

THALES SIMIONI AMARAL

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS E HISTOPATOLÓGICAS INDUZIDAS
PELOS INSETICIDAS FENTIONA E ESPINOSINA EM
MORCEGOS FRUGÍVOROS**

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*

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009**

THALES SIMIONI AMARAL

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS E HISTOPATOLÓGICAS INDUZIDAS
PELOS INSETICIDAS FENTIONA E ESPINOSINA EM
MORCEGOS FRUGÍVOROS**

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: 26 de março de 2009.

Prof. Marcelo Coutinho Picanço

Prof. Clóvis Andrade Neves

Prof. Jener Alexandre S. Zuanon
(orientador)

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta
(orientador)

Prof^a Mariella B. Duca de Freitas
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

- agradeço a Universidade Federal de Viçosa, juntamente com o programa de Pós-Graduação em Biologia Animal por me conceder a oportunidade de ingressar no mestrado;

- agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a Mariella Bontempo Duca de Freitas, pela orientação e por ter acreditado no meu trabalho;

- agradeço aos meus pais por acreditarem em meus estudos e sempre me apoiaram;

- Em especial à Carol, minha namorada, que esteve sempre ao meu lado, não permitindo que eu desanimasse durante essa caminhada, e ainda colaborar em alguns períodos de experimentos;

- a todos os amigos que estiveram comigo durante o curso, tanto os amigos antigos quanto os novos, de alguma forma me ajudaram a ter excelentes momentos em Viçosa;

- aos meus companheiros de laboratório, Leandro, Túlio, Mirlaine, Bruno e Marta, pelo companheirismo e mão de obra durante os experimentos;

- à Marcela, por ter se dedicado e utilizado grande parte do seu tempo realizando as análises histológicas do meu material;

- agradeço também a Maria Clara, que me concedeu grande parte dos animais utilizados em meus experimentos;

- aos meus co-orientadores Jener e Sérgio, pelos ensinamentos e explicações emergenciais;

- ao professor Marcelo Picanço e seu aluno Jander, pela colaboração na escolha da melhor metodologia a ser aplicada e ainda por fornecer os agrotóxicos utilizados;

- ao professor Clóvis pelo auxílio nas análises histológicas;

- gostaria de fazer ainda um agradecimento especial ao Professor Luiz Grassi, que foi a primeira pessoa a acreditar em meu potencial como futuro pesquisador e me fazer acreditar nisso e a seguir sempre em busca de meus objetivos;

- por fim, a todos aqueles que estiveram comigo nessa caminhada, permitindo que esta etapa da minha vida tenha sido concluída.

BIOGRAFIA

Thales Simioni Amaral, filho de Vilson do Amaral e Rosi de Fátima Simioni Amaral, nasceu em Dourados, Estado de Mato Grosso do Sul, no dia 12 de dezembro de 1982. Em novembro de 2006, graduou-se em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Campus de Dourados. Em março de 2007, iniciou o programa de mestrado em Biologia Animal pela Universidade Federal de Viçosa e defendeu a dissertação em março de 2009.

ÍNDICE

| | |
|---|--------------------------------------|
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | Erro! Indicador não definido. |
| Introdução Geral..... | 3 |
| Referências Bibliográficas | 11 |
| Alterações metabólicas e histopatológicas induzidas por inseticida fentiona em morcegos frugívoros <i>Artibeus</i> spp. | 16 |
| Resumo..... | 16 |
| 2. Material e métodos | 18 |
| 2.1 Agroquímicos | 18 |
| 2.2 Animais e tratamento | 18 |
| 2.3 Amostragem | 19 |
| 2.4 Determinação da glicemia..... | 19 |
| 2.5 Glicogênio hepático e muscular | 19 |
| 2.6 Determinação da proteína tecidual..... | 19 |
| 2.7 Determinação dos lipídios totais | 20 |
| 2.8 Ácidos graxos totais da carcaça | 20 |
| 2.9 Análise histológica | 20 |
| 2.10 Análise estatística..... | 21 |
| 3. Resultados | 21 |
| 3.1 Glicemia | 21 |
| 3.2 Glicogênio hepático e muscular | 22 |
| 3.3 Proteína total | 22 |
| 3.4 Lipídio total muscular e hepático e ácidos graxos totais da carcaça..... | 23 |
| 3.5 Alterações morfológicas dos hepatócitos..... | 24 |
| 4. Discussão | 26 |
| 5. Referências..... | 30 |
| Efeitos da ingestão de alimento contaminado com inseticida espinosade sobre o metabolismo energético e tecido hepático de morcegos frugívoros do gênero <i>Artibeus</i> | 34 |
| Resumo..... | 34 |
| 2. Material e métodos..... | 37 |

| | |
|--|----|
| 2.1 Agroquímicos | 37 |
| 2.2 Animais e tratamento | 37 |
| 2.3 Amostragem | 37 |
| 2.4 Determinação da glicemia..... | 38 |
| 2.5 Glicogênio hepático e do músculo peitoral..... | 38 |
| 2.6 Determinação da proteína tecidual..... | 38 |
| 2.8 Análise histológica..... | 38 |
| 2.9 Análise estatística..... | 39 |
| 3. Resultados | 39 |
| 3.1 Glicemia | 39 |
| 3.2 Glicogênio peitoral e hepático | 40 |
| 3.3 Proteína total | 40 |
| 3.4 Lipídios totais..... | 40 |
| 3.5 Alterações morfológicas dos hepatócitos..... | 41 |
| 4. Discussão | 43 |
| 5. Referências | 45 |
| Conclusões gerais..... | 48 |

RESUMO

AMARAL, Thales Simioni, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2009. **Alterações metabólicas e histopatológicas induzidas pelos inseticidas fentiona e espinosina em morcegos frugívoros.** Orientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas. Co-orientadores: Jener Alexandre S. Zuanon e Sérgio Luis P. da Matta.

A utilização crescente e indiscriminada de diversos tipos de agrotóxicos pode afetar diretamente os seres humanos e animais, acarretando problemas relacionados ao sistema nervoso, alterações endócrinas e alteração na atividade de enzimas da via glicolítica e neoglicogenética, gerando hiperglicemia e, além disso, alterações histopatológicas. Para avaliar os efeitos metabólicos e histopatológicos de inseticidas em morcegos *Artibeus* spp., os animais foram submetidos à ingestão de alimento contaminado com inseticidas fentiona e espinosina. A dosagem dos inseticidas foi a mesma sugerida para a aplicação nos campos de cultivo de frutas. Após o período de tratamento (7 e 30 dias fentiona e 7 dias para espinosina), foram analisadas as concentrações de glicose plasmática, proteínas e lipídios do fígado, dos músculos das patas e do músculo peitoral, lipídios totais do tecido adiposo e carcaça, além de análises histopatológicas do tecido hepático. Os animais tratados com fentiona não apresentaram alterações nas concentrações glicêmicas nos grupos analisados. No entanto, o grupo tratado por 7 dias apresentou aumento da concentração de glicogênio muscular e diminuição dos ácidos graxos da carcaça, enquanto o grupo tratado por 30 dias não apresentou diferença em relação ao grupo controle. Os outros parâmetros não apresentaram alterações nos grupos tratados com fentiona por 7 e 30 dias em relação ao grupo controle. As análises morfológicas demonstraram vacuolização nos hepatócitos do grupo tratado por 7 dias, promovendo aumento de 30% no diâmetro celular em relação ao grupo controle. Os animais tratados com inseticida espinosade apresentaram alterações nas reservas energéticas apenas nos lipídios das patas posteriores. Foi observado aumento do diâmetro dos hepatócitos em cerca de 16% em relação ao grupo controle promovido por vacuolização nestas células. Em conclusão, pode-se dizer que inseticida organofosforado fentiona altera o metabolismo energético e o tecido hepático de morcegos frugívoros, enquanto que o inseticida espinosade não promoveu grandes alterações nos padrões metabólicos destes animais, sugerindo, portanto que as espinosinas possam vir a substituir outras classes de pesticidas mais tóxicas.

ABSTRACT

AMARAL, Thales Simioni, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2009. **Metabolic and histopathologic changes induced by insecticides fenthion and spinosyns in fruit bats.** Adviser: Mariella Bontempo Duca de Freitas. Co-Advisers: Jener Alexandre S. Zuanon and Sérgio Luis P. da Matta.

The increasing and indiscriminate use of different types of agrochemicals can directly affect the humans and animals, causing problems related to the nervous system, cancers, endocrine alterations, and hormonal changes such as inhibition of enzymes of the glycolytic and gluconeogenesis pathway, causing hyperglycemia and pathological changes. To evaluate the histopathological and metabolic effects of insecticides on bats *Artibeus* spp., the animals were submitted to the ingestion of food contaminated with insecticides fenthion and spinosyns. The dosage of the insecticides used was the same suggested for implementation in the fields of culture. After the treatment period (7 and 30 days for fenthion and 7 days for spinosad) were examined plasma concentrations of glucose, proteins and lipids in the liver, the muscles of the limbs and the pectoral muscle, lipids total fat and carcass, and histopathological analysis of liver tissue. The animals treated with fenthion showed no changes in glucose concentrations in any of the treatment groups. However, the group treated for 7 days showed an increased in the concentration of muscle glycogen and a decrease in fatty acids of the carcass, while the animals treated for 30 days did not differ when compared to the control group. The other parameters showed no changes in the group treated with fenthion for 7 and 30 days when compared to the control group. The morphological analysis showed a vacuolization in the hepatocytes of group treated for 7 days, promoting an increase of 30% in cell diameter compared to the control group. Animals treated with insecticide spinosad showed changes in the patterns of energy reserves only in the lipid of the back limb. It was observed an increase in the diameter of the hepatocytes in approximately 16% compared to the control group promoted by the vacuolization. In conclusion, we can say that organophosphate fenthion insecticide alters the energy metabolism and hepatic tissue of fruit bats, while the insecticide spinosad did not promote major changes in metabolic patterns of these animals, suggesting therefore that the spinosyns might replace other classes of more toxic pesticides.

Introdução Geral

O metabolismo energético compreende os processos envolvidos na conversão de energia a partir de fontes provenientes da alimentação assim como de fontes endógenas. Estes processos atuam principalmente no fornecimento constante de energia para as células, por mecanismos de síntese e de degradação de compostos presentes no organismo, como nutrientes provenientes da alimentação (carboidratos, lipídios e proteínas) ou das reservas corporais (glicogênio no fígado e músculo, lipídio no tecido adiposo e proteína no músculo) (Genuth, 1998).

Nos mamíferos, a glicose é o principal combustível que fornece energia para os tecidos do sistema nervoso, medula renal e hemácias. A manutenção da homeostase glicêmica depende dos processos de síntese e degradação dos compostos energéticos no período absorptivo, pós-absorptivo e jejum (Nordlie *et al.*, 1999). O nível de glicose na circulação sanguínea de mamíferos é finamente controlado em organismos saudáveis, uma vez que pequenas reduções na sua concentração podem prejudicar as funções das células nervosas e musculares estriadas (Maughan, 2005). Diversos órgãos participam na regulação da taxa glicêmica, como o cérebro e pâncreas, além do tecido hepático, muscular e adiposo (Tirone e Brunicardi, 2001).

Lipídios, proteínas e carboidratos liberam energia quando oxidados, porém a quantidade de energia por grama liberada pode variar de acordo com a fonte. A oxidação de lipídios libera 37 KJ/g enquanto proteínas liberam 18 KJ/g e carboidratos 16 KJ/g (Gleeson, 2005).

Reservas endógenas de carboidratos são encontradas na forma de glicogênio encontradas no músculo e no fígado. O total de carboidratos armazenados no corpo de um homem de 70 kg é de 300 a 500g, sendo que uma porção de 80 a 100g está armazenada no fígado, de onde pode ser liberado na corrente sanguínea e transportado para outros tecidos. A maior parte das reservas de carboidratos está localizada no músculo esquelético. No entanto, o glicogênio muscular não está disponível para os outros tecidos (Maughan, 2005).

Em caso de ingestão de carboidratos excedente à capacidade de armazenamento, a maior parte será oxidada para fornecer energia. No entanto, se a ingestão de carboidrato é muito alta ou superior à demanda total de energia, uma

grande parte do excesso é convertida em ácidos graxos para o armazenamento em células adiposas (Maughan, 2005).

As proteínas são polímeros de aminoácidos e a seqüência destes determina diretamente a conformação da estrutura e função da proteína. Proteínas são fundamentais para a manutenção da estrutura e função corporal (Becker e Smith, 2006).

As proteínas não são armazenadas primariamente como fonte de energia. Durante o jejum, o aumento da degradação da proteína muscular surge como uma adaptação crítica para promover rápida mobilização de aminoácidos como substância para a via da neoglicogênese (Kettelhut *et al.*, 1988). Durante a alimentação, a síntese protéica no músculo é aumentada em resposta ao aumento da disponibilidade de aminoácidos, mas esse aumento é limitado a cerca de 2 horas, mesmo na presença de um aumento sustentado de aminoácidos (Becker e Smith, 2006). Assim, o músculo esquelético contribui com a maior proporção das reservas no corpo. Gorduras (lipídios) possuem os mesmos elementos estruturais dos carboidratos (carbono, hidrogênio, oxigênio), mas a relação entre hidrogênio e oxigênio é consideravelmente maior. As células adiposas contêm pouca água, tornando os lipídios uma forma muito mais eficiente de armazenamento de energia em comparação com o glicogênio que necessita de 2-3 g de água por grama de carboidrato armazenado. A gordura armazenada no tecido adiposo é, portanto, o único combustível que pode ser depositado em grandes reservas energéticas que podem sustentar o corpo através de longos períodos de jejum (Gleeson, 2005).

O fígado é o principal órgão envolvido no metabolismo energético controlando a homeostase glicêmica, onde são ativadas as vias metabólicas da glicogenólise e neoglicogênese (Corssmit *et al.*, 2001). O pâncreas participa diretamente nessas vias através da liberação dos hormônios que regulam estes processos, como a insulina e o glucagon. A insulina ativa as vias da glicólise e glicogeniogênese quando a ingestão de carboidratos é superior às demandas energéticas. No caso de privação alimentar, o glucagon assume o papel na manutenção da taxa glicêmica ativando a quebra do glicogênio hepático através da glicogenólise e também, pela ativação da neoglicogênese fornecendo glicose a partir de fontes não glicídicas (Cryer, 1991).

O conhecimento do metabolismo energético de mamíferos (ratos e camundongos) fornece, muitas vezes, suporte para o conhecimento do próprio

metabolismo humano. No entanto, o metabolismo energético de outros grupos de mamíferos é pouco estudado, principalmente de mamíferos silvestres, como o caso dos morcegos.

Os morcegos são animais pertencentes à ordem Chiroptera que apresenta a maior diversidade de habitats e distribuição geográfica entre os mamíferos. O nome Chiroptera vem do grego *cheir* (mão) e *pteron* (asa) (Nowak, 1994; Altringham, 1996). A ordem Chiroptera compreende o segundo maior grupo de mamíferos em número de espécie, representando 25% das espécies de mamíferos existentes (Altringham, 1996). Essa grande distribuição é explicada pela característica única entre os mamíferos: o voo. Em morcegos, os braços e os dedos são alongados e unidos por uma membrana, o quiropatágio. Esta membrana resistente e modificações nos sistemas musculares e esquelético fornecem suporte para o voo (Nowak, 1994).

A ordem Chiroptera é dividida em duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera. A subordem Megachiroptera é exclusiva do Velho Mundo e Oceania e apresenta apenas uma família com 42 gêneros e 166 espécies. São os maiores morcegos encontrados, com envergadura de até 2 metros (Nowak, 1994; Wilson, 1997). Os Microchiropteros se dividem em 17 famílias, 157 gêneros e 928 espécies distribuídas no mundo todo, exceto nos pólos (Simmons, 2005).

Além da grande distribuição geográfica, este grupo é o que apresenta a maior diversidade de dieta, incluindo insetos, peixes, pequenos vertebrados, frutas, flores, folhas, néctar, pólen e sangue, sendo o último exclusivo da ordem quiróptera (Nowak, 1994).

Os morcegos predominantemente frugívoros são cruciais para a dinâmica de florestas tropicais, por serem dispersores de sementes de diversas plantas pioneiras e outras árvores tropicais (Tavoloni, 2005).

No Brasil ocorrem 9 famílias, 64 gêneros e 167 espécies de morcegos (Reis, 2007), que representam 25% dos mamíferos do país e estão distribuídos por todo território nacional (Peracchi, 2006). Morcegos frugívoros do Brasil pertencem unicamente à família Phyllostomidae distribuídos em 12 gêneros e 33 espécies (Reis, 2007). A subfamília Stenodermatinae é a mais numerosa dentre os Phyllostomidae com 67 espécies (Simmons, 2005).

Morcegos da subfamília Stenodermatinae possuem tamanhos variados, de 25 a 75 mm de antebraço (Reis, 2007). Animais do gênero *Artibeus* (Figura 1) estão entre

os maiores dessa subfamília, podendo atingir de 54 a 75 g de peso corporal (Reis, 2007).

Em geral, *Artibeus lituratus*, uma das espécies mais abundantes do gênero, apresenta listras faciais distintas e coloração da pelagem corporal predominantemente amarronzada, podendo variar entre regiões. Formam grupos poligâmicos e abrigam-se nas copas das árvores, sendo predominantemente frugívoros (Bredt, 1996).

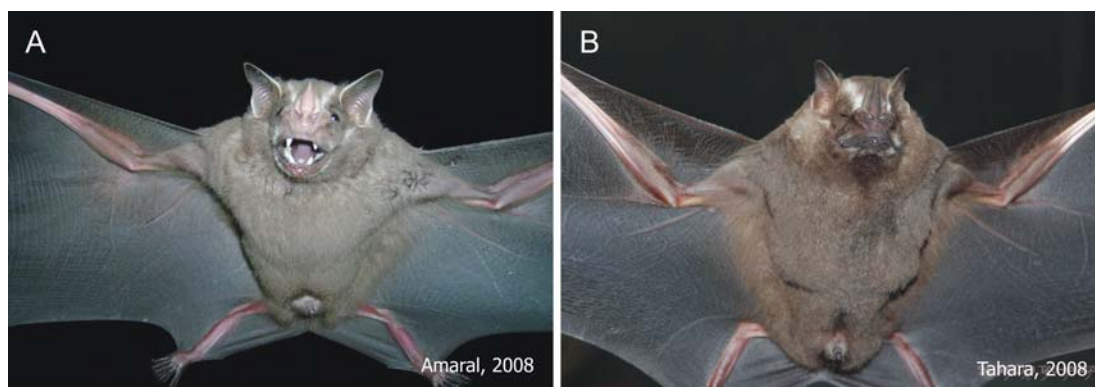


Fig. 1 Morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* (A) e *Artibeus fimbriatus* (B).

Ambas as espécies são abundantes em todo território nacional, sendo que sua distribuição abrange toda a região neotropical: *A. lituratus* ocorre desde o México até a Argentina e *A. fimbriatus* ocorre apenas no Brasil, Paraguai e Argentina (Reis, 2007). O status destas espécies está definido atualmente como “pouco preocupante” pela Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN, 2008), apesar de outras espécies de quirópteros frugívoros que ocorrem no território brasileiro já serem classificadas como ameaçadas, como *Platyrrhinus recifinus*.

Estudos relacionados à fisiologia e metabolismo energético de morcegos frugívoros são escassos. Pinheiro *et al.* (2006) avaliaram animais alimentados e submetidos ao jejum por diferentes períodos. Os autores observaram que, em animais alimentados, a taxa glicêmica é similar à de outros mamíferos, e que as reservas de glicogênio no fígado e no músculo estão envolvidas na manutenção da glicemia durante períodos curtos de jejum, apresentando mecanismos capazes de manter a glicemia constante durante períodos de até seis dias de privação alimentar. Em períodos mais prolongados, a neoglicogênese no fígado possui um papel fundamental

na homeostase glicêmica. Em estudos realizados por Freitas *et al.* (2003; 2005), foram avaliados o metabolismo de morcegos hematófagos submetidos ao jejum, demonstrando sua similaridade em relação ao metabolismo de mamíferos alimentados e sua fragilidade frente ao jejum.

Apesar da grande importância para o ambiente como dispersores de sementes e controladores de insetos, algumas espécies de morcegos acabam sendo consideradas nocivas por fruticultores e responsáveis por perdas na produção de frutas, uma vez que morcegos frugívoros são comumente vistos em pomares, devido à abundância de alimento e, em alguns casos, pela destruição do seu ambiente natural. Em busca de uma solução rápida e economicamente viável para diminuir a perda de frutas, ataque de insetos e doenças causadas por fungos e bactérias, produtores se utilizam de produtos voltados para a proteção de sua produção que acabam sendo ingeridos por organismos não-alvos, como os morcegos. Atualmente, um número crescente de produtores rurais tem feito uso indiscriminado de diversos tipos de agrotóxicos para proteger seus cultivos e garantir a rentabilidade de seus negócios (Larini, 1999; Carvalho, 2006). A estimativa atual é que existam cerca de 1500 substâncias diferentes com ação praguicida (ingredientes ativos) em todo o mundo, a partir das quais são produzidas inúmeras formulações (Larini, 1999).

Os agrotóxicos podem ser classificados de diferentes formas, de acordo com a finalidade, modo de ação, persistência, deslocamento, duração do efeito do tratamento, toxicidade, origem ou grupo químico. Uma das classificações mais importantes é a toxicidade do praguicida. A classificação toxicológica é baseada na identificação do componente de risco referente a uma substância química, e diferencia a toxicidade dos agrotóxicos com base no ingrediente ativo e sua formulação. Os agrotóxicos são classificados como: extremamente tóxicos; altamente tóxicos; moderadamente tóxicos e levemente tóxicos, de acordo com a dose letal (DL50) em mg/kg em ratos submetidos à toxicidade aguda oral e dérmica (Larini, 1999).

Nos últimos anos, 127 pesticidas foram descritos como sendo perturbadores endócrinos, dentre eles os grupos dos organoclorados, organofosforados, carbamatos, triazanos e piretróides (Mckinlay, 2008). Dentre os agrotóxicos, os inseticidas são compostos químicos ou biológicos utilizados para o controle de insetos. Cada inseticida apresenta toxicidade diferente conforme a natureza química, dose

empregada e seu estado físico (Gallo, 2002). Os organofosforados são compostos formados por ésteres do ácido fosfórico e outros ácidos à base de fósforo. São mais tóxicos que clorados e carbamatos em toxicidade aguda, porém se degradam mais rapidamente e não acumulam no tecido adiposo dos organismos. Representam 35,5% do mercado mundial de inseticidas. Pouco solúveis em água, possuem toxicidade variável para os animais. São facilmente degradados no ambiente e são neurotóxicos. O primeiro organofosforado criado foi o parathion em 1936 pelo alemão Dr. Gerard Schrader (Guedes *et al.*, 2008).

Os inseticidas naturais dividem-se de acordo com sua origem: vegetal, animal e microbiana. As espinosinas, inseticidas microbianos, são produtos de fermentação do *Saccharopolyspora spinosae*. As espinosinas A e D são mais ativas e de uso mais amplo na agricultura. Estes inseticidas possuem ação neurotóxica nos insetos (Guedes *et al.*, 2008).

A utilização de qualquer pesticida deve seguir uma série de critérios para se evitar efeitos colaterais em organismos não-alvo e contaminação do ambiente. Deve-se verificar o registro do produto a ser utilizado e respeitar também o período de carência, ou intervalo de segurança. Este prazo é importante para garantir que o alimento colhido não apresente resíduos dos compostos utilizados no controle de pragas, evitando assim a contaminação do consumidor. É necessário ainda, respeitar a dose indicada para cada cultura para que não haja resistência dos organismos-alvo a estes compostos (Picanço *et al.*, 2008).

É necessário conhecer bem o produto que está sendo aplicado, pois resíduos de pesticidas ainda contaminam o solo e a água, permanecendo nas plantações, entrando na cadeia alimentar e finalmente sendo ingeridos por humanos e outros animais através dos alimentos e da água (Taylor *et al.*, 2003).

Os efeitos de inseticidas sobre organismos não-alvo podem agir no crescimento e desenvolvimento ou ainda sobre a sobrevivência dos mesmos, podendo afetar tanto predadores naturais de determinadas pragas como também peixes, aves e mamíferos. Mamíferos, em geral, podem ser contaminados de forma direta pela inalação ou ainda através do consumo de alimentos contaminados. A intoxicação aguda pode ocorrer quando o composto reage de forma rápida no organismo, e a intoxicação crônica é resultado de seu acúmulo gradual, como conhecidamente ocorre com

pesticidas organoclorados, que se acumulam no tecido adiposo de mamíferos (Fernandes *et al.*, 2008).

Diversos estudos relacionam ainda o efeito da intoxicação por agrotóxicos com alterações histopatológicas em ratos (Yavasoglu *et al.*, 2006; Al-Jahdali *et al.*, 2007; Fetoui *et al.*, 2009). As principais alterações encontradas por estes autores referem-se à presença de gotículas de lipídios no citoplasma dos hepatócitos. São observados ainda vasodilatação, aumento dos sinusóides e infiltração de leucócitos no tecido hepático. De acordo com Varela-Rey *et al.*, (2009), a presença de vacúolos lipídicos no citoplasma dos hepatócitos pode acarretar complicações como cirrose e carcinoma hepático, e ainda pode causar diabetes, hiperlipidemia e hipertensão.

A exposição à organofosforados presentes no ambiente também parece estar relacionada com alterações reprodutivas de homens e mulheres, que trabalham ou moram próximos de campos de cultivo e que se utilizam destes compostos, comprovada através da redução da qualidade do sêmen e diminuição dos níveis de testosterona verificados em homens expostos. Em mulheres, foi relatado comprometimento do crescimento e desenvolvimento fetal acarretado pela exposição pré-natal a compostos organofosforados (Peiris-John, 2008).

Diversos estudos também têm comprovado que a exposição a substâncias químicas pertencentes à classe dos organofosforados pode alterar diversos parâmetros metabólicos, como a comprovada indução de hiperglicemia em ratos (Abdollahi *et al.*, 2004; Pournourmohammadi *et al.*, 2007; Rahimi, 2007; Rezg *et al.*, 2007). Estes autores demonstraram que os organofosforados podem afetar a homeostase da glicose, atuando sobre enzimas-chave de diversas vias metabólicas. A exposição ao malationa (inseticida organofosforado) interfere nas principais vias hepáticas relacionadas ao controle dos níveis de glicose na circulação como a glicólise, a neoglicogênese e a glicogenólise (Pournourmohammadi *et al.*, 2007). Além de afetar o controle glicêmico, o envenenamento por OFs também promove danos às células beta pancreáticas, prejudicando a secreção de insulina, hormônio regulador da via de oxidação da glicose. Além da diminuição da secreção de insulina pelo pâncreas, outro fator relacionado à hiperglicemia provocada por OFs é a estimulação comprovada da enzima neoglicogenética fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) em animais expostos a este tipo de pesticida. A estimulação

da PEPCK e a diminuição da secreção de insulina promovem a reportada hiperglicemia observada nestes casos (Abdollahi *et al.*, 2004; Rahimi, 2007).

A intoxicação por organofosforados também parece diminuir os níveis de proteína e lipídios hepáticos pelo aumento da atividade das enzimas-chave da neoglicogênese. No entanto, alguns autores relatam que a hiperglicemia observada é temporária, devido provavelmente à estimulação da deposição de glicogênio no fígado, que retorna a glicemia aos níveis normais (Rodrigues *et al.*, 1986; Rezg *et al.*, 2007). A sucessão entre liberação de glicose via glicogenólise e neoglicogênese, e seu armazenamento via glicogeniogênese durante uma hiperglicemia anormal pode ser uma das explicações para a normalidade do índice glicêmico dos animais, quando expostos subcronicamente a organofosforados (Rezg *et al.*, 2007).

Apesar dos resultados obtidos até o presente momento, muitas outras classes de agrotóxicos testados ainda não apresentam estudos com resultados conclusivos, e muitos deles ainda não foram sequer preliminarmente investigados. Além disso, a maioria dos trabalhos realizados utiliza ratos e camundongos como espécie-alvo, deixando uma lacuna no entendimento da reação que outras espécies animais apresentam quando em contato com estes compostos, como por exemplo, morcegos frugívoros. Em relação a estes animais, diversos autores relataram que morcegos silvestres estão sendo contaminados com agrotóxicos organoclorados e organofosforados (Mispagel *et al.*, 2004; Allinson *et al.* 2006; Bennett e Thies, 2007). Esta exposição é comprovada por estes autores pela presença de resíduos de pesticidas nas fezes destes animais, assim como sua deposição em diversos tecidos, principalmente no tecido adiposo, músculos e cérebro.

Assim, esta contribuição para a fisiologia comparativa e para o estudo destes efeitos em animais silvestres, possibilitará uma nova avaliação do uso destes agrotóxicos em organismos não-alvo e que também está exposto a frutos contaminados, o que poderia estar causando um importante impacto na conservação de animais silvestres e, portanto, promovendo um desequilíbrio na conservação dos ecossistemas.

Referências Bibliográficas

- Abdollahi, M.; Donyavi, M.; Pournourmohammadi, S.; Saadat, M. (2004). Hyperglycemia associated with increased hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following subchronic exposure to malathion. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 137:343–347.
- Al-Jahdali, M. O.; Bisher, A. S. B.; Abu Zeid, I. M. (2007). Physiological and histological alterations in rats liver induced by Sumithion® NP25/2.5 EC, an insecticide used in dengue fever vector control in Jeddah, Saudi Arabia, *Saudi Journal of Biological Sciences* 14(1) 43-51.
- Allinson, G.; Mispagel, C.; Kajiwara, N.; Anan, Y.; Hashimoto, J.; Laurenson, L.; Allinson, M.; Tanabe, S. (2006). Organochlorine and trace metal residues in adult southern bent-wing bat (*Miniopterus schreibersii bassanii*) in southeastern Australia, *Chemosphere* 64 1464–1471.
- Altrigham, J.D. (1996). *Bats biology and behavior*. Oxford University. Press, Oxford, NY. 278 p.
- Becker, G. W., Kenneth, S. (2006). Basic metabolism III: protein. *Surgery* 24:4.
- Bennett, B. S., Thies, M. L. (2007). Organochlorine pesticide residues in guano of Brazilian freetail bats, *Tadarida brasiliensis* Saint-Hilaire, from East Texas, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78, 191–194.
- Bredt, A. I.; Araújo, F. A. A; Caetano – Júnior, J.; Rodrigues, M.G.R.; Yoshizawa, M.; Silva, M. M. S.; Harman, N.M.S.; Massunaga, P.N.T.; Bürer, S.P.; Porto, V.A.R.; Uieda, W. (1996). *Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle*. Brasília: Fundação Nacional de Saúde / Ministério da Saúde, 117p.
- Carvalho, F. P. (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science & Policy* (9) 685-692.

Corssmit, E. P.; Romijn, J. A.; Sauerwein, H. P. (2001). Regulation of glucose production with special attention to nonclassical regulatory mechanisms: a review. *Metabolism*, 50 (7): 742-755.

Cryer, P. E. (1991). Regulation of glucose metabolism in man. *Journal of Internal Medicine* 229(2): 31-39.

Fernandes, F. L.; Picanço, M. C.; Fernandes, M. E. S.; Chediak, M.; Tomé, H. V. V.; Gontijo, P. C. (2008). Impacto de inseticidas e acaricidas sobre organismos não-alvo. *In: Zambolin, L.; Picanço, M.C.; Silva, A.A.; Ferreira, L.R.; Ferreira, F.A. Produtos Fitossanitários – Fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas. Ed Departamento de Fitopatologia - Universidade Federal de Viçosa p.575-606.*

Fetoui, H.; Garoui, E. M.; Zeghal, N. Lambda-cyhalothrin-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats: Ameliorative effect of ascorbic acid, *Exp. Toxicol. Pathol.* “in press”.

Freitas, M. B., Passos, C. B. C., Vasconcelos, R. B., Pinheiro, E. C. (2005). Effects of short-term fasting on energy reserves of vampire bats (*Desmodus rotundus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 140:59-62.

Freitas, M. B.; Welker, A. F.; Millan S. F.; Pinheiro, E. C. (2003). Metabolic responses induced by fasting in the common vampire bat *Desmodus rotundus* *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 173:703–707.

Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.;Carvalho,R. P. L.; Batista, G. C.; Berti Filho, E.; Parra, J. R. P.; Zucchi, R. A.; Alves, S. B.; Vendramim, J. D.; Machini, L. C.; Lopes, J. R. S. ; Omoto C. (2002). *Manual de Entomologia Agrícola. Piracicaba: FEALQ.* 920p.

Genuth, S. (1998). For aggressive preventive management of type 2 Diabetes. What is the evidence and is it enough? *The Journal of Family Practice* 47(5): S23-26.

Gleeson, M. (2005). Basic metabolism I: fat. *Surgery* 23(3): 83–8.

Guedes, R. N. C.; Picanço, M. C.; Pereira, E. J. G.; Silva, E. M.; Silva, G. A.; Soares, F. F. (2008). Características dos principais grupos de inseticidas e acaricidas. *In:*

Zambolin, L.; Picanço, M. C.; Silva, A. A.; Ferreira, L. R.; Ferreira, F. A. Produtos Fitossanitários – Fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas. Ed Departamento de Fitopatologia - Universidade Federal de Viçosa, p. 489-518.

IUCN (World Conservation Union). World list of Microchiroptera with IUCN red list: Categories of Threat and Distribution. IUCN – World Conservation Union, Gland, Suíça. Disponível em < <http://www.redlist.org> > 2008. Acesso em março de 2008.

Kettelhut, I. C.; Foss, M. C.; Migliorini, R. H. (1980). Glucose homeostasis in a carnivorous animal (cat) and in rats fed a high protein diet, *American Journal of Physiology* , 239: R437 - R444.

Larini, I. (1999). Toxicologia dos Praguicidas. Editora Manole: São Paulo, 230 p.

Maughan, R. (2005). Basic metabolism II: carbohydrate. *Surgery* 23(5): 154–8.

Mckinlay, R., Plant, J.A., Bell, J.N.B., Voulvoulis, N. (2008). Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. *Environment International* 34, 168-183.

Mispagel, C.; Allinson, M.; Allinson, G.; Iseki, N.; Grant, C.; Morita, M. (2004). DDT and metabolites residues in the southern bent-wing bat (*Miniopterus schreibersii bassanii*) of south-eastern Australia, *Chemosphere* 55 997–1003.

Nordlie, R. C.; Foster, J. D.; Lange, A. J. (1999). Regulation of glucose production by the liver. *Annual Review of Nutrition* 19: 379-406.

Nowak, R. M. (1994). Walker's Bats of the world. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 287 p.

Peiris-John, R.J., Wickremasinghe, R. (2008). Impact of low-level exposure to organophosphates on human reproduction and survival. *The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 239-245.

Peracchi, A. L.; Lima, I. P.; Reis, N. R.; Nogueira, M. R.; Ortêncio Filho, H. (2006). Ordem Chiroptera. In: Reis, N. R.; Peracchi, A. L.; Pedro, W. A.; Lima, I. P. (Eds.) *Mamíferos do Brasil*. Londrina: N. R. Reis, p.153-230.

Picanço, M. C.; Morais, E. G. F.; Silva, G. A.; Xavier, V. M.; Queiro, R. B.; Silva, N. R. (2008). Inseticidas, acaricidas e moluscicidas no manejo integrado de pragas. *In: Zambolin, L.; Picanço, M. C.; Silva, A. A.; Fereira, L. R.; Fereira, F. A. Produtos Fitossanitários – Fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas. Ed Departamento de Fitopatologia - Universidade Federal de Viçosa, p.541-576.*

Pinheiro, E. C., Taddei, V. A., Migliorini, R. H., Kettelhut, I. C. (2006). Effect of fasting on carbohydrate metabolism in frugivorous bats (*Artibeus lituratus* and *Artibeus jamaicensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 143:279–284.

Pournourmohammadi, S.; Ostad, S. N.; Azizi, E.; Ghahremani, M. H.; Farzami, B.; Minaie, B.; Larijani, B.; Abdollahi, M.; (2007). Induction of insulin resistance by malathion: Evidence for disrupted islets cells metabolism and mitochondrial dysfunction, *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 88 346–352.

Rahimi, R.; Abdullah, M. (2007). A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88:115–121.

Reis, N. R.; Peracchi, A. L.; Pedro, W. A.; Lima, I. P. (2007). *Morcegos do Brasil. Londrina; 253p.*

Rezg, R; Mornagui, B; Kamoun, A; El-Fazaa, S; Gharbi, N. (2007). Effect of subchronic exposure to malathion on metabolic parameters in the rat. *The Comptes rendus Biologies* 330 143–147.

Rodrigues, M.R.; Puga, F.R.; Chenker, E.; Mazanti, M.T.(1986). Shortterm effect of malathion on rats' blood glucose and on glucose utilization by mammalian cells in vitro, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 12 (2) 110– 113.

Simmons, N. B. (2005). Order Chiroptera. Pp. 312-529 *in: Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference, Third Edition, Volume 1 (D.E. Wilson and D.M Reeder, eds.). Johns Hopkins University Press.*

Tavoloni, P. (2005). Diversidade e frugivoria de morcegos filostomídeos (Chiroptera, Phyllostomidae) em habitats secundários e plantios de *Pinus* spp., no município de Anhembi – SP. *Biota Neotropica*, 6(2)83.

Taylor, M., Klaine, S., Carvalho, F.P., Barcelo, D. Everaarts, J. (Eds.), (2003). *Pesticide Residues in Coastal Tropical Ecosystems: Distribution, Fate and Effects*. CRC PRESS, London. 541p.

Tirone, T. A.; Brunicardi, F. C. (2001). Overview of glucose regulation. *World Journal of Surgery* , 25: 461-467.

Varela-Rey, M.; Embade, N.; Ariz, U.; Lu, S. C.; Mato J. M.; Martínez-Chantar, M. L. (2009). Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: Understanding the human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 41 969-976.

Wilson, D. E., (1997). *Bats in question: the Smithsonian answer book*. The Smithsonian Institution Press, Washington. 168 p.

Yavasoglu A.; Sayim, F.; Uyanikgil, Y.; Turgut, M.; Karabay-Yavasoglu, N. U. (2006). The pyrethroid cypermethrin-induced biochemical and histological alterations in rats liver, *Journal of Health Science* , 52(6) 774-780.

Capítulo 1

Alterações metabólicas e histopatológicas induzidas por inseticida fentiona em morcegos frugívoros *Artibeus* spp.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição aguda e sub-crônica ao inseticida organofosforado fentiona no metabolismo energético e na morfologia do tecido hepático de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus*. Os animais dos grupos tratados com fentiona receberam diariamente fruta contaminada através de imersão em solução contendo o inseticida (1 mL/L) e espalhante adesivo (3mL/L). Foram analisadas as concentrações de glicose plasmática e de glicogênio, proteína e lipídio hepáticos e musculares, concentração de lipídios do tecido adiposo e ácidos graxos totais da carcaça, além do diâmetro dos hepatócitos. A glicose sanguínea não sofreu alteração. O glicogênio peitoral apresentou aumento e os ácidos graxos da carcaça diminuíram em contaminação aguda. Foi observado aumento no diâmetro celular promovido por vacuolização. Os resultados mostram que o inseticida fentiona, quando aplicado na dosagem recomendada, afeta o metabolismo e promove danos hepáticos em morcegos *Artibeus* spp.

Palavras-chave: metabolismo, morcegos, glicemia, hepatócito, fentiona, organofosforado, inseticida.

1. Introdução

Atualmente, a alternativa imediata encontrada para se alcançar o aumento necessário da produção alimentícia mundial está centrada no aumento do uso de agrotóxicos [1].

Alterações histopatológicas hepáticas são descritas em animais submetidos a exposição a organofosforados (OFs), principalmente esteatose hepática, hipertrofia do hepatócitos, desorganização estrutural e vasodilatação [2-4]. Estas alterações, em conjunto, promovem maiores complicações, como cirrose e carcinoma hepático, diabetes, hiperlipidemia e hipertensão arterial [5].

Diversos estudos têm comprovado que a exposição à organofosforados também pode alterar parâmetros metabólicos, como a indução de hiperglicemia em mamíferos [6]. O aumento da glicose na circulação está relacionado ao aumento da atividade da enzima-chave da via da neoglicogênese, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase, em conjunto com o aumento da atividade da enzima glicogênio fosforilase [7, 8]. Além disso, a intoxicação por OFs se mostrou nociva às células beta pancreáticas de ratos que promoveu diminuição da secreção de insulina e a homeostase glicêmica [9].

Apesar de diversos estudos relacionados com metabolismo e intoxicação por organofosforados, algumas formulações são poucos estudadas, como a fentiona, que é um dos compostos mais utilizados em culturas frutíferas na nossa região. Fentiona é um inseticida organofosforado e seus efeitos tóxicos são resultantes da sua capacidade de produzir uma inativação irreversível da colinesterase [10]. Em adição aos efeitos neurotóxicos, os metabólitos do fentiona podem ser responsáveis por peroxidação lipídica no fígado e cérebro e ainda danos ao DNA [11] e ainda, citotoxicidade aos neuroblastos [10]. Apesar dos estudos realizados com este composto, não foram descritas as alterações no metabolismo energético e danos histopatológicos no tecido hepático em várias ordens de mamíferos. Dentre estes animais, estão incluídas diversas espécies de morcegos frugívoros que ocorrem em todo o território brasileiro, inclusive na região de mata atlântica cercada por plantações [12].

Diversos autores relataram que morcegos silvestres estão sendo contaminados com agrotóxicos organoclorados e organofosforados [13-15]. Esta exposição foi comprovada pela presença de resíduos de pesticidas nas fezes destes animais, no

tecido adiposo, músculos e cérebro. Estes fatores podem estar relacionados com o declínio das populações de diversas espécies de morcegos que vivem próximas a campos de cultivos. Morcegos frugívoros são cruciais para a dinâmica de florestas tropicais, por serem dispersores de sementes de diversas plantas pioneiras [16, 17]. Assim, alterações nas taxas reprodutivas e na homeostase glicêmica, induzidas pela intoxicação por inseticidas organofosforados, podem representar riscos às populações destes animais, interferindo diretamente na dinâmica do ambiente.

Com o presente estudo, objetivou-se avaliar o efeito da exposição aguda e subcrônica de inseticida organofosforado fentiona no metabolismo energético e no tecido hepático de morcegos frugívoros *Artibeus* spp.

2. Material e métodos

2.1 Agroquímicos

Foi utilizado o inseticida organofosforado fentiona (O,O-dimethyl O-4-methylthio-m-tolyl phosphorothioate, 500 g/L), e o espalhante adesivo (polioxietileno alquil fenol éter 200 g/L).

2.2 Animais e tratamento

Morcegos machos (N=22) do gênero *Artibeus* foram coletados no campus da Universidade Federal de Viçosa/MG, na Mata do Paraíso (Viçosa/MG) e na fazenda do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (Araçuaia/MG), entre os meses de fevereiro e outubro de 2008. Os animais, pesando entre 58-94 g, foram mantidos em gaiolas individuais, em sala com baixa iluminação, em temperatura ambiente. Após um período de dois dias em cativeiro, os animais foram divididos em três grupos, sendo um grupo controle alimentado com fruto tratado com espalhante adesivo (N=6), um grupo tratado com fruta contaminada com inseticida durante 7 dias (N=11) e um grupo tratado com fruta contaminada com inseticida durante 30 dias (N=5). Foi oferecido diariamente mamão para os animais, por ser de fácil aceitação em cativeiro. As frutas ainda inteiras (\approx 400 g) foram imersas em calda contendo espalhante adesivo na concentração de 10% e inseticida na concentração de 3 mL/L e de 1 mL/L, respectivamente, e mantidas suspensas em recipiente adaptado para que não tocassem em qualquer superfície, evitando assim, a perda da camada do

inseticida por contato.as concentrações utilizadas seguiram a indicação do fabricante para aplicação em culturas frutíferas. As frutas partidas ao meio (aproximadamente 200 g) foram oferecidas aos animais, com a casca voltada para cima, de modo que durante a ingestão do mamão, o morcego entraria em contato com o inseticida. O alimento foi oferecido diariamente, próximo das 18 h, sendo a água oferecida *ad libitum*.

2.3 Amostragem

Ao final de cada tratamento, os animais foram eutanasiados por decapitação, e o sangue foi rapidamente coletado em tubos heparinizados. Os tecidos (hepático, músculo das patas anteriores e posteriores e do peito e tecido adiposo) foram retirados, pesados e divididos em sub-amostras com peso ≥ 200 mg para cada dosagem, e congelados a temperatura de -20° C.

2.4 Determinação da glicemia

Para a determinação da glicemia, o sangue coletado foi centrifugado (2000 rpm/ 15 minutos) para separação do plasma e posteriormente armazenado em congelador a -20° C. A glicemia foi determinada pelo método enzimático da glicose-oxidase - GLUCOX 500 (DOLES).

2.5 Glicogênio hepático e muscular

Para as determinações de glicogênio hepático e do músculo peitoral, uma porção conhecida (≥ 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 [18].

2.6 Determinação da proteína tecidual

Para a determinação da proteína total hepática e muscular (músculo peitoral e das patas anteriores e posteriores), uma porção conhecida do fígado e dos músculos

foi homogeneizada em solução fisiológica 0,9 %. Posteriormente foi utilizado o método colorimétrico através do Kit *BCA Protein Assay Reagent* (BCA-PIERCE).

2.7 Determinação dos lipídios totais

Para a determinação dos lipídios totais do fígado, tecido adiposo e muscular (músculo das patas e peitoral), uma porção conhecida desses tecidos foi retirada e homogeneizada com um volume conhecido de solução clorofórmio-metanol (2:1) [19]. Após filtração e separação das fases por adição de solução fisiológica 0,9%, uma alíquota da fase clorofórmica (10 mL) foi utilizada para determinação dos lipídios totais.

2.8 Ácidos graxos totais da carcaça

Após a retirada dos tecidos utilizados nas demais dosagens, foi retirado também, o tubo digestório a partir da porção terminal do esôfago até o ânus, rins e aparelho reprodutivo. A carcaça foi então pesada e digerida em 200 mL de KOH 6 N durante 4 a 6 dias, sendo posteriormente filtrada. Foi então adicionado igual volume de álcool absoluto, resultando assim uma solução de KOH-etanol 50 % (v/v). Uma amostra desta solução foi lavada por 3 vezes com 40 mL de éter de petróleo, acidificada com 5 mL de H₂SO₄ P.A e submetida à extração, com 3 vezes o volume final, por clorofórmio. Foram utilizados 50 mL desta fase para determinação dos ácidos graxos totais por método gravimétrico.

2.9 Análise histológica

Porções do fígado foram coletadas e imediatamente fixadas em Formalina de Carson. Os fragmentos passaram por procedimento padrão de desidratação e foram incluídos em glicol-metacrilato (Historesin®, Leica). Foram feitas secções de 2µm de espessura e as preparações foram coradas com Azul de Toluidina-borato de sódio 1%. As secções foram examinadas em microscópio de luz com objetiva de 40x e determinado o diâmetro celular e área nuclear com o software Image-Pro Plus 4.5.

2.10 Análise estatística

Os dados estão apresentados na forma de Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Para comparação dos resultados foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para dados não repetidos, quando foi comprovada a distribuição normal e homogeneidade dos dados. Para dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis. Para a análise histológica foi utilizado o teste-t. O critério de significância foi acertado em 5 % ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Glicemia

Analisando a concentração plasmática de glicose, não foram observadas alterações entre os animais tratados com inseticida fentiona por 7 ou 30 dias em relação ao grupo controle (7,63 \pm 0,93; 8,95 \pm 1,20 e 7,66 \pm 1,14 mmol/L, respectivamente) (Figura 1).

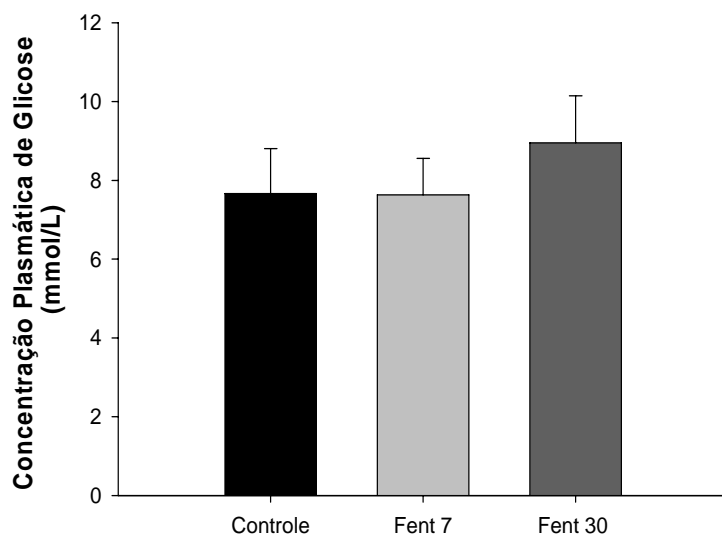


Fig.1 Concentrações plasmáticas de glicose (mmol/L) em animais controle e tratados com fentiona por 7 dias (Fent 7) e 30 dias (Fent 30). Os resultados estão expressos em média \pm EPM.

3.2 Glicogênio hepático e muscular

A concentração de glicogênio ($\mu\text{mol glicosil unidades/g}$) do músculo peitoral apresentou aumento significativo nos animais tratados por 7 dias com fentiona quando comparados com o grupo controle ($107,56 \pm 19,36$ e $16,59 \pm 1,66$, respectivamente), enquanto que nos animais tratados durante 30 dias, não foi observada diferença significativa. As concentrações de glicogênio hepático não diferiram significativamente entre os grupos analisados (Figura 2).

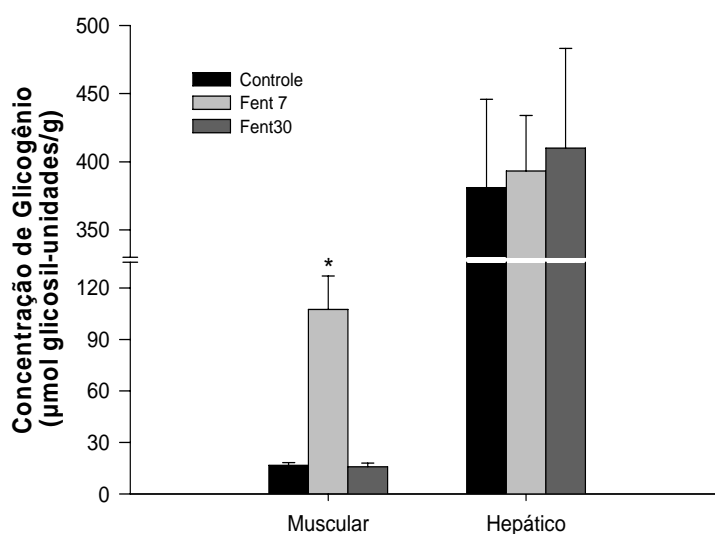


Fig.2 Concentrações de glicogênio muscular e hepático em animais controle, tratados com fentiona por 7 dias (Fent 7) e por 30 dias (Fent 30). Os resultados estão expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ para mesmo tecido em relação ao grupo controle.

3.3 Proteína total

Não foram observadas alterações nas concentrações totais de proteínas do fígado, músculo peitoral e músculo das patas anteriores e posteriores nos animais tratados com fentiona durante 7 ou 30 dias em relação ao controle (Tabela 1).

Tabela 1

Concentrações de proteínas totais dos tecidos avaliados sob diferentes períodos de exposição ao pesticida fentiona (g/100g)

| | Músculos da pata anterior | Músculos da pata posterior | Fígado | Músculo peitoral |
|----------|---------------------------|----------------------------|-------------|------------------|
| Controle | 7,46 ±0,41 | 8,70 ±0,96 | 11,43 ±1,37 | 9,17 ±0,82 |
| Fent 7 | 8,87 ±0,54 | 7,07 ±0,78 | 10,60 ±0,81 | 8,85 ±0,35 |
| Fent 30 | 9,09 ±0,72 | 9,25 ±0,71 | 10,43 ±0,58 | 8,43 ±0,61 |

O inseticida foi administrado durante períodos de 7 e 30 dias (Fent 7 e Fent 30, respectivamente), através de imersão dos alimentos fornecidos aos animais. Os valores estão expressos em média ±EPM.

3.4 Lipídio total muscular e hepático e ácidos graxos totais da carcaça

Os lipídios totais do músculo peitoral, das patas anteriores e posteriores, do fígado e do tecido adiposo, de animais tratados por 7 ou 30 dias, não diferiram significativamente em relação aos animais controle (Tabela 2). Os ácidos graxos totais da carcaça, no entanto, apresentaram valores menores em animais tratados por 7 dias quando comparados aos animais do grupo controle. Já os animais tratados por 30 dias não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (Figura 3).

Tabela 2

Concentrações de lipídios totais teciduais avaliados sob diferentes períodos de exposição ao pesticida fentiona (g/100g)

| | Músculo Peitoral | Fígado | Tecido adiposo | Músculo da pata anterior | Músculo da pata posterior |
|----------|------------------|-------------|----------------|--------------------------|---------------------------|
| Controle | 6,61 ±0,44 | 5,69 ±0,47 | 53,63 ±1,20 | 5,51 ±0,50 | 7,01 ±0,31 |
| Fent 7 | 6,91 ±0,46 | 5,34 ±0,23 | 49,27 ±2,62 | 4,67 ±0,33 | 5,62 ±0,65 |
| Fent 30 | 6,02 ±0,44 | 10,76 ±2,51 | 57,55 ±3,15 | 4,01 ±0,50 | 6,86 ±0,77 |

O inseticida foi administrado durante períodos de 7 e 30 dias (Fent 7 e Fent 30 respectivamente) através de imersão dos alimentos fornecidos aos animais. Os valores estão expressos em média ±EPM.

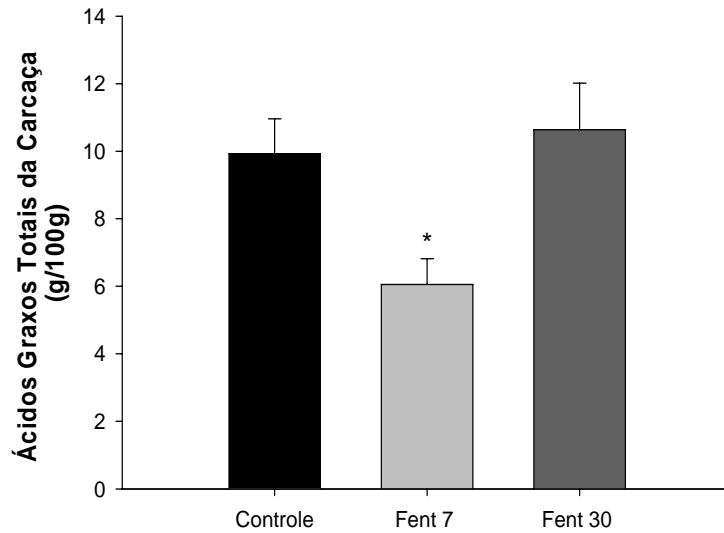


Fig. 3 Concentrações de ácidos graxos totais da carcaça (g/100g) em animais controle e tratados com fentiona por 7 dias (Fent 7) e 30 dias (Fent 30), através de imersão dos alimentos fornecidos aos animais. Os resultados estão expressos em média±EPM. * p < 0,05 em relação ao Controle.

3.5 Alterações morfológicas dos hepatócitos

As análises do tecido hepático revelaram que os animais do grupo controle apresentaram estrutura histológica padrão para mamíferos, com os cordões e lóbulos hepáticos em arranjo regular, assim como os vasos sanguíneos. Os hepatócitos não apresentam gotículas de lipídios no citoplasma. O diâmetro celular médio foi de $16,83 \pm 0,25 \mu\text{m}$ e a área nuclear média foi $33,02 \pm 2,62 \mu\text{m}^2$. As células dos animais pertencentes ao grupo tratado com fentiona por 7 dias apresentaram aumento no diâmetro ($21,81 \pm 0,30 \mu\text{m}$) de aproximadamente 30% em relação ao controle ($p < 0,05$) e ainda, não houve diferença significativa na área nuclear ($37,70 \pm 1,08 \mu\text{m}^2$). Nesse mesmo grupo, os hepatócitos apresentaram-se disformes e com o limite bem definido. Foi observada ainda a presença de muitos vacúolos no citosol e ausência de vasos sanguíneos e macrófagos (Figura 4).

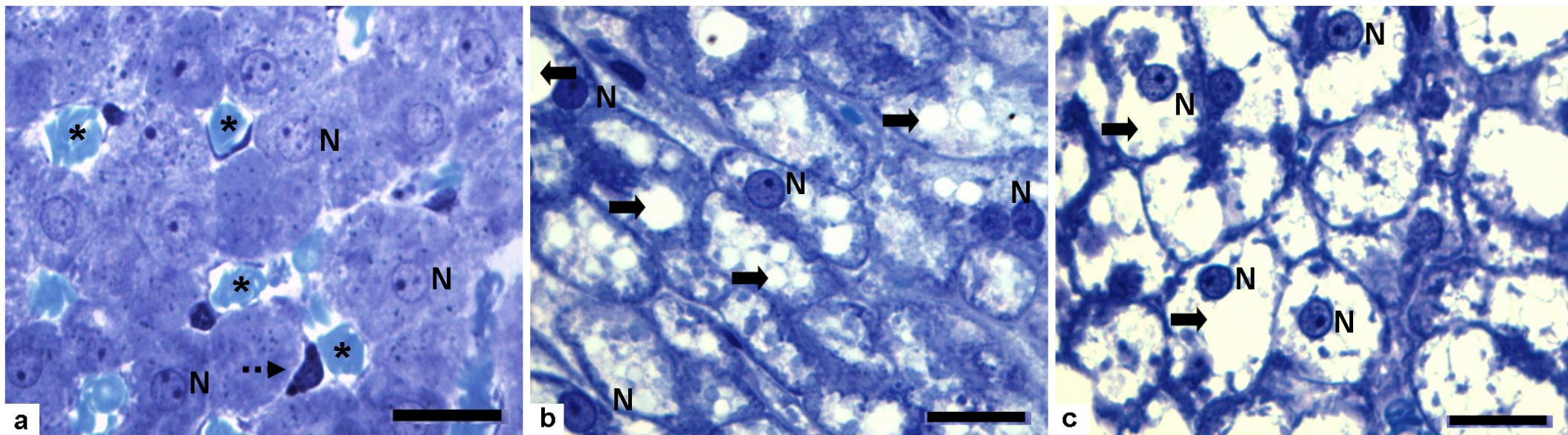


Fig. 4. Fotomicrografia de secções histológicas do fígado de *Artibeus* spp. Corados com Azul de Toluidina 1%. Controle (a), Fentiona 7 dias (b e c). Núcleo (N), vaso sanguíneo (*), vacuolização (➡), macrófago (▪▪➡). — 20 µm

4. Discussão

Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que utiliza morcegos como animais experimentais em toxicologia metabólica e hepática. Avaliando os efeitos da exposição aguda e subcrônica do inseticida organofosforado fentiona no metabolismo energético de morcegos do gênero *Artibeus*, os resultados apresentados demonstraram que as concentrações plasmáticas de glicose destes morcegos não variaram nos animais submetidos ao inseticida fentiona após 7 ou 30 dias de tratamento. Cabe ressaltar que a maioria dos estudos relacionados com alterações metabólicas induzidas por organofosforados em mamíferos utiliza ratos e o inseticida malationa. Um dos principais aspectos observados em ratos contaminados por malationa, também um inseticida da classe dos organofosforados, é o quadro de hiperglicemia ([20, 9, 21]. Este fato pôde ser observado em ratos logo nas primeiras 2 horas após ingestão de alimento contaminado, sendo que a glicemia retornou aos níveis normais nas horas subseqüentes, até o final do ciclo de 24 horas após a administração do agrotóxico [21]. A homeostasia glicêmica alcançada em ratos após o período de hiperglicemia pode ser atribuída a um aumento do glicogênio hepático, a partir da sexta hora de tratamento, que ocorre gradativamente até o final do período de experimento (24 horas) [21-24]. Um dos fatores que pode explicar a ausência de hiperglicemia nos morcegos deste estudo seria que a ingestão do alimento contaminado ocorreu ao longo de um período total de 12 horas, de forma que cada animal experimental pode ter se alimentado em diferentes momentos, tornando difícil a padronização e detecção do aumento da glicemia, conforme relatado na literatura. No entanto, a metodologia aqui empregada teve por objetivo a simulação da situação real enfrentada pelos animais no campo.

Morcegos tratados com fentiona por 7 dias apresentaram aumento no nível de glicogênio no músculo peitoral, apesar de não terem sido observadas alterações na concentração plasmática de glicose em função do tratamento. Este fato pode indicar que, por um determinado período, pode ter havido um quadro de hiperglicemia nos indivíduos desse, provocando a resposta de aumento da formação de glicogênio muscular. No entanto, em um período subcrônico (30 dias) de exposição à alimentação contaminada com fentiona, esta reserva encontrou-se em níveis normais, demonstrando uma regulação dos mecanismos envolvidos na homeostase da reserva

de glicogênio em longo prazo. Uma possível formação de glicose, e seu armazenamento na forma de glicogênio, a partir de uma fonte não-glicídica, pela ativação da via da neoglicogênese, poderia explicar tanto a diminuição observada da concentração de ácidos graxos da carcaça quanto o aumento na concentração de glicogênio muscular nos animais submetidos a 7 dias de tratamento. Sabe-se que pesticidas organofosforados atuam diretamente em enzimas-chave de diversas vias metabólicas relacionadas ao metabolismo da glicose. Dentre estas ações, diversos estudos comprovam efeitos como inibição da glicólise e aumento da atividade da neoglicogênese e glicogenólise hepáticas [9, 6, 8]. Após o período de 30 dias de tratamento, os ácidos graxos totais da carcaça, assim como a concentração de glicogênio muscular, retornam aos níveis basais observados nos animais controle, demonstrando a constante flutuação das reservas energéticas corporais mesmo frente à presença do inseticida fentiona no organismo e o retorno à homeostasia glicêmica após um período maior de exposição ao inseticida. Esta resposta fisiológica também foi encontrada em ratos submetidos à ingestão de pesticidas organofosforados, os quais apresentam hiperglicemia nos primeiros dias de tratamento seguido de homeostase glicêmica em períodos mais prolongados (32 dias) [25, 8]. De maneira similar, a mobilização lipídica na carcaça observada em *Artibeus* também foi relatada em estudos com morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) submetidos ao jejum [26]. Os autores demonstraram que esta espécie de quirópteros utiliza a reserva lipídica como fonte importante para o fornecimento de glicose para a circulação sanguínea durante o período de privação alimentar, enfatizando a importância da reserva lipídica alocada na carcaça. A redução da reserva lipídica prejudica a capacidade reprodutiva dos mamíferos. Como o processo reprodutivo necessita de muita energia, iniciar uma gestação sem reservas pode levar mãe e feto à morte [27].

Tem sido demonstrado em vários trabalhos que inseticidas organofosforados afetam a homeostase lipídica e promovem peroxidação de lipídios [28-30]. Os animais apresentaram ainda diminuição significativa do conteúdo de proteína e lipídio no fígado, demonstrando uma mobilização destas fontes energéticas, provavelmente para a produção de glicose pela via da neoglicogênese, em função da atuação do inseticida [8]. Morcegos tratados com o organofosforado fentiona não mostraram alterações no metabolismo de lipídios e proteínas após 7 e 30 dias de tratamento nos tecidos analisados (fígado, músculo do peito e das patas anteriores e

posteriores), com exceção dos ácidos graxos da carcaça. Isto indica ausência de alterações no padrão de armazenamento e mobilização destas reservas em função da ingestão de fentiona. Estudos com morcegos *A. lituratus* e *A. jamaicensis* demonstraram que estas espécies não utilizam como fonte primária de energia as reservas lipídicas do fígado frente a períodos de jejum de 24 horas a 6 dias, além de não ocorrer mobilização de proteína por parte de nenhum dos tecidos analisados [31]. Esta resposta também foi observada em morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* que não utilizaram lipídios teciduais (fígado e músculos) e nem as reservas protéicas para regulação dos padrões metabólicos em resposta ao jejum [32].

Em relação às análises morfológicas hepáticas em *Artibeus* spp, é interessante destacar que o aumento do diâmetro celular dos hepatócitos deveu-se, provavelmente, ao acúmulo de água ou gordura em seu interior, promovendo vacuolização e conseqüentemente hipertrofia dos hepatócitos. O acúmulo intracelular de substâncias em quantidades anormais é considerado uma manifestação de transtorno metabólico, podendo levar a lesões celulares crônicas e ainda morte celular. A deposição lipídica pode ser considerada como um mecanismo de defesa da célula, uma vez que o hepatócito captura os compostos tóxicos evitando sua distribuição no organismo, ou ainda, por alterações na homeostasia lipídica, promovendo produção endógena ou inibindo sua oxidação no organismo [33]. A degeneração hidrópica, caracterizada pelo acúmulo de eletrólitos e água no interior dos hepatócitos na forma de vacúolos, é uma lesão não letal bastante comum, ocorrendo em resposta a diversos tipos de agressão. Este tipo de degeneração é frequentemente decorrente de transtornos nos mecanismos de controle do equilíbrio hidroeletrolítico das células, já que, para o funcionamento adequado do transporte realizado pelos canais iônicos é necessária a presença de energia na forma de ATP e, portanto, uma alteração na produção ou consumo de ATP pode levar ao acúmulo de eletrólitos e conseqüentemente de água no interior das células [34]. A presença do inseticida organofosforado no organismo inibe a oxidação da glicose [8], sendo comprovado, inclusive, uma queda na produção de ATP pela via glicolítica, o que poderia levar a um quadro de degeneração hidrópica. No entanto, serão necessários outros estudos para avaliar com precisão o conteúdo intracelular dos hepatócitos que poderiam ter causado a degeneração hidrópica ou vacuolar observada.

Nossos resultados demonstraram que, a aplicação de fentiona na dose recomendada, provocou alterações metabólicas somente na reserva lipídica da carcaça e na reserva de glicogênio do músculo peitoral em animais tratados por 7 dias, que retornaram aos níveis basais após um período de 30 dias de exposição ao agente tóxico. Esta alteração nas concentrações de lipídios da carcaça pode promover complicações para os animais, uma vez que a reserva lipídica está intimamente relacionada com eventos reprodutivos, além de representar uma importante fonte de reserva em períodos de jejum que estes animais enfrentam devido a alterações ambientais. Desta forma, a menor deposição de gordura na carcaça dos animais tratados durante 7 dias, poderia prejudicar a adaptação dos animais frente a alterações ambientais na oferta de alimento ou durante o ciclo reprodutivo, além de estar afetando, em longo prazo, as populações dessas espécies de morcegos. Além disso, o aumento do diâmetro dos hepatócitos observado é considerado como indicativo de estado patológico [34]. Sendo o fígado o órgão central do metabolismo energético [35], indícios patológicos nos hepatócitos, associados a eventos prejudiciais a diversos tecidos, como um estado de hiperglicemia, além da diminuição de ácidos graxos da carcaça, podem, em conjunto, comprometer a sobrevivência das populações destes animais potencialmente expostos a inseticidas organofosforados.

5. Referências

1. F. P. Carvalho, Agriculture, pesticides, food security and food safety, *Environ. Sci. Policy* 9 (2006) 685-692.
2. A. Yavasoglu, F. Sayim, Y. Uyanikgil, M. Turgut, N. U. Karabay-Yavasoglu, The pyrethroid cypermethrin-induced biochemical and histological alterations in rats liver, *J. Health Sci.*, 52(6) (2006) 774-780.
3. M. O. Al-Jahdali, A. S. B. Bisher, I. M. Abu zeid, Physiological and histological alterations in rats liver induced by Sumithion® NP25/2.5 EC, an insecticide used in dengue fever vector control in Jeddah, Saudi Arabia, *Saudi J.Biol Sci.* 14(1) (2007) 43-51.
4. H. Fetoui, E. M. Garoui, N. Zeghal, Lambda-cyhalothrin-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats: Ameliorative effect of ascorbic acid, *Exp. Toxicol. Pathol.* “in press.”
5. M. Varela-Rey, N. Embade, U. Ariz, S. C. Lu, J. M. Mato, M. L. Martínez-Chantar, Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: Understanding the human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 969-976.
6. R. Rahimi, M. Abdollahi, A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides, *Pestic. Biochem. Physiol.* 88 (2007) 115–121.
7. S. Pournourmohammadi, B. Farzami, S. N. Ostad, E. Azizi, M. Abdollahi, Effects of malathion subchronic exposure on rat skeletal muscle glucose metabolism, *Environ.Toxicol. Pharmacol.* 19 (2005) 191–196.
8. R. Rezg, B. Mornagui, A. Kamoun, S. El-Fazaa, N. Gharbi, Effect of subchronic exposure to malathion on metabolic parameters in the rat, *C. R. Biol.* 330 (2007) 143–147.
9. S. Pournourmohammadi, S. N. Ostad, E. Azizi, M. H. Ghahremani, B. Farzami, B. Minaie, B. Larijani, M. Abdollahi, Induction of insulin resistance by malathion:

Evidence for disrupted islets cells metabolism and mitochondrial dysfunction, *Pestic. Biochem. Physiol.* 88 (2007) 346–352.

10. D. Cova, R. Perego, C. Nebuloni, G. Fontana, G.P. Molinari, In vitro cytotoxicity of fenthion and related metabolites in human neuroblastoma cell lines. *Chemosphere* 30 (1995)1709–1715.

11. D. Bagchi, M. Bagchi, E.A. Hassoun, S.J. Stohs, In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology* 104 (1995) 129–140.

12. M. S. Pereira, R. R. N. Alves, Composição florística de um remanescente de Mata Atlântica na Área de Proteção Ambiental Barra do Rio Mamanguape, Paraíba, Brasil, *Rev.Biol. Cien. Terra*, 6 (1) (2006).

13. C. Mispagel, M. Allinson, G. Allinson, N. Iseki, C. Grant, M. Morita, DDT and metabolites residues in the southern bent-wing bat (*Miniopterus schreibersii bassanii*) of south-eastern Australia, *Chemosphere* 55 (2004) 997–1003.

14. G. Allinson, C. Mispagel, N. Kajiwara, Y. Anan, J. Hashimoto, L. Laurenson, M. Allinson, S. Tanabe, Organochlorine and trace metal residues in adult southern bent-wing bat (*Miniopterus schreibersii bassanii*) in southeastern Australia, *Chemosphere* 64 (2006) 1464–1471.

15. B. S. Bennett, M. L. Thies, Organochlorine pesticide residues in guano of brazilian freetail bats, *Tadarida brasiliensis* Saint-Hilaire, from East Texas, *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 78 (2007)191–194.

16. P. Tavoloni, Diversidade e frugivoria de morcegos filostomídeos (Chiroptera, Phyllostomidae) em habitats secundários e plantios de *Pinus* spp., no município de Anhembi – SP, *Biota Neotropica*, 6(2) (2005) 83.

17. N. R. Reis, A. L Peracchi, W. A. Pedro, I. P. Lima, *Morcegos do Brasil*. Londrina, 2007, 253p.

18. B. Sjörgren, T. Noerdenskjold, H. Holmgeen, J. Mollerstrom, Beitrag zur kenntnis der leberhythmik (glykogen, phosphor und calcium in der kaninchenleber), *Pflugers Arch*, 240 (1938) 247.
19. J. Folch, M. Less, G. H. Slorne Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497.
20. M. Abdollahi, M. Donyavi, S. Pournourmohammadi, M. Saadat, Hyperglycemia associated with increased hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following subchronic exposure to malathion, *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 137C (2004) 343–347.
21. M. M. Lasram, A. B. Annabi, R. Rezg, N. Elj, S. Slimen, A. Kamoun, S. El-Fazaa, N. Gharbi, Effect of short-time malathion administration on glucose homeostasis in Wistar rat, *Pestic. Biochem. Physiol.* 92 (2008) 114–119.
22. P. E. Cryer, Regulation of glucose metabolism in man, *J. Intern. Med.* 229 (1991) 31-39.
23. E. Jéquier, Carbohydrates as a source of energy, *Am. J. Clin. Nutr.* (1994) 682-685.
24. K. Beardsall, K. Yuen, R. Willians, D. Dunger, Applied physiology of glucose control. *Curr. Paediatr.* 16 (2006) 434-438.
25. R. Rezg, B. Mornagui, M. El-Arbi, A. Kamoun, S. El-Fazaa, N. Gharbi, Effect of subchronic exposure to malathion on glycogen phosphorylase and hexokinase activities in rat liver using native PAGE, *Toxicology* 223 (2006) 9–14.
26. M. B. Freitas, A. F. Welker, E. C. Pinheiro, Seasonal variation and food deprivation in common vampire bats (chiroptera: phyllostomidae), *Braz. J. Biol.* 66(4) (2006) 1051-1055.
27. M. C. Wang, E. J. O'Rourke, G. Ruvkun, Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *c. elegans*, *Science* 322 (2008) 957-960.

28. M. M. Lasram, A. B. Annabi, N. El Elj, S. Selmi, A. Kamoun, S. El-Fazaa, N. Gharbi, Metabolic disorders of acute exposure to malathion in adult Wistar rats, J. Hazard. Mater. "in press."
29. I. Celik, H. Suzek, Subacute effects of methyl parathion on antioxidant defense systems and lipid peroxidation in rats, Food Chem. Toxicol. 46 (2008) 2796-2801.
30. R. Rezg, B. Mornagui, S. El-Fazaa, N. Gharbi, Biochemical evaluation of hepatic damage in subchronic exposure to malathion in rats: Effect on superoxide dismutase and catalase activities using native PAGE, C. R. Biol. 331 (2008) 655-662.
31. E. C. Pinheiro, Metabolismo intermediário de morcegos frugívoros. Ph. D. dissertation, University of São Paulo, São Brasil. (1995).
32. M. B. Freitas, A. F. Welker, S. F. Millan, E. C. Pinheiro, Metabolic responses induced by fasting in the common vampire bat *Desmodus rotundus*, Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 173B (2003) 703–707.
33. V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças. Ed. Elsevier (2005) pp. 1504.
34. F. E. L, Pereira, Degenerações. Morte celular. Alterações do Interstício. In: G. B. Filho (Org.), Bogliolo Patologia Geral. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1993, p 220.
35. E. P. Corssmit, J. A. Romijn, H. P. Sauerwein, Regulation of glucose production with special attention to nonclassical regulatory mechanisms: a review. Metabolism, 50 (7) (2001) 742-755.

Capítulo 2

Efeitos da ingestão de alimento contaminado com inseticida espinosade sobre o metabolismo energético e tecido hepático de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus*.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição aguda ao inseticida espinosade no metabolismo energético e na morfologia do tecido hepático de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus*. Os animais dos grupos tratados com espinosade receberam diariamente fruta contaminada através de imersão em solução contendo o inseticida (0,1 mL/L) e espalhante adesivo (3mL/L). Foram analisadas as concentrações de glicose plasmática e de glicogênio, proteína e lipídio hepáticos e musculares, concentração de lipídios do tecido adiposo e ácidos graxos totais da carcaça, além do diâmetro dos hepatócitos. A única alteração metabólica observada foi diminuição na concentração lipídica das patas posteriores. Foi observado aumento do diâmetro dos hepatócitos dos animais do grupo tratado. Os resultados deste estudo demonstram que o inseticida espinosade, em sua dose recomendada, não altera o padrão do metabolismo energético de morcegos frugívoros, mas pode estar afetando diretamente a estrutura e funções específicas dos hepatócitos.

Palavras-chave: Metabolismo, *Artibeus*, morcegos, glicemia, hepatócito, espinosade.

1. Introdução

O espinosade é um inseticida natural novo, derivado da fermentação do actinomiceto do solo *Sacharopolyspora spinosa*. Este inseticida é formado por dois componentes ativos principais, a espinosina A e espinosina D [1, 2], e representa uma nova classe de pesticidas com um modo de ação diferente dos comumente utilizados até o momento [3-6]. Apesar de também atuar causando excitação do sistema nervoso e no músculo esquelético o mecanismo de ação deste novo pesticida é caracterizado pela ativação de receptores nicotínicos para acetilcolina, assim como efeitos nos receptores do ácido γ -amino butírico (GABA), diferentemente do mecanismo de ação sobre a enzima acetilcolinesterase conhecida dos organofosforados [7].

Inseticidas da classe das espinosinas são utilizados principalmente em culturas de algodão, batata, plantas frutíferas, tabaco e vegetais folhosos, possuindo grande eficácia no combate a organismos-alvo, mesmo quando utilizado em baixas concentrações. Tem sido veiculado ainda que as espinosinas apresentem baixa toxicidade à maioria dos insetos benéficos e podem ser rapidamente degradadas no ambiente [3, 4]. Devido a essas características, esses compostos têm sido encarados como novos agentes que podem substituir alguns inseticidas mais tóxicos no controle de determinadas pragas.

Por ser utilizado em culturas de plantas frutíferas, este composto pode estar em contato com organismos não-alvo, como animais silvestres que forrageiam nessas plantações, dentre eles, os morcegos frugívoros do gênero *Artibeus*, que são considerados cruciais para a dinâmica de florestas tropicais, por atuarem como dispersores de sementes [8]. Pela importância ecológica atribuída a estas espécies, um eventual prejuízo à sobrevivência destes animais poderia causar grande impacto no equilíbrio natural de ecossistemas como a Mata Atlântica, onde esses morcegos ocorrem [9-10].

Apesar de alguns trabalhos relatarem resíduos de pesticidas em tecidos de morcegos silvestres, nenhum estudo publicado até o momento se propôs a avaliar aspectos fisiológicos relacionados à toxicidade de pesticidas em espécies de morcegos [11], além disso, muitas outras classes de agroquímicos, como as espinosinas, ainda são pouco investigadas quanto aos efeitos sobre os processos metabólicos e celulares em animais silvestres. Desta forma, o presente trabalho

buscou avaliar os efeitos da ingestão de frutas contaminadas com espinosade em dosagem comercial, no metabolismo energético e na morfologia dos hepatócitos de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus*, visando trazer uma alternativa de escolha dos produtores no uso de inseticidas menos tóxicos em determinadas culturas.

2. Material e métodos

2.1 Agroquímicos

Foi utilizado para o presente estudo o inseticida espinosade e o espalhante adesivo polioxietileno alquil fenol éter (200g/L).

2.2 Animais e tratamento

Morcegos machos das espécies *Artibeus lituratus* e *Artibeus fimbriatus* foram capturados no campus da Universidade Federal de Viçosa/MG, Mata do Paraíso, Viçosa/MG e na fazenda do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Araponga/MG. Animais, pesando entre 64-73 g, foram mantidos em gaiolas individuais, em uma sala com pouca iluminação, em temperatura ambiente e com ciclo de dia e noite natural realizado por uma pequena abertura na janela. Os animais foram divididos em dois grupos, sendo um grupo controle alimentado com fruto tratado com espalhante adesivo (N=6) e um grupo tratado durante 7 dias que recebeu Espinosade (N=7). As frutas ainda inteiras (\approx 400 g) foram imersas em calda contendo espalhante adesivo 10% e inseticida na concentração de 3 mL/L e de 0,1 mL/L, respectivamente, e mantidas suspensas em recipiente adaptado para que não tocassem em nenhuma superfície, evitando assim, a perda da camada do inseticida por contato. As frutas partidas ao meio (aproximadamente 200 g) foram oferecidas aos animais, com a casca voltada para cima, de modo a reproduzir, da maneira mais fiel possível, a situação enfrentada pelos morcegos na natureza. Os animais foram alimentados sempre às 18 h sendo oferecida água *ad libitum*.

2.3 Amostragem

Ao final de cada tratamento, os animais foram eutanasiados por decapitação, e o sangue foi rapidamente coletado em tubos heparinizados. Os tecidos foram retirados, separados com peso \geq 200 mg para cada dosagem, e congelados em temperatura de -20° C.

2.4 Determinação da glicemia

Para a determinação da glicemia, o sangue coletado foi centrifugado (2000 rpm/ 15 minutos) para separação do plasma e posteriormente armazenado em congelador a -20°C. A glicemia foi determinada pelo método enzimático da glicose-oxidase - GLUCOX 500 (DOLES).

2.5 Glicogênio hepático e do músculo peitoral

Para as determinações de glicogênio hepático e do músculo peitoral, uma porção conhecida 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 Na₂SO₄ 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 [12].

2.6 Determinação da proteína tecidual

Para a determinação da proteína total hepática e muscular (músculo peitoral e das patas anteriores e posteriores), uma porção conhecida do fígado e dos músculos foi homogeneizada com solução fisiológica 0,9 %. Posteriormente foi utilizado o método colorimétrico através do Kit *BCA Protein Assay Reagent* (BCA-PIERCE).

2.7 Determinação dos lipídios totais

Para a determinação dos lipídios totais do fígado, tecido adiposo e muscular (músculo das patas anteriores e posteriores e músculo peitoral), uma porção conhecida desses tecidos foi retirada e homogeneizada com um volume conhecido de solução clorofórmio-metanol (2:1) [13]. Após filtração e separação das fases por adição de solução fisiológica a 0, 9%, uma alíquota da fase clorofórmica (10 mL) foi utilizada para a determinação dos lipídios totais.

2.8 Análise histológica

Porções do fígado foram coletadas e imediatamente fixadas em Formalina de Carson. Os fragmentos passaram por procedimento padrão de desidratação e foram incluídos em glicol-metacrilato (Historesin®, Leica). Foram feitas secções de 2µm

de espessura e as preparações foram coradas com Azul de Toluidina-borato de sódio 1%. As secções foram examinadas em microscópio de luz com objetiva de 40x e determinado o diâmetro celular e área nuclear com o software Image-Pro Plus 4.5.

2.9 Análise estatística

Os dados foram apresentados na forma de Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Para análise dos resultados foi utilizado o teste-t. Para dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. O critério de significância foi de 5 % ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Glicemia

Não foi observada alteração na concentração plasmática de glicose (mmol/L) nos animais tratados com espinosade ($6,87 \pm 0,79$) em relação ao grupo controle ($7,66 \pm 1,14$) (Figura 1).

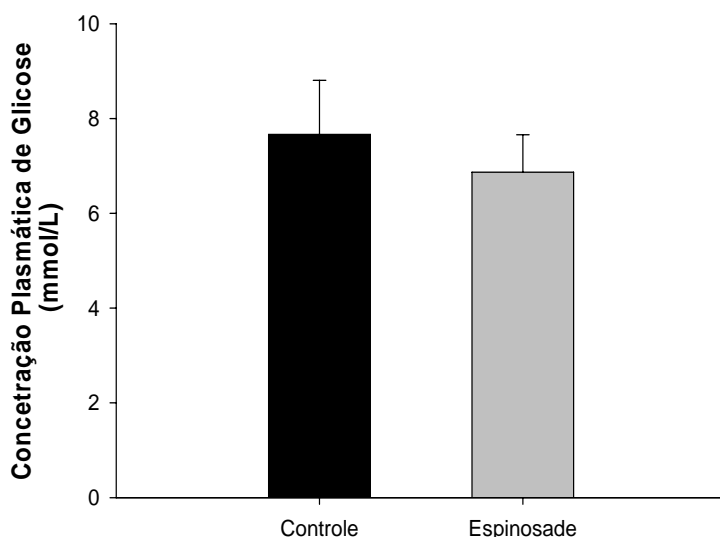


Fig. 1 Concentrações plasmática de glicose (mmol/L) de animais do grupo controle e do grupo tratado com inseticida espinosade por 7 dias (0,1 mL/L) na alimentação. Os resultados estão expressos em média \pm EPM.

3.2 Glicogênio peitoral e hepático

Não foi observada diferença significativa nas concentrações de glicogênio hepático e muscular (Figura 2).

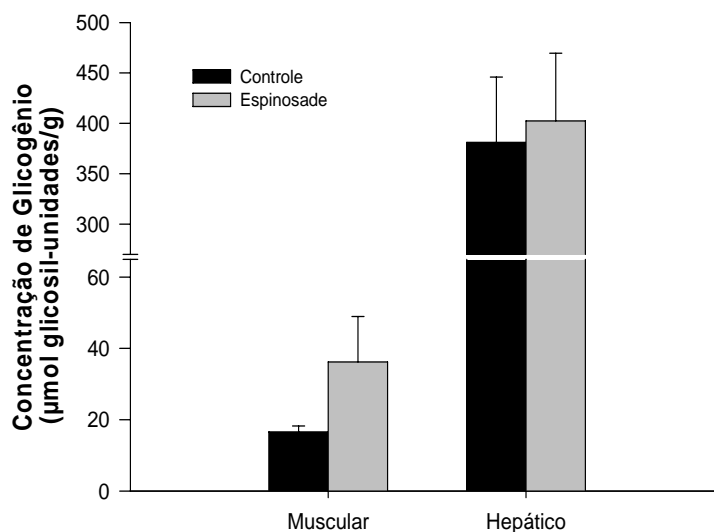


Fig. 2 Concentrações de glicogênio muscular e hepático em animais controle e tratados com espinosade por 7 dias. Os resultados estão expressos em média \pm EPM.

3.3 Proteína total

A concentração total de proteína no fígado, músculo peitoral e músculo das patas anteriores e posteriores não diferiu significativamente entre os grupos tratados como se observa na Tabela 1.

Tabela 1
Concentrações de proteínas totais dos tecidos avaliados do grupo controle e sob exposição ao pesticida espinosade (g/100g)

| | Músculo da pata Anterior | Músculo da pata Posterior | Fígado | Músculo Peitoral |
|------------|--------------------------|---------------------------|------------------|------------------|
| Controle | 7,46 \pm 0,41 | 8,70 \pm 0,96 | 11,43 \pm 1,37 | 9,17 \pm 0,82 |
| Espinosade | 9,54 \pm 0,85 | 6,69 \pm 0,55 | 12,80 \pm 0,86 | 10,50 \pm 0,77 |

Os valores estão expressos em média \pm EPM.

3.4 Lipídios totais

Analisando os lipídios totais (g/100g) dos grupos controle e tratado, respectivamente, no músculo peitoral (6,61 \pm 0,44 e 6,73 \pm 0,51) e no fígado (5,69 \pm

0,47 e $7,46 \pm 1,35$) não foram observadas diferenças significativas. Do mesmo modo, os lipídios totais do músculo das patas anteriores (PA) ($5,51 \pm 0,50$ e $4,43 \pm 0,56$) e do tecido adiposo ($53,63 \pm 1,20$ e $39,91 \pm 6,34$), não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Os lipídios totais do músculo das patas posteriores (PP) ($7,01 \pm 0,31$ e $4,26 \pm 0,83$) apresentaram redução nos animais tratados com espinosade em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 3).

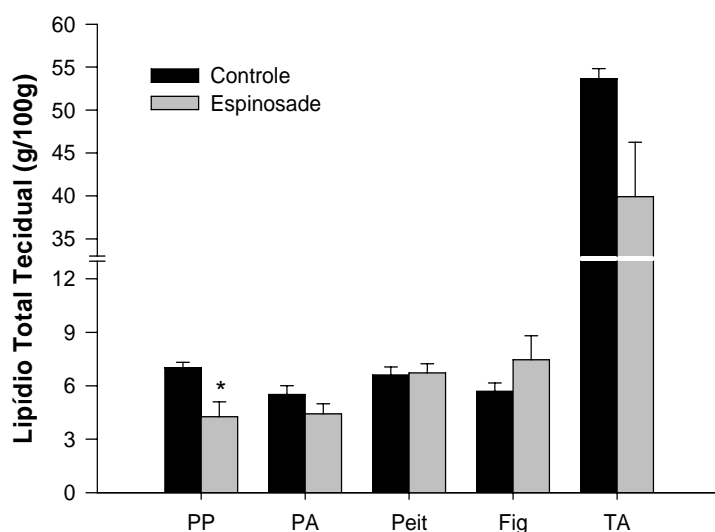


Fig. 3 Concentrações de lipídios nos músculos da pata posterior (PP), pata anterior (PA) e peitoral (Peit), fígado (Fig) e tecido adiposo (TA) (g/100g) de animais do grupo controle e do grupo tratado com inseticida espinosade através de imersão dos alimentos fornecidos. Os resultados estão expressos em média \pm EPM. *significativamente diferente do controle ($p < 0,05$).

3.5 Alterações morfológicas dos hepatócitos

O tecido hepático do grupo controle apresentou estrutura histológica padrão para mamíferos, com os cordões e lóbulos hepáticos em arranjo normal assim como os vasos sanguíneos. Os hepatócitos não apresentaram gotículas de lipídios no citoplasma. O diâmetro celular médio foi de $16,83 \pm 0,25 \mu\text{m}$ e a área nuclear média foi $33,02 \pm 2,62 \mu\text{m}^2$. O diâmetro dos hepatócitos nos animais tratados com inseticida espinosade apresentou aumento de 16% ($p < 0,05$) ($19,47 \pm 0,26 \mu\text{m}$) e ainda, não houve diferença significativa na área nuclear ($33,29 \pm 1,58 \mu\text{m}^2$) em relação ao controle. Os hepatócitos deste grupo apresentavam vacuolização no citoplasma (Figura 4).

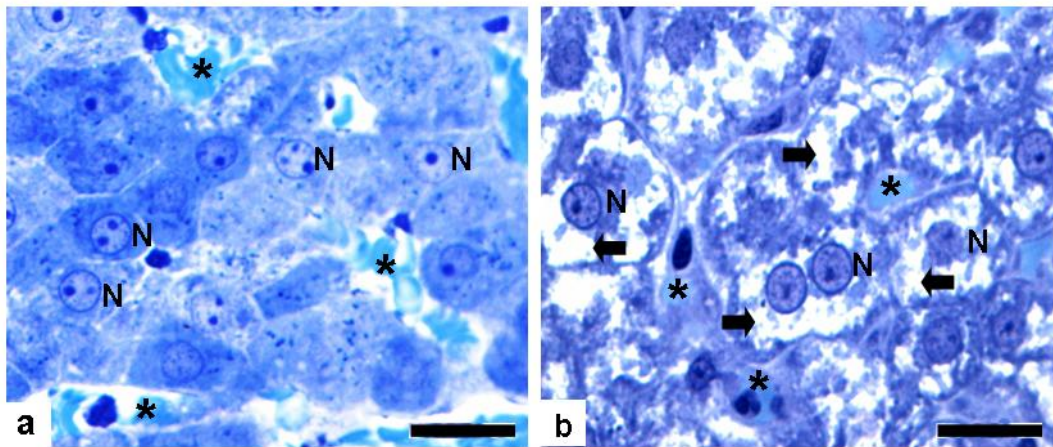


Fig. 4. Fotomicrografia de secções histológicas do fígado de *Artibeus* spp. Corados com Azul de Toluidina 1%. Controle (a), Espinosina (b). Núcleo (N), vaso sanguíneo (*), vacuolização (➡). — 20 μ m

4. Discussão

A avaliação dos padrões metabólicos de morcegos do gênero *Artibeus* submetidos à alimentação contaminada com espinosade demonstra que inseticida espinosade parece não estar associado aos mecanismos regulatórios da homeostase glicêmica de mamíferos. O nível plasmático de glicose é o primeiro sinal de alteração no metabolismo energético, pois vários os compostos energéticos podem ser convertidos em glicose para fornecer energia às células [14]. Aparentemente, parece não haver influência das espinosinas sobre os níveis glicêmicos, diferentemente de outras classes de inseticidas, como a dos organofosforados [15, 16]. No presente estudo, morcegos tratados com espinosade durante 7 dias não apresentaram alterações nas concentrações do glicogênio, hepático ou muscular. Este resultado demonstra que o inseticida espinosade não interferiu nos mecanismos regulatórios da homeostase glicêmica em *Artibeus* spp. diferentemente do encontrado para inseticidas organofosforados em ratos [15-18].

Assim como ocorreu com os níveis glicêmicos, as concentrações teciduais de proteína não apresentaram alterações pela ingestão de alimento contaminado com espinosade, uma vez que não foi observada mobilização desta fonte energética nos tecidos analisados (hepático e muscular). Em relação às reservas lipídicas, as concentrações de gordura na maior parte dos tecidos testados (músculo das patas anteriores, peitoral, do fígado e do tecido adiposo) parecem não sofrer influência do espinosade, uma vez que não foram observadas variações nestas concentrações, com a única exceção para os músculos das patas posteriores, que apresentaram diminuição significativa em seu conteúdo lipídico. Esta diminuição poderia ser resultado de mobilização de triacilgliceróis para fornecimento de ácidos graxos para ser convertido em energia.

Em relação às análises morfológicas, é interessante destacar que o aumento do diâmetro dos hepatócitos deve-se, provavelmente, ao acúmulo de água promovendo vacuolização e conseqüentemente hipertrofia dessas células. O acúmulo intracelular de substâncias em quantidades anormais é considerado uma manifestação de transtorno metabólico, podendo levar a lesões celulares crônicas e ainda à morte celular. A degeneração hidrópica, caracterizada pelo acúmulo de eletrólitos e água no

interior dos hepatócitos, é uma lesão não letal bastante comum, ocorrendo em resposta a diversos tipos de agressão [19].

Alguns poucos estudos relacionados com intoxicação de mamíferos por espinosade relatam pequenas alterações no peso de determinados órgãos como fígado, coração, rins e baço. No entanto, estes resultados aparecem somente em animais tratados com altas dosagens do pesticida (100 mg/kg/dia) [7]. Outros estudos avaliando o potencial carcinogênico do espinosade em ratos também evidenciam os riscos desta classe de inseticida, demonstrando que alterações celulares tornam-se mais abundantes (inflamações e degeneração celular, seguida ou não de regeneração) à medida que as dosagens aumentam [2]. Estudos realizados com fêmeas grávidas de ratos e coelhos submetidos ao espinosade demonstraram que os animais não sofreram alterações no peso corporal total, tanto das mães quanto dos fetos, além de não apresentarem alterações no desenvolvimento e no peso de determinados órgãos (fígado e cérebro, por exemplo), sendo relatados distúrbios pontuais somente nos casos de intoxicação por doses elevadas (200 mg/kg/dia e 50 mg/kg/dia para ratos e coelhos, respectivamente) [20]. No entanto, as doses que causam estes distúrbios nem sempre são as aplicadas na agricultura, o que parece indicar que o espinosade, em baixa dosagem, não tem se mostrado prejudicial a organismos não-alvo, como mamíferos.

Em conclusão, podemos dizer que o inseticida espinosade, que surgiu como composto natural alternativo, não apresenta efeitos no armazenamento ou mobilização das reservas energéticas de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* em sua dose de aplicação recomendada, não representando risco elevado, em uma primeira análise, à regulação do metabolismo energético destes animais. Além disso, as alterações histológicas encontradas no hepatócito corroboram a ausência de efeitos metabólicos, sendo necessários maiores estudos nesse sentido. Os resultados do presente estudo demonstram que inseticidas do grupo das espinosinas podem vir a substituir outras classes de inseticidas de toxicidade mais elevada utilizadas em larga escala, representando um risco menor para organismos não-alvo, como animais silvestres, que atuam diretamente no equilíbrio dos ecossistemas.

5. Referências

1. F. P. Mertz, R. C. Yao, *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. isolated from soil collected in a sugar mill rum still, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40 (1990) 34-39.
2. B. L. Yano, D. M Bond, M. N. Novilla, L. G. McFadden, M. J. Reasor, Spinosad insecticide: Subchronic and chronic toxicity and lack of carcinogenicity in Fischer 344 rats, *Toxicol. Sci.* 65 (2002) 288–298.
3. H. A. Kirst, K. H. Michel, J. S. Mynderse, E. H. Chio, R. C. Yao, W. M. Nakatsukasa, L. D. Boeck, J. L. Occlowitz, J. W. Paschal, J. B. Deeter, G. D Thompson, Discovery, isolation, and structure elucidation of a family of structurally unique, fermentation-derived tetracyclic macrolides. In: D. R. Baker, J. G. Fenyes, J. J. Steffans (Eds.), *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III*, American Chemical Society, Washington, DC, 1992, pp. 214–225.
4. C. V. DeAmicis, J. E. Dripps, C. J. Hatton, L. L. Karr, Physical and biological properties of the spinosyns: Novel macrolide pest-control agents from fermentation. In: P. A. Hedin, R. M. Hollingworth, E. P. Masler, J. Miyamoto, D. G. Thompson (Eds.), *Phytochemicals for Pest Control*, Symposium Series 658 American Chemical Society, Washington, DC, 1997, pp. 144–154.
5. V. L. Salgado, Studies on the mode of action of Spinosad: Insect symptoms and physiological correlates, *Pestic. Biochem. Physiol.* 60 (1998) 91-102.
6. V. L. Salgado, J. J. Sheets, G. B. Watson, A. L. Schmidt, Studies on the mode of action of Spinosad: The internal effective concentration and the concentration dependence of neural excitation, *Pestic. Biochem. Physiol.* 60 (1998) 103-110.
7. T. R. Hanley, Jr; W. J. Breslin, J. F. Quast, E. W. Carney, Evaluation of spinosad in a two generation dietary reproduction study using sprague-dawley rats, *Toxicol. Sci.* 67 (2002) 144–152.
8. P. Tavaloni, Diversidade e frugivoria de morcegos filostomídeos (Chiroptera, Phyllostomidae) em habitats secundários e plantios de *Pinus* spp., no município de Anhembi – SP, *Biota Neotropica*, 6(2) (2005) 83.

9. R. M. Timm, "The mammal fauna". *In*: L. A. Mcdade, K. S. Bawa, H. A. Hespenheide, G. S. Hartshorn, *La Selva: Ecology and natural history of a neotropical rain forest*. Chicago, University of Chicago Press, (1994) pp 229-237.
10. N. R. Reis, A. L. Peracchi, W. A. Pedro, I. P. Lima, *Morcegos do Brasil*. Londrina, (2007) 253p.
11. Hamilton-Smith, E., 2000. Report on current changes in biodiversity of the Bat Cave, Naracoorte World Heritage area, Department of the Environment and Heritage.
12. B. Sjörgren, T. Noerdenskjold, H. Holmgeen, J. Mollerstrom, Beitrag zur kenntnis der leberhythmik (glykogen, phosphor und calcium in der kaninchenleber), *Pflugers Arch*, 240 (1938) 247.
13. J. Folch, M. Less, G. H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497.
14. R. C. Nordlie, J. D. Foster, A. J. Lange, Regulation of glucose production by the liver, *Annu. Rev. Nutr.* 19 (1999) 379-406.
15. M. Abdollahi, M. Donyavi, S. Pournourmohammadi, M. Saadat, Hyperglycemia associated with increased hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following subchronic exposure to malathion, *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 137C (2004) 343–347.
16. R. Rezg, B. Mornagui, A. Kamoun, S. El-Fazaa, N. Gharbi, Effect of subchronic exposure to malathion on metabolic parameters in the rat, *C. R. Biol.* 330 (2007) 143–147.
17. R. Rahimi, M. Abdollahi, A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides, *Pestic. Biochem. Physiol.* 88 (2007) 115–121.
18. S. Pournourmohammadi, S. N. Ostad, E. Azizi, M. H. Ghahremani, B. Farzami, B. Minaie, B. Larijani, M. Abdollahi, Induction of insulin resistance by malathion:

Evidence for disrupted islets cells metabolism and mitochondrial dysfunction, *Pestic. Biochem. Physiol.* 88 (2007) 346–352.

19. F. E. L. Pereira, Degenerações. Morte celular. Alterações do Interstício. In: G. B. Filho (Org.), *Bogliolo Patologia Geral*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1993, p 220.

20. W. J. Breslin, M. S. Marty, U. Vedula, A. B. Liberacki, B. L. Yano, Developmental toxicity of Spinosad administered by gavage to CD1 rats and New Zealand White rabbits, *Food and Chem. Toxicol.* 38 (2000) 1103-1112.

Conclusões gerais

Os resultados obtidos são únicos, já que se utilizaram animais silvestres potencialmente em contato com agroquímicos na natureza, sendo que a maior parte dos trabalhos utiliza roedores como alvos de estudo. Vários estudos divergem ainda quanto à metodologia de exposição ao pesticida, como injeção intraperitoneal ou via oral, que induzem respostas mais diretas, mas não necessariamente apresentam uma reprodução fiel do consumo de agrotóxicos por animais ou humanos.

A aplicação de fentiona, na dose recomendada, provocou alterações metabólicas somente na reserva lipídica da carcaça e na reserva de glicogênio do músculo peitoral, indícios patológicos nos hepatócitos, associados a eventos prejudiciais a diversos tecidos, como um estado de hiperglicemia, além da diminuição de ácidos graxos da carcaça, podem, em conjunto, comprometer a sobrevivência das populações destes animais potencialmente expostos a inseticidas organofosforados.

Outro resultado importante obtido neste estudo foi de que o inseticida natural espinosade, provoca danos menores ao tecido hepático e ainda não parece afetar o metabolismo energético quando comparados com inseticida químico fentiona. Pode-se inferir ainda, que a aplicação de inseticidas fentiona pode promover um declínio nas populações de morcegos frugívoros devido ao diversos danos que este inseticida pode causar no organismo destes animais, e ainda, que o inseticida espinosade pode vir a substituir a aplicação de outras classes de inseticidas mais tóxicas contra determinadas pragas, podendo proporcionar a conservação de espécies não-alvo importantíssimas para a manutenção dos ecossistemas.