hepatotoxicidade, alterações no metabolismo e pode afetar a saúde reprodutiva desses animais (Oliveira et al., 2018, de Oliveira et al., 2021; Oliveira et al., 2022). Neste estudo, investigamos, em uma exposição crônica, o efeito da formulação comercial do inseticida piretroide deltametrina na capacidade antioxidante do tecido hepático e renal, reservas energéticas e *status*



inflamatório do tecido hepático em morcegos frugívoros *Artibeus lituratus*. Nossos resultados mostraram que os animais expostos ao inseticida deltametrina por 35 dias apresentaram perda de peso corporal, estresse oxidativo hepático e diminuição de reservas energéticas.

Sabemos que a toxicidade do pesticida deltametrina é induzida por processos de estresse oxidativo durante o seu metabolismo (Romero et al., 2015; Lu et al., 2019). Neste estudo, deltametrina induziu estresse oxidativo no fígado de morcegos expostos, evidenciado pela redução da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT e aumento da enzima da GST, além de aumento no marcador de peroxidação lipídica, o MDA.

O fígado é o principal órgão metabolizador de xenobióticos, e a ação da enzima GST é importante para essa desintoxicação. Essa enzima realiza a desintoxicação celular contra substratos exógenos como os medicamentos, produtos intermediários industriais, pesticidas, herbicidas, poluentes ambientais e agentes cancerígenos (Cummins et al., 2011). Essa desintoxicação ocorre através de conjugados de glutathione com xenobióticos e produtos aldeídos produzidos na peroxidação lipídica (hidroperóxidos) tornando os produtos mais solúveis em água (Hermes-Lima, 2004; Hayes, 2005; Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009). Ratos tratados com deltametrina por 28 dias também apresentaram aumento de MDA e diminuição de SOD e CAT (Dubey et al., 2013). Em estudo anterior, do nosso grupo, morcegos expostos por 7 dias a deltametrina (0.02 e 0.04 mg DM/kg) apresentaram aumento de SOD, CAT, GST e MDA no fígado quando comparado com o controle (Oliveira et al., 2018). O maior tempo de exposição neste estudo (35 dias), pode ser a causa para a redução das enzimas antioxidantes e reforça que a exposição crônica a pesticidas induz estresse oxidativo crônico, o que pode prejudicar a sobrevivência dos animais.

No chamado “estresse oxidativo agudo”, os níveis aumentados de espécies reativas podem ser atenuados pela ativação rápida de enzimas antioxidantes, até mesmo sem a regulação da expressão gênica, provocando alterações reversíveis (Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009; Lushchak e Storey, 2021). Já em condição de “estresse oxidativo crônico” os níveis de espécies reativas são mantidos elevados por mais tempo e o organismo não consegue lidar rapidamente com essa condição, que passa a ser uma nova condição

fisiológica e pode resultar em danos irreversíveis (estresse oxidativo) (Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009; Lushchak e Storey, 2021).

A histomorfometria indicou alterações morfológicas no fígado, como a diminuição no volume e área nuclear dos hepatócitos induzidas pela deltametrina. A indução do estresse oxidativo no fígado pode acarretar mudanças morfológicas irreversíveis, mal funcionamento do fígado e hepatotoxicidade (Tanikawa & Torimura, 2006). Considerando o fígado um órgão importante na desintoxicação de xenobióticos, essas alterações podem acarretar fibrose, morte celular e doenças hepáticas (Oliveira et al., 2022). Alterações morfológicas no fígado também foram evidentes em outros estudos de morcegos expostos a pesticidas, como morcegos da mesma espécie expostos a deltametrina por 7 dias (Oliveira et al., 2022) ao fungicida tebuconazol, também por 7 dias (Freitas et al., 2021) e ao inseticida endossulfan quando foram expostos por 35 dias (Brinatti et al., 2016; Oliveira et al., 2017).

Os processos metabólicos atuam principalmente para produzir um suprimento constante de energia para a célula, por mecanismos de síntese e degradação de compostos nas reservas do organismo (Yang et al., 2020). Neste estudo, a glicemia e as concentrações de ácidos graxos da carcaça dos animais expostos a deltametrina foi menor quando comparado com os animais controle. As reservas lipídicas da carcaça parecem funcionar como fonte de fornecimento de substrato energético quando os animais estão passando por estresse. Dessa forma, a diminuição dos lipídios da carcaça se deve, possivelmente, a uma mobilização lipídica pela via da gliconeogênese, para a produção de glicose (Freitas et al., 2005). O consumo de glicerol devido à resposta ao estresse pode inibir vias de transcrição reguladas pelo fator de transcrição Nrf2, que tem papel importante na defesa contra o estresse oxidativo (Kobayashi & Yamamoto, 2006), através da expressão das enzimas antioxidantes, estando, então, o balanço redox interligado ao balanço energético (White & Stephens, 2010; Xue et al., 2013). Sabe-se que exposição a pesticidas também pode contribuir para a incidência de distúrbios metabólicos, como resistência a insulina, mudança de peso corporal, alterações na absorção de energia (Xiao et al., 2017). Assim, o inseticida deltametrina é capaz de causar um desequilíbrio tanto redox quanto energético, retardando o desenvolvimento de



massa corporal através de regulação negativa de fatores de transcrição da adipogênese (Armstrong et al., 2013).

A mobilização lipídica da carcaça pode promover complicações para esses animais, uma vez que a reserva lipídica está relacionada com eventos reprodutivos e intimamente ligada como fonte de reserva em períodos de jejum, devido a alterações ambientais (Freitas et al., 2006; Bem-Hamo et al., 2012). Esse resultado também foi encontrado em morcegos *A. lituratus* expostos ao organoclorado endossulfan durante 35 dias (Brinati et al., 2016) e ao organofosforado fentiona durante 7 dias (Amaral et al., 2012), e também para morcegos hematófagos submetidos ao jejum. Essa redução de reserva pode representar um prejuízo para animais em período reprodutivo, já que eles necessitam de reservas alocadas nos tecidos para a gestação e amamentação do filhote (Freitas et al., 2005).

Conclusão

Este estudo mostra que a exposição crônica a pesticidas piretroide pode ser prejudicial a um organismo não-alvo. Nossos resultados indicam que o pesticida inseticida deltametrina pode induzir estresse oxidativo, alterações morfológicas hepáticas e diminuição de reservas energéticas em morcegos. Esses resultados podem prejudicar a reprodução e sobrevivência desses animais que possuem importante papel para o ecossistema.

Referências

Aebi H. [13] Catalase in vitro. In *Methods in enzymology*. Academic press. 1984; 105: 121-126.

Agrawal ANJU, Sharma B. Pesticides induced oxidative stress in mammalian systems. *International Journal Of Biological and Medical Research*. 2010; 1(3): 90-104.

Amaral TS, Carvalho TF, Silva MC, Barros MS, Picanço MC, Neves CA, Freitas MB. 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*. 2012; 72: 299-304.

Amin KA, Hashem KS. Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. *BMC Veterinary Research*. 2012; 8(1): 1-8.

Amoretti MEA, Amsler C, Bonomi G, Bouchta A, Bowe P, Carraro C, ... Van Der Werf DP. Production and detection of cold antihydrogen atoms. *Nature*. 2002; 419(6906): 456-459.

Armstrong LE, Driscoll MV, More VR, Donepudi AC, Xu J, Baker A, ... Slitt AL. Effects of developmental deltamethrin exposure on white adipose tissue gene expression. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2013; 27(2): 165-171.

Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RDCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*. 2010; 23: 629-643.

Bennett BS, Thies ML. Organochlorine pesticide residues in guano of Brazilian free-tailed bats, *Tadarida brasiliensis* Saint-Hilaire, from East Texas. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2007; 78(3): 191-194.

Bianconi GV, Mikich SB, Teixeira SD, Maia BHL. Attraction of fruit-eating bats with essential oils of fruits: A potential tool for forest restoration. *Biotropica*. 2007; 39(1): 136-140.

Brinati A, Oliveira JM, Oliveira VS, Barros MS, Carvalho BM, Oliveira LS, ... Freitas MB. Low, chronic exposure to endosulfan, induces bioaccumulation and decreased carcass total fatty acids in neotropical fruit bats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2016; 97(5): 626-631.

Buege JA, Aust SD. [30] Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology*. Academic press. 1978; 52: 302-310.

Chargui I, Grissa I, Bensassi F, Hrirra MY, Haouem S, Haouas Z, Bencheikh H. 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*. 2012; 25(6): 672-683.

Chauhan LK, Kumar M, Paul BN, Goel SK, Gupta SK. Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or isoprothuron on human peripheral lymphocytes and mouse bone marrow cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2007; 48(8): 636-643.

Chionh YT, Cui J, Koh J, Mendenhall IH, Ng JH, Low D, ... Wang LF. High basal heat-shock protein expression in bats confers resistance to cellular heat/oxidative stress. *Cell Stress and Chaperones*. 2019; 24(4): 835-849.

Cummins I, Dixon DP, Freitag-Pohl S, Skipsey M, Edwards R. Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metabolism Reviews*. 2011; 43(2): 266-280.

- Cutler RG. Peroxide-producing potential of tissues: inverse correlation with longevity of mammalian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985; 82(14): 4798-4802.
- Davies TGE, Field LM, Williamson MS. The re-emergence of the bed bug as a nuisance pest: implications of resistance to the pyrethroid insecticides. *Medical and Veterinary Entomology*. 2012; 26(3): 241-254.
- de Oliveira JM, de Almeida Lima GD, Destro ALF, Condessa S, Zuanon JAS, Freitas MB, de Oliveira LL. Short-term intake of deltamethrin-contaminated fruit, even at low concentrations, induces testicular damage in fruit-eating bats (*Artibeus lituratus*). *Chemosphere*. 2021; 278: 130423.
- de Souza MB, de Souza Santos LR, Borges RE, Nunes HF, Vieira TB, Pacheco SM, de Melo e Silva D. Current status of ecotoxicological studies of bats in Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2020; 104(4): 393-399.
- de Souza TC, da Silva SLR, Marcon JL, Waichman AV. Acute toxicity of deltamethrin to Amazonian freshwater fish. *Toxicology and Environmental Health Sciences*. 2020; 12(2): 149-155.
- Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual review of entomology*. 2007; 52(1): 81-106.
- Dieterich S, Bielick U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*. 2000; 101(1): 33-39.
- Dietz S, De Roman M, Lauck-Birkel S, Maus C, Neumann P, Fischer R. Ecotoxicological and environmental profile of the insecticide delta methrin. In *Pyrethroid Scientific Forum*. 2009.
- Dubey N, Khan AM, Raina R. Sub-acute deltamethrin and fluoride toxicity induced hepatic oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2013; 91(3): 334-338.
- Folch, J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1957; 226(1): 497-509.
- Freitas MB, Passos CB, Vasconcelos RB, Pinheiro EC. Effects of short-term fasting on energy reserves of vampire bats (*Desmodus rotundus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2005; 140(1): 59-62.
- Freitas MB, Welker AF, Pinheiro EC. Efeitos do jejum e da variação sazonal sobre as reservas lipídicas de morcegos hematófagos (Chiroptera: Phyllostomidae). *Brazilian Journal of Biology*. 2006; 66: 1051-1055.
- Freitas RM, Linhares BS, Oliveira JM, Leite JPV, da Matta SLP, Gonçalves RV, Freitas MB. Tebuconazole-induced toxicity and the protective effect of *Ficus carica* extract in Neotropical fruit-eating bats. *Chemosphere*. 2021; 275.
- Frisard M, Ravussin E. Energy metabolism and oxidative stress. *Endocrine*. 2006; 29(1): 27-32.
- Froese JM, Smits JE, Forsyth DJ, Wickstrom ML. Toxicity and immune system effects of dietary deltamethrin exposure in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2009; 72(8): 518-526.
- Guardiola FA, González-Párraga P, Meseguer J, Cuesta A, Esteban MA. Modulatory effects of deltamethrin-exposure on the immune status, metabolism and oxidative stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*. 2014; 36(1): 120-129.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*. 1974; 249(22): 7130-7139.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2005; 45(1): 51-88.
- Hermes-Lima M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. 2004; 1: 319-66.
- Jones G, Jacobs DS, Kunz TH, Willig MR, Racey PA. Carpe noctem: the importance of bats as bioindicators. *Endangered Species Research*. 2009; 8(1-2): 93-115.
- Kasso M, Balakrishnan M. Ecological and economic importance of bats (Order Chiroptera). *Isrn Biodiversity*. 2013; 1-9.
- Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Advances in Enzyme Regulation*. 2006; 46(1): 113-140.
- Ku HH, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radical Biology and Medicine*. 1993 15(6): 621-627.
- Li M, Liu X, Feng X. Cardiovascular toxicity and anxiety-like behavior induced by deltamethrin in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Chemosphere*. 2019; 219: 155-164.
- Liao CH, He XJ, Wang ZL, Barron AB, Zhang B, Zeng ZJ, Wu XB. Short-term exposure to lambda-cyhalothrin negatively affects the survival and memory-related characteristics of worker bees *Apis mellifera*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2018 75(1): 59-65.

- Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2009; 674(1-2): 137-147.
- Lowry OH. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193: 265-275.
- Lu Q, Sun Y, Ares I, Anadón A, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, ... Martínez MA. Deltamethrin toxicity: A review of oxidative stress and metabolism. *Environmental Research*. 2019; 170: 260-281.
- Lushchak VI, Storey KB. Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. *EXCLI Journal*. 2021; 20: 956.
- Magalhães JPD, Costa J, Church GM. An analysis of the relationship between metabolism, developmental schedules, and longevity using phylogenetic independent contrasts. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2007; 62(2): 149-160.
- Martins MPV, Torres JM, Dos Anjos EAC. Dieta de morcegos filostomídeos (Mammalia, Chiroptera, (Phyllostomidae) em fragmento urbano do Instituto São Vicente, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Papeis Avulsos de Zoologia*. 2014; 54(20): 665-670.
- Melo FP, Rodriguez-Herrera B, Chazdon RL, Medellín RA, Ceballos GG. Small tent-roosting bats promote dispersal of large-seeded plants in a Neotropical forest. *Biotropica*. 2009; 41(6): 737-743.
- Munshi-South J, Wilkinson GS. Bats and birds: exceptional longevity despite high metabolic rates. *Ageing Research Reviews*. 2010; 9(1): 12-19.
- Nunes H, Rocha FL, Cordeiro-Estrela P. Bats in urban areas of Brazil: roosts, food resources and parasites in disturbed environments. *Urban Ecosystems*. 2017; 20(4): 953-969.
- Oliveira JM, Condessa SS, Destro ALF, Lima GDA, Cupertino MC, Cardoso S A, Freitas MB, Oliveira LL. Morphophysiological alterations in fruit-eating bats after oral exposure to deltamethrin. *International Journal of Experimental Pathology*. 2022; 00: 1-12.
- Oliveira JM, Destro ALF, Freitas MB, Oliveira LL. How do pesticides affect bats?—A brief review of recent publications. *Brazilian Journal of Biology*. 2020; 81: 499-507.
- Oliveira JM, Losano NF, Condessa SS, de Freitas RMP, Cardoso SA, Freitas MB, de Oliveira LL. Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissues of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018; 148: 684-692.
- Oliveira JM, Brinati A, Miranda LDL, Morais DB, Zanuncio JC, Gonçalves RV, ... Freitas MB. Exposure to the insecticide endosulfan induces liver morphology alterations and oxidative stress in fruit-eating bats (*Artibeus lituratus*). *International Journal of Experimental Pathology*. 2017; 98(1): 17-25.
- Romero A, Ares I, Ramos E, Castellano V, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, ... Martínez MA. Evidence for dose-additive effects of a type II pyrethroid mixture. In vitro assessment. *Environmental Research*. 2015; 138: 58-66.
- Royauté R, Buddle CM, Vincent C. Under the influence: sublethal exposure to an insecticide affects personality expression in a jumping spider. *Functional Ecology*. 2015; 29(7): 962-970.
- Santos MA, Rodrigues MV, Áreas MA, Reyes FG. Deltamethrin and Permethrin in the liver and heart of Wistar rats submitted to oral subchronic exposure. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2011; 22: 891-896.
- Siwicki AK, Terech-Majewska E, Grudniewska J, Malaczewska J, Kazun K, Lepa A. Influence of deltamethrin on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 2010; 29(3): 489-491.
- Sjörgren B, Noerdenskjold T, Holmgeen H, Mollerstrom J. Beitrag zur kenntnis der leberhythmik (glykogen, phosphor und calcium in der kaninchenleber). *Pflügers Archiv*. 1938; 240-247.
- Stahlschmidt P, Hahn M, Brühl CA. Nocturnal risk-high bat activity in the agricultural landscape indicates potential pesticide exposure. *Frontiers in Environmental Science*. 2017.
- Tanikawa K, Torimura T. Studies on oxidative stress in liver diseases: important future trends in liver research. *Medical Molecular Morphology*. 2006; 39(1): 22-27.
- Torquetti CG, Guimarães ATB, Soto-Blanco B. Exposure to pesticides in bats. *Science of the Total Environment*. 2021; 755.
- Vizotto LD, Taddei VA. Chave para determinação de quirópteros brasileiros. 1973.
- White UA, Stephens JM. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010; 318(1-2): 10-14.
- Xiao X, Clark JM, Park Y. Potential contribution of insecticide exposure and development of obesity and type 2 diabetes. *Food and Chemical Toxicology*. 2017; 105: 456-474.

Xue P, Hou Y, Chen Y, Yang B, Fu J, Zheng H, ... Pi J. Adipose deficiency of Nrf2 in ob/ob mice results in severe metabolic syndrome. *Diabetes*. 2013; 62(3): 845-854.

Yang C, Lim W, Song G. Mediation of oxidative stress toxicity induced by pyrethroid pesticides in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2020; 234.

Yang J, Ueharu H, Mishina Y. Energy metabolism: A newly emerging target of BMP signaling in bone homeostasis. *Bone*. 2020; 138

Yildirim MZ, Benl AÇK, Selv M, Özku A, Erkoç F, Koçak O. Acute toxicity, behavioral changes, and histopathological effects of deltamethrin on tissues (gills, liver, brain, spleen, kidney, muscle, skin) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fingerlings. *Environmental Toxicology: An International Journal*. 2006; 21(6): 614-620.

Biodiversidade Brasileira – BioBrasil.

Sessão Temática: Biologia e Conservação de Morcegos no Brasil
n.2, 2023

<http://www.icmbio.gov.br/revistaeletronica/index.php/BioBR>

Biodiversidade Brasileira é uma publicação eletrônica científica do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) que tem como objetivo fomentar a discussão e a disseminação de experiências em conservação e manejo, com foco em unidades de conservação e espécies ameaçadas.

ISSN: 2236-2886