

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

JULIO CESAR NEVES DE ALMEIDA

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA RENAL DE NEONATOS DE *Podocnemis unifilis*  
(TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE) EXPOSTOS AO FIPRONIL E AO  
GLIFOSATO DURANTE A INCUBAÇÃO DOS OVOS**

UBERLÂNDIA  
2019

**JULIO CESAR NEVES DE ALMEIDA**

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA RENAL DE NEONATOS DE *Podocnemis unifilis*  
(TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE) EXPOSTOS AO FIPRONIL E AO  
GLISOFASATO DURANTE A INCUBAÇÃO DOS OVOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Médico Veterinário.

**Orientador:** Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos

**Coorientadoras:** MSc. Juliana dos Santos Mendonça e Thaís Aparecida Silva

UBERLÂNDIA  
2019

**JULIO CESAR NEVES DE ALMEIDA**

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA RENAL DE NEONATOS DE *Podocnemis unifilis*  
(TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE) EXPOSTOS AO FIPRONIL E AO  
GLISOFASATO DURANTE A INCUBAÇÃO DOS OVOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Médico Veterinário.

**Orientador:** Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos

**Coorientadoras:** MSc. Juliana dos Santos Mendonça e M. V. Thaís Aparecida Silva

---

Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos

---

Prof. Dra. Lucélia Gonçalves Vieira

---

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA

2019

*Dedico esta e todas as outras minhas  
conquistas à Deus e aos meus amados pais.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Deus, pela oportunidade e por me sustentar durante todo o meu desenvolvimento, não só como pesquisador, mas como indivíduo.

Gostaria de agradecer meus pais, Marcos e Irene, os nomes mais importantes desse agradecimento. Que sempre lutam por mim, que sempre valorizaram minha educação e deram todo o suporte para que eu pudesse ser quem sou hoje. À minha irmã, Jaqueline, com quem compartilho uma conexão fortíssima e essa conexão me ajudou em diversos momentos. À minha avó Ana e à minha falecida avó Darci, que sempre mostraram o significado de amor. E aos familiares, que sempre se lembram e torcem por mim. À Tay, minha cachorra, uma grande motivação de me tornar um bom Médico Veterinário.

Agradeço ao meu amigo Lucas, grande amigo desde minha infância e que mesmo que estejamos traçando caminhos diferentes, sempre temos o cuidado de se importar um com o outro. Juntamente com amigos demasiadamente especiais: Flávia, Vitória, Maria, Juliana Riello, João e companhia.

Agradeço à Taymara, que me mostrou muito mais do mundo que eu conhecia, que me mostrou muito do que eu poderia ser.

Agradeço à Bruna, uma pessoa extremamente especial que apareceu em minha vida, junto dos meus amigos: Juliana Okubo, Letícia, Tanajé, Beatriz, Fernanda, Dandara, Geovanna, Sthéfany e companhia, que tornaram essa importante etapa da vida mais leve e com muito mais amor, aceitação e carinho.

Agradeço à Carolina Salomão, uma grande pesquisadora, coordenadora, que me inseriu no mundo da ciência de forma mais íntegra e com muita paciência. Juntamente, agradeço à todos do laboratório de Imunoparasitologia da UFU: Tamires, David, Lucas, Heber, Flávia, Vanessa R., Vanessa M., Eliézer, Caroline, Professor Tiago, Professora Fernanda, Cristina, Ana Cláudia, Fernando e Amanda.

Agradecimentos aos residentes Pedro, Nathana, Nataly, André e Marcela que tanto me ensinam, são gentis, acolhedores e dedicados à causa.

Agradeço ao Henrique, grande amigo que a vida me apresentou, com quem compartilhei ótimos momentos e conhecimentos no mundo da pesquisa e além.

Agradeço ao meu orientador, Professor André, que me recebeu prontamente em no Setor de Animais Sívstres e me direcionou para que todo esse trabalho pudesse ser realizado.

Agradeço à minha coordenadora e amiga, Juliana Mendonça, que esteve ao meu lado em cada processo do desenvolvimento deste trabalho e me ajudou a desenvolver-me como pesquisador e como pessoa.

*“O amor é a força mais sutil do mundo”. – Mahatma Gandhí*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1	<i>Podocnemis unifilis</i> .....	11
2.2	Glifosato e Fipronil.....	12
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1	Local de coleta.....	15
3.2	Incubação.....	15
3.3	Coleta de Materiais Biológicos.....	17
3.4	Histologia.....	17
3.4.1	Leitura e Análise das Lâminas.....	17
3.5	Análise de dados.....	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5	CONCLUSÃO.....	26
6	REFERÊNCIAS.....	27

## Resumo

Com o avanço da atividade agrícola, o uso de agrotóxicos têm aumentado para viabilizar a produção de acordo com a crescente demanda de produtos agrícolas. O uso indiscriminado de agrotóxicos promove a contaminação dos recursos hídricos colocando em risco diversas espécies aquáticas. Estudos de ecotoxicidade com pesticidas envolvendo anfíbios e répteis têm avaliado a exposição a esses compostos, reforçando a importância de entender como as formulações comerciais podem estar afetando habitat natural e o desenvolvimento desses animais. Dessa forma, o presente trabalho propôs a avaliação histopatológica renal de neonatos de Tracajá (*Podocnemis unifilis*), expostos a agrotóxicos (Glifosato e Fipronil) durante o período de incubação. Os animais foram submetidos a contenção física e subsequente eutanásia, posteriormente, foram coletadas amostras de rins, fixação em formalina a 10% e processados de acordo com a rotina histológica. Por meio de análises histopatológicas, observou-se e inferiu-se alterações na área glomerular e do espaço glomerular renal dos animais expostos aos agrotóxicos, sendo que em ambas mensurações, os grupos expostos aos agrotóxicos apresentaram maior área e espaço glomerular em comparação aos não expostos. Além disso, foram também observadas degeneração gordurosa dos rins animais expostos ao inseticida, Fipronil.

**Palavras-Chave:** Ecotoxicologia; Tracajá; Agrotóxicos; Histologia; Rim.

## **Abstract**

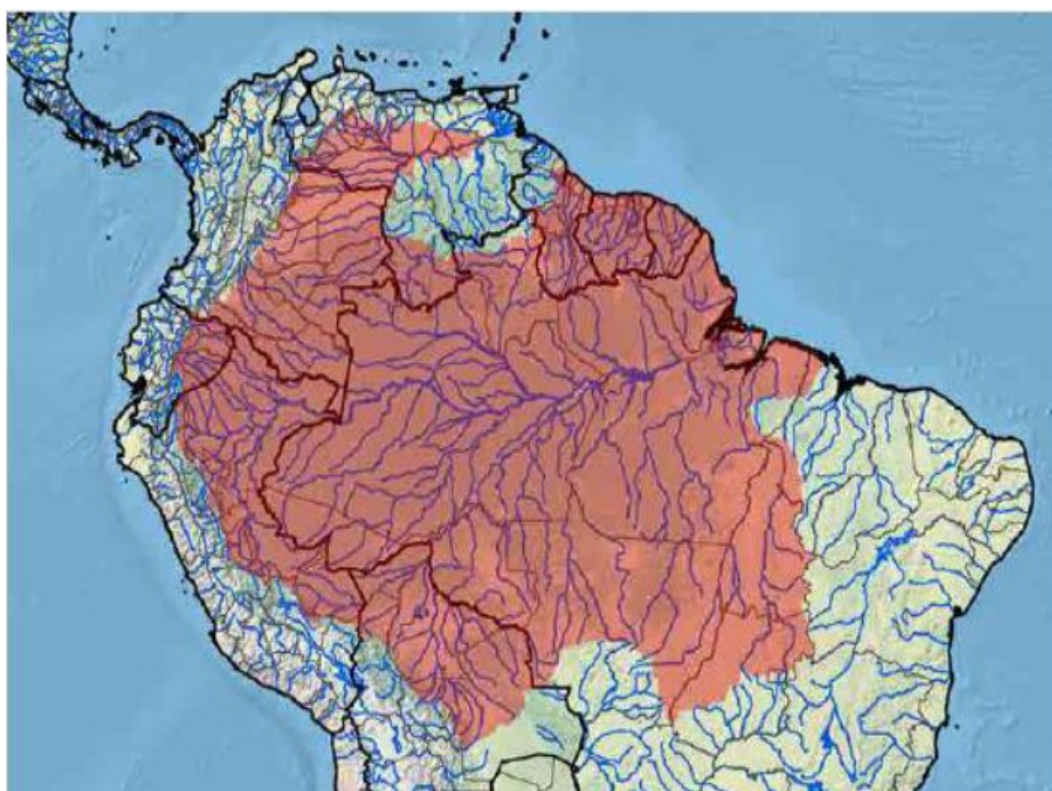
The progress in agricultural activity is associated with the increase agrochemicals utilization, which insures the quality products once there is an augment on demand for agriculture products. The pesticides have been used indiscriminately resulting in water resources contamination, and endangering of several aquatic species. Studies conducted with amphibians and reptiles have been evaluating the ecotoxicity of pesticides, reinforcing the importance of understanding how commercial formulations may be affecting the natural habitat and even the development of these animals. Therefore, the present work aims to evaluate the renal histopathology in newborns of Tracajá (*Podocnemis unifilis*) exposed to pesticides (Glyphosate and Fipronil) during incubation period. The animals were subjected to physical restraint and subsequent euthanasia, followed by the obtainment of the kidneys, with 10 % formalin fixation and processed according to the histological routine. Through the histological analysis, we observed and inferred distortions in the glomerular area and the urinary space of animals exposed to pesticides. All groups exposed to pesticides presented larger glomerular area and urinary space compared to the control group. Furthermore, fatty degeneration was observed in kidneys of the animals exposed to Fipronil.

**Keywords:** Ecotoxicology; Tracajá; Pesticides; Histology; Kidneys.



## 1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Podocnemis*, como a tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) e o Tracajá (*Podocnemis unifilis*), pertencentes à família Podocnemididae e a ordem dos Testudines, são répteis que apresentam ampla distribuição nos rios da bacia hidrográfica do rio Amazonas. Além da região Norte, do Mato Grosso e de Goiás (Brasil), se distribui por diversos países da América do Sul, como Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Peru, Bolívia, Equador, Venezuela e Colômbia (Figura 1) (VANZOLINI, 2001; CASTRO, 2008; VOGT, 2008; BUHLMANN et al., 2009; AGOSTINI, 2016).



**Figura 1: Distribuição geográfica da espécie *Podocnemis unifilis*.** A área em delimitada em vermelho representa a distribuição geográfica da espécie *Podocnemis unifilis*. Fonte: Van Djik et al., 2014.

Os Tracajás encontram-se na lista vermelha da International Union for Conservation Nature's (IUCN, 2016), classificada como vulnerável (Figura 2). Esses animais apresentam altos valores de diversidade genética (AGOSTINI, 2016), o que salienta a importância da preservação dessa diversidade.



**Figura 2: *Podocnemis unifilis* (IUCN) – Categorias de vulnerabilidade.** A espécie *Podocnemis unifilis* é classificada como vulnerável na lista vermelha da IUCN (International Union for Conservation Nature's). Fonte: IUCN, 2016.

A vulnerabilidade da espécie apresenta-se preocupante, apesar dos trabalhos de conservação sobre fatores prejudiciais à eclosão (NETO, 2008). De acordo com Coway-Gomes (2007), a caça, degradação dos ninhos e do habitat desses animais, tem sido fatores determinantes para o declínio da espécie. Além disso, a agricultura de monocultivos tem demandado grandes porções de terra para produção, o que estimula o avanço de ocupação de novas terras, consequentemente um grande desmatamento (LIMA, 2015). Esse modelo de plantio de monocultivos é dependente de agrotóxicos e fertilizantes, principalmente para diminuir o custo final de produção que é diluído em virtude do aumento da produção (SANCHES et al., 2003; PERES et al., 2005; LIMA, 2015). De acordo com estudos feitos por Rangel (2011), o mau uso dos agrotóxicos está relacionado com as práticas relatadas pelos agricultores e tem levado a diversos efeitos nocivos à saúde e à contaminação ambiental.

Esse trabalho visou realizar análises histopatológicas renais de neonatos de *Podocnemis unifilis*, cujos ovos foram expostos aos agrotóxicos Glifosato e Fipronil.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Podocnemis unifilis*

Os Tracajás se diferenciam de outras espécies do gênero devido suas manchas alaranjadas próximas ao amarelo na cabeça dos machos adultos, ou dos animais jovens (Figura 3). As fêmeas são maiores que os machos e têm a cabeça cor marrom ferrugem uniformemente distribuída (VOGT, 2008).



**Figura 3: Fotografia de neonato *Podocnemis unifilis*.** Evidenciação das manchas alaranjadas em animais jovens. Fonte: Arquivo pessoal, foto realizada no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Selvagens (LAPAS).

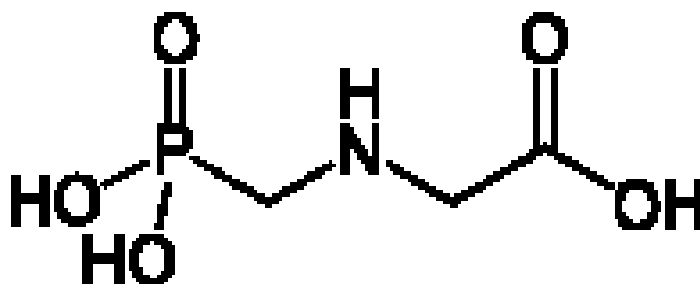
As espécies do gênero *Podocnemis* buscam por terrenos arenosos para a nidificação, emergindo no período das secas, sendo que a desova ocorre entre os meses de julho a outubro. Devido a energia solar, a temperatura dos ninhos é controlada de acordo com a profundidade da câmara de ovos, pelas características texturais e minerais do terreno arenoso. Os tracajás fazem ninhos entre 10 a 20 centímetros da superfície arenosa e ovipõe entre 10 a 25 ovos, enquanto os ninhos da tartaruga-da-amazônia têm uma maior postura (40 a 160 ovos) e seus ninhos são mais profundos (50 a 70 centímetros) (CASTRO, 2008).

Assim como outros Testudines, *P. unifilis* possuem maturidade sexual tardia, com alta mortalidade de juvenis, baixa mortalidade de indivíduos adultos e longevidade maior do que a comum (Turtle Conservation Found, 2012). Para a maioria dos animais de mesma Ordem, a maturidade sexual se dá a partir dos sete anos de vida, correlacionada diretamente ao tamanho corporal. A grande longevidade pode estar associada à baixa taxa de reposição dos indivíduos, evidenciando assim características que a expõe a elevado risco de extinção, principalmente com interferência humana, como a expansão das fronteiras agrícolas, caça, comercialização e consumo dos animais (CAGLE, 1950; FERRI, 2002; FARIA, 2018).

## 2.2 Glifosato e Fipronil

O glifosato [N-(fosfonometil)glicina] (Figura 4) é um herbicida sistêmico, não seletivo, muito utilizado na agricultura. No Brasil e no mundo, é o princípio ativo mais utilizado em agrotóxicos, principalmente pelo fato de plantas transgênicas serem resistentes ao composto (DANIELE et al., 1997; LATORRE et al., 2013). O Glifosato inibe a atividade da enzima 5-enolpiruvisticato-3-fosfato sintase, que catalisa a síntese de aminoácidos aromáticos em plantas, sendo então considerado seguro para animais (DANIELE et al., 1997; PAVANI, 2016). Porém, o acúmulo do agrotóxico têm causado impactos severos ao meio ambiente e à saúde humana (PALMA, 2011; VERA et al. 2013).

O Glifosato são agentes genotóxicos, fazendo parte dos organofosforados que possuem afinidade de ligação com o material genético dos organismos vivos, podendo provocar alterações e/ou danos nas fitas de DNA (BAGCHI et al. 1995; WEBSTER et al. 2002; COSTA, 2012). A incapacidade do DNA em se reparar, terá como consequência danos cromossômicos que serão expressos durante a divisão celular, apresentando efeitos genotóxicos acumulativos (BOLOGNESI et al., 2006).



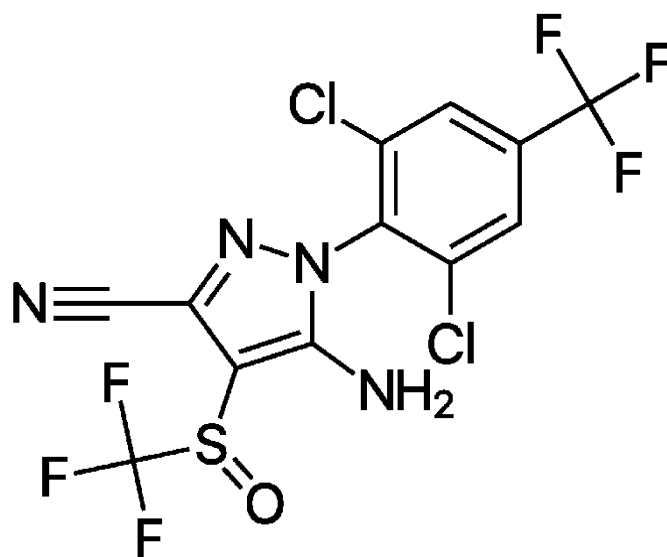
**Figura 4: Fórmula estrutural química do Glifosato.** Fonte: ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Estudos de efeitos biológicos com Glifosato em animais aquáticos, contribuiu para observação de correlações significativas entre a exposição a contaminantes, tanto naturais como experimentais. Este tipo de análise tem sido bastante promissora no que diz respeito a contaminação das águas e a influência de contaminantes ambientais (AL-SABTI, 1990; BARNI, 2007). Latorre et al. (2013) verificaram uma diminuição de leucócitos totais, um aumento de heterófilos relativo aos leucócitos e alteração das proteínas plasmáticas de répteis, além de um atraso no crescimento de jacarés da espécie *Caiman latirostris*. Também foram observadas alterações nas células sanguíneas de peixes, anfíbios e répteis e alterações como a inibição da atividade de enzimas antioxidantes em peixes neotropicais (*Prochilodus lineatus*). (BARNI, 2007; MODESTO, 2009; LATORRE et al., 2013; HEREK 2017).

Além do Glifosato, outro agrotóxico muito utilizado é o inseticida Fipronil (Figura 5), inibidor não competitivo do Ácido gama-aminobutírico (GABA), utilizado no controle de insetos como cupins, besouros e broca de cana, principalmente em cultivo de cana-de-açúcar. No entanto, sua utilização tem deixado resíduos no ambiente, principalmente em recursos hídricos. (ESPÍNDOLA et al., 2003; OHI et al., 2004).

Os agrotóxicos tem sido considerados os poluentes que mais contribuem com o declínio de espécies aquáticas, levando ao aumento da mortalidade dos peixes, bem como de zooplâncton, além de poder afetar nas taxas de crescimento, reprodução e comportamento desses animais. Técnicas que detectam eritrócitos com núcleos anormais, se mostraram eficazes para testar a genotoxicidades de

contaminantes aquáticos; e são também indicadores precoces de poluição para com o ecossistema (CARRASCO et al., 1990; ESPÍNDOLA et al., 2003; VAN DER OOST et al., 2003).



**Figura 5** Fórmula estrutural química do Fipronil. Fonte: Tese de Doutorado, Fabiano Okamura, Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Estudos de ecotoxicidade com pesticidas envolvendo anfíbios e répteis, avaliam a exposição a esses compostos, reforçando a importância de entender como as formulações comerciais podem afetar esses animais e as consequências em ambiente natural (MENDONÇA, 2015; HEKEK, 2017). Estudos recentes (BADGUJAR et al., 2015; KARTHEEK & DAVID, 2018) já demonstram seus efeitos hepatotóxicos por meio de análises histopatológicas de ratos Wistar expostos ao Fipronil, além de induzir danos oxidativos nos tecidos cerebrais e renais de camundongos, devido o aumento da peroxidação lipídica e degeneração de enzimas antioxidantes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de coleta

A coleta dos ovos de *Podocnemis unifilis* foi realizada na área de reprodução do Parque Nacional do Araguaia, no Estado do Tocantins, Brasil, com a licença nº 36957- 7/2017-RAN/ICMBio (Centro de conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios). A coleta foi feita em seu ambiente natural em período de desova, no mês de agosto.

Para o projeto, submetido e aprovado pela Comissão de Ética na Utilização Animal da Universidade Federal de Uberlândia sob o registro CEUA/UFU 039/18, foram coletados 75 ovos da espécie *P. unifilis*. Estes foram removidos de seus ninhos naturais e marcados em seu polo superior para manutenção do posicionamento do vitelo e acondicionados em recipientes plásticos contendo vermiculita umidecida com água na proporção 2:1 v/v e transportados em veículo oficial ao LAPAS-UFU (Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres da Universidade Federal de Uberlândia) para incubação artificial.

#### 3.2 Incubação

Os ovos foram divididos por uma amostragem estratificada uniforme de acordo com o número de ovos de cada ninho; e incubados em cinco diferentes bandejas colocadas em incubadoras de acordo com o método de Verdade et al. (1992).

Ao longo da incubação a temperatura foi mantida entre 28 a 31°C e a umidade relativa do ar acima de 75% e foi verificada diariamente através de termohigrômetro digital.

Em cada grupo foram incubados 15 ovos de *P. unifilis*. Os grupos receberam como substrato 400 gramas de vermiculita e foram umedecidos inicialmente com 400µL de acordo com seus respectivos grupos:

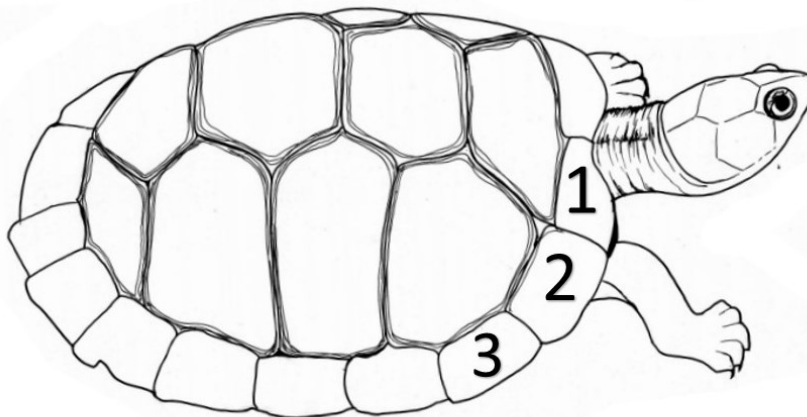
- Grupo Controle: água destilada;
- Grupo Fipronil 4 partes por bilhão (ppb): Fipronil 4 µg/L;
- Grupo Fipronil 400 partes por bilhão (ppb): Fipronil 400 µg/L;

- Grupo Glifosato 65 partes por bilhão (ppb): Glifosato 65 µg/L;
- Grupo Glifosato 6500 partes por bilhão (ppb): Glifosato 6500 µg/L.

As concentrações utilizadas de Glifosato foram determinadas de acordo com as Resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357/2005 e nº 20/1986 que estabelecem o valor máximo de contaminação de água de superfície. Enquanto os valores de Fipronil foram estabelecidas de acordo com dados de literatura para a Concentração Média Letal (CL50) para peixes, já que não foram encontrados dados de répteis ou limites de detecção desse composto estabelecido na legislação brasileira.

Para a manutenção da umidade durante a incubação, eram acrescentados 100µL da água ou do respectivo agrotóxico à vermiculita, sempre que este substrato se apresentasse com pouca umidade, avaliada visualmente, pela palpação e pelo termohigrômetro digital.

Os animais nascidos eram identificados com marcações na carapaça com tinta atóxica à prova d'água (Figura 6) (IBAMA, 2016). E mantidos em caixas de 30 litros, diferentes para cada grupo, com áreas que possibilitavam os animais a terem acesso à um local com água e a um local seco, com temperatura de 30°C e umidade relativa do ar de 80% verificado por meio do termohigrômetro digital.



**Figura 6: Carapaça de Testudines.** Indicação das marcações para identificação do animal, realizada no sentido horário, no escudo pigial. Conta-se o início das marcações no número um, seguido pelos números dois e assim respectivamente. Fonte: Barreto et al. (2016).



### **3.3 Coleta de Materiais Biológicos**

Os animais foram submetidos à contenção física e subsequente eutanásia foi realizada conforme previsto na resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária nº 1000/2012, mediante sobredose de 150mg/kg de tiopental sódico, diluído em cloridrato de lidocaína 2%, na concentração de 10mg/ml, aplicado via intracelomática. Após a eutanásia, foram coletados os rins de ambos os antímeros para realização das lâminas para análise histopatológica.

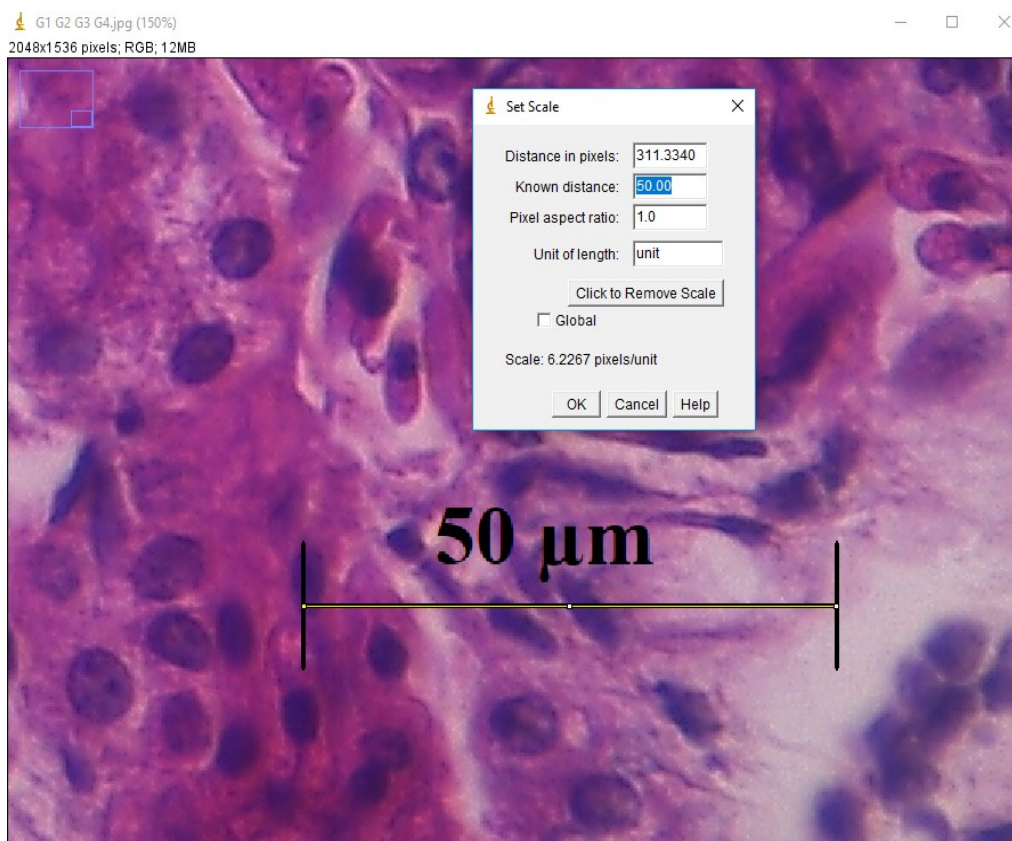
### **3.4 Histologia**

Amostras de rins de cada grupo de animais foram coletadas e fixadas em formol 10% tamponado com fosfato por 24 horas. Após a retirada do formol, os órgãos foram mantidos em álcool 70% até serem submetidos ao processo de inclusão em parafina. Após inclusão os órgãos foram cortados (5µm de espessura) e depositados em lâminas microscópicas e posteriormente corados com hematoxilina e eosina para avaliação das alterações estruturais teciduais (MOURA, 2009; FIRMIANO, 2013).

Utilizou-se o protocolo de Behmer et al. (1976), com alteração no tempo imersão às colorações de hematoxilina e eosina (4 e 2 minutos respectivamente).

#### **Leitura e Análise das Lâminas**

Foram analisados 10 glomérulos dos rins de ambos os antímeros de cada animal, de cada grupo, em microscopia de luz (Leica) sendo os mesmos escolhidos de forma aleatória na ordem em que foram encontrados. Os glomérulos foram fotografados e uma escala padrão foi adicionada a cada foto através do programa LAS EZ. A mensuração das áreas foi realizada por meio do programa ImageJ e através da escala da imagem foram inferidas as áreas em µ<sup>2</sup> (Figura 7).



**Figura 7: Adição de escala no programa ImageJ.** Uso do programa ImageJ para definição das escalas e mensuração das áreas glomerulares e de espaço capsular. Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.5 Análise de dados

Os dados foram expressos em média e mediana e para comparação entre as áreas glomerulares e área do espaço glomerular dos diferentes grupos expostos aos agrotóxicos empregou-se Kruskal-Wallis seguida do teste de Dunns's. A análise estatística foi realizada em programa operacional Prism5, com nível de significância de 95%.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

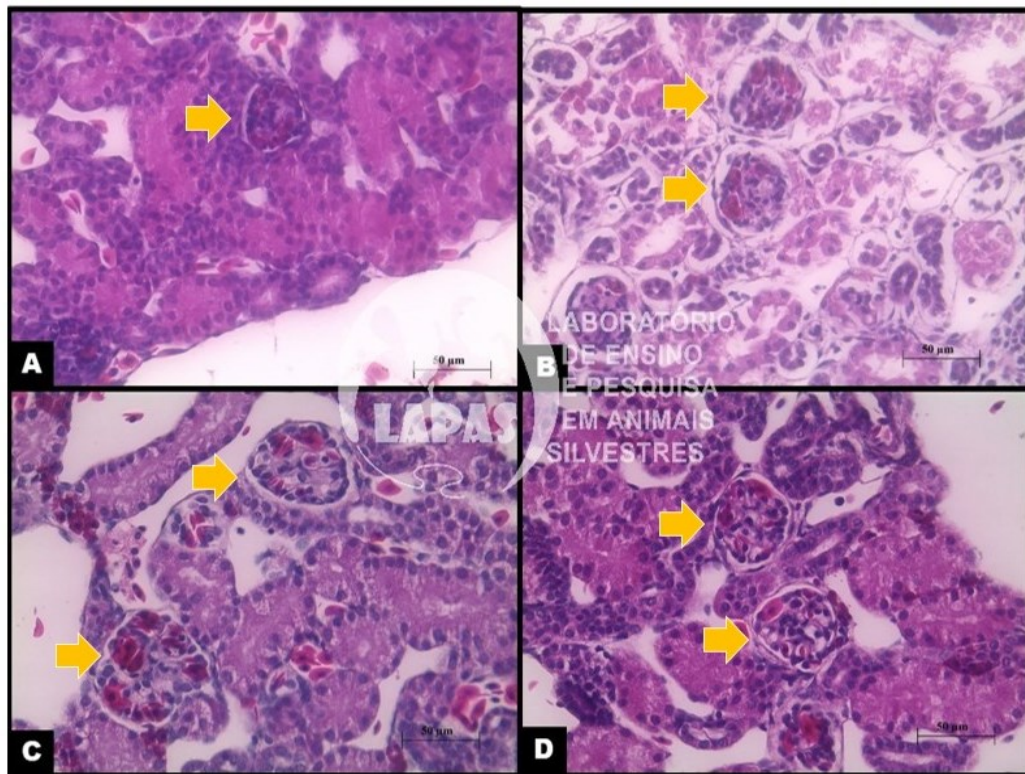
Foram incubados 75 ovos de *P. unifilis*, sendo amostralmente estratificados 15 para cada um dos grupos: Controle, Fipronil (4ppb), Fipronil (400ppb), Glifosato (65ppb) e Glifosato (6500ppb). Destes eclodiram: dois, sete, zero, oito e oito ovos, respectivamente durante o período aproximado de 3 meses de incubação, sendo que o nascimento dos animais variaram aproximadamente 32 dias entre o primeiro e o último animal.

Durante a incubação ocorreram perdas devido à parasitismo por moscas em fase larval. A área onde eram dispostas as incubadoras era de livre ventilação, facilitando a entrada de moscas no local, a vermiculita propiciou um substrato adequado para que ocorresse o parasitismo.

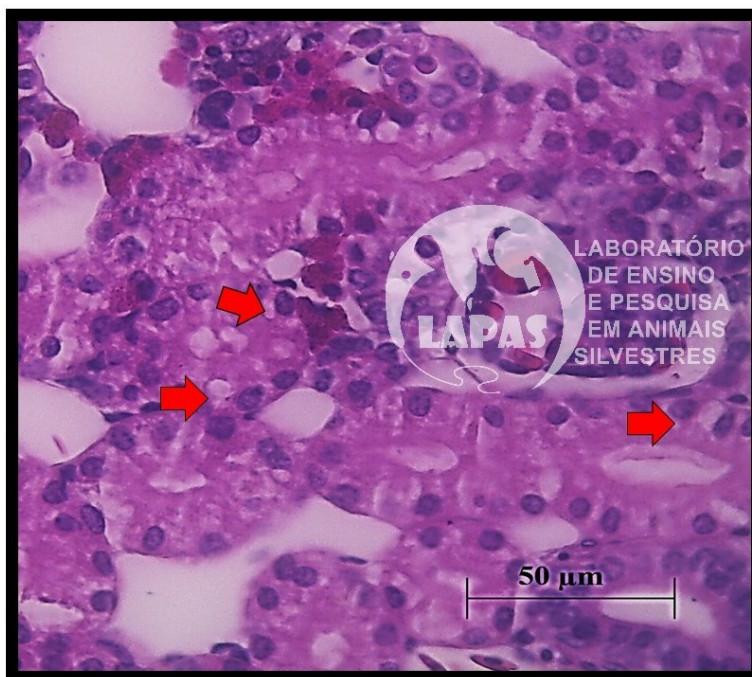
Um dos animais do grupo controle, nasceu com características de um animal leucístico, portanto, foi retirado dessa pesquisa.

Os animais nascidos, foram observados durante cinco dias, os quais permaneceram visivelmente hígidos. Posteriormente foram eutanasiados para coleta dos rins e avaliação histológica. Durante a avaliação, foram encontradas diferenças na área glomerular e da área do espaço capsular dos animais do grupo controle em relação dos animais expostos aos agrotóxicos (Figura 8). Foram encontrados também características de degeneração gordurosa em animais do grupo Fipronil (4ppb), que não foram encontrados em animais de outros grupos tratados (Figura 9). Por meio da microscopia de luz, é possível observar um espaço claro, demonstrando que o lipossomo tornou-se um espaço vazio. No processamento histológico, de coloração por hematoxilina e eosina, o álcool e o xilol dissolvem os lípideos, o que fornece a imagem negativa, vistos como áreas vagas no tecido.

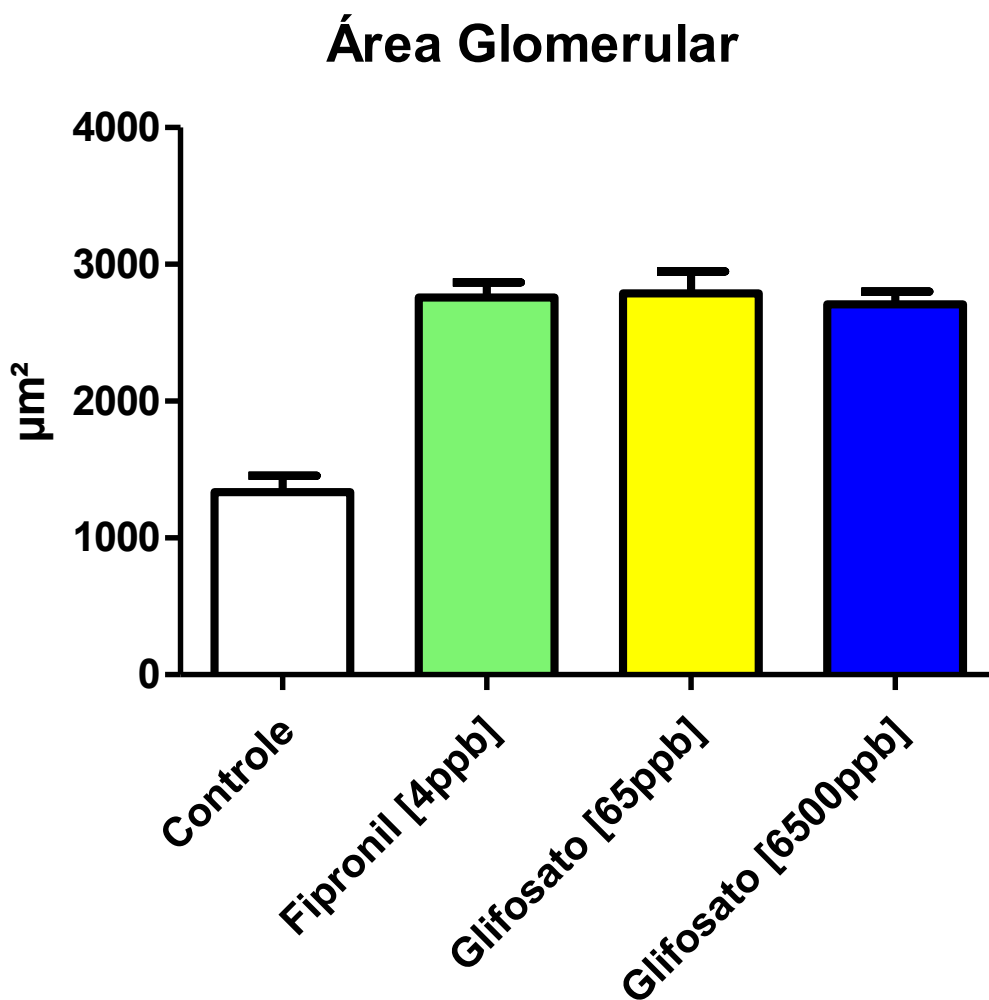
Para quantificação da diferença das áreas glomerulares e do espaço capsular foram mensurados os 10 primeiros glomérulos visualizados de cada animal. E após a quantificação, verificou-se que a média e a mediana dos grupos expostos aos agrotóxicos era evidentemente maior do que a média e a mediana do grupo controle (Tabela 1 e 2).



**Figura 8: Cortes histológicos renais de *Podocnemis unifilis*.** Controle (A), Fipronil 4ppb (B), Glifosato 65ppb (C), Glifosato 6500ppb (D). As setas indicam a presença de glomérulos em cada um dos respectivos grupos. HE.

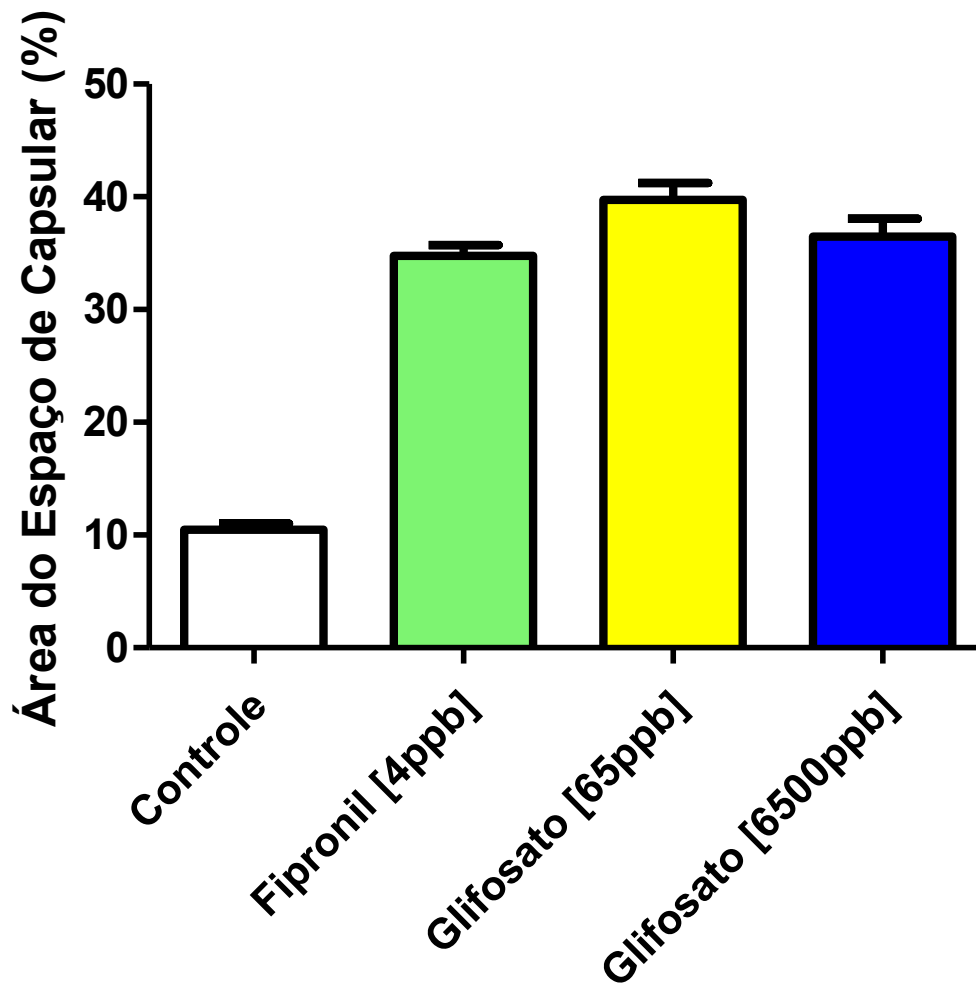


**Figura 9: Degeneração gordurosa em rins de *Podocnemis unifilis*.** Alterações histopatológica do rim de *Podocnemis unifilis* tratado com Fipronil 4ppb durante o desenvolvimento. As setas vermelhas indicam degeneração gordurosa difusa por todo o rim. HE.



**Figura 10:** Área do espaço glomerular de *Podocnemis unifilis*. O gráfico apresenta as áreas do espaço glomerular dos grupos Controle (branco), Fipronil 4ppb (verde), Glifosato 65ppb (amarelo) e Glifosato 6500ppb (azul). Não houve diferença estatísticas entre os grupos tratados com agrotóxicos.

## Espaço Capsular



**Figura 11:** Área do espaço capsular de *Podocnemis unifilis*. O gráfico apresenta as áreas do espaço capsular, representada na porcentagem que ocupava da área glomerular total, dos grupos Controle (branco), Fipronil 4ppb (verde), Glifosato 65ppb (amarelo) e Glifosato 6500ppb (azul). Não houve diferença estatísticas entre os grupos tratados com agrotóxicos.



<b>Espaço Glomerular (%)</b>	<b>Media ± DP</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo - Máximo</b>
<b>Controle</b>	10,48 ± 1,61	11,22	7,97 - 12,16
<b>Fipronil (4ppb)</b>	34,78 ± 7,81	34,82	14,76 - 58,80
<b>Glifosato (65ppb)</b>	39,73 ± 11,29	37,6	20,35 - 74,75
<b>Glifosato (6500ppb)</b>	34,19 ± 10,72	34,13	15,72 - 57,84

**Tabela 1: Resultado das avaliações do espaço glomerular de *Podocnemis unifilis* expostas e não expostas ao Fipronil e ao Glifosato.** Observou-se um aumento da média e da mediana dos espaços glomerulares dos animais expostos aos agrotóxicos, sendo também apresentados na quarta coluna, os valores mínimos e máximos mensurados de cada grupo.

<b>Área Glomerular (<math>\mu^2</math>)</b>	<b>Media ± DP</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo - Máximo</b>
<b>Controle</b>	1334 ± 374	1399	619 - 1939
<b>Fipronil (4ppb)</b>	2760 ± 918	2741	966 - 6049
<b>Glifosato (65ppb)</b>	2789 ± 1367	2668	202 - 6706
<b>Glifosato (6500ppb)</b>	2709 ± 830	2646	1394 - 5076

**Tabela 2: Resultado das avaliações da área glomerular de *Podocnemis unifilis* expostas e não expostas ao Fipronil e ao Glifosato.** Observou-se um aumento da média e da mediana das áreas glomerulares dos animais expostos aos agrotóxicos, sendo também apresentados na quarta coluna, os valores mínimos e máximos mensurados de cada grupo.

Os estudos que evidenciem os danos causados por agrotóxicos à répteis são escassos e esse é o primeiro estudo que reporta as consequências histopatológica renal da exposição de ovos de Tracajá aos compostos Fipronil e Glifosato.

Devido ao parasitismo, os animais do grupo controle tiveram uma menor taxa de eclosão em comparação aos animais que eram expostos aos agrotóxicos,

exceto o grupo Fipronil (400ppb), no qual não houve nascimentos. Portanto, através desse estudo, não é possível atribuir a causa da baixa taxa de eclosão do grupo Fipronil (400ppb) devido ao viés ocorrido.

Nas análises dos glomérulos foi possível observar um aumento das áreas e do espaço glomerular dos animais expostos à ambos agrotóxicos e suas concentrações respectivas (Fipronil 4ppb, Glifosato 65ppb e Glifosato 6500ppb) em comparação a animais não expostos aos contaminantes, sendo observados nos valores da média e mediana (Tabela 1 e 2). Esses resultados se mostram compatíveis com o estudo realizado por Dedeker et al. (2018), em que também foi observado um aumento da área do espaço glomerular de ratos expostos ao composto Roundup® (3,6mg/kg), que tem como base o composto glifosato.

A degeneração gordurosa, aumento da área glomerular e espaço capsular presente nos rins de *P. unifilis* expostas ao Fipronil assemelha-se com alterações verificadas por Badgujar et al. (2015). Neste estudo, os autores verificaram que ratos Wistar, apresentaram dilatação dos túbulos coletores, fibrose intersticial, congestão com degeneração e necrose de células de revestimento devido a um estresse oxidativo causado pela exposição ao Fipronil.

Uma exposição de longo prazo com baixas doses de compostos a base de glifosato, induziram a expressão gênica que está relacionada à resposta inflamatória e oxidativa nos rins e no fígado de acordo com análises de transcriptoma (MESNAGE et al., 2015). Ratos expostos cronicamente, via oral, apresentaram degeneração glomerular e infiltrado inflamatório de células mononucleares e necrose tubular. E experimentos *in vitro* evidenciaram injúrias nas células do epitélio dos túbulos renais, causadas pela ativação do receptor N-metil-D-aspartato juntamente com estresse oxidativo (TIZHE et al., 2014; GAO et al., 2018).

Além dos trabalhos realizados com mamíferos, sabe-se que peixes neotropicais (*Prochilodus lineatus*) expostos à compostos com base em glifosato demonstravam inibição da enzimas antioxidantes após 6 horas de exposição (MODESTO, 2009). Os autores constataram ainda que houve inibição da atividade da principal enzima de detoxificação de xenobióticos (a GST), após um dia de exposição.

Nesse contexto, evidencia-se as atividades nefrotóxicas causadas pelos agrotóxicos Fipronil e Glifosato e suas apresentações comerciais em diversas



espécies de animais, compatível com os achados desse trabalho com Tracajás.

São necessários novos estudos com um número mínimo de animais, para que seja possível realizar análises estatísticas das variáveis apontadas no presente estudo.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através desse trabalho indicam que os agrotóxicos Fipronil e Glifosato possuem atividades nefrotóxicas para *Podocnemis unifilis* durante sua incubação.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR 16389.
- AGOSTINI, M. A. P. Padrões genético-populacionais do “tracajá” *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848)(TESTUDINES: PODOCNEMIDIDAE) na Amazônia brasileira. Dissertação (Mestre), Universidade Federal do Amazonas, Manaus (Amazonas), 2016.
- AL-SABTI, K.; HARDIG, J. Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of industrial waste products in the Baltic Sea, Sweden. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 97, p. 179-182, 1990.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutat Res**, v. 343, p. 121–135, 1995.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice Monográfico: Glifosato. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/G01%2B%2BGlifosato.pdf/6a549ab8-990c-4c6b-b421-699e8f4b9ab4>>. Acessado em: 07 de novembro de 2018.
- BADGUJAR, P. C.; Chandratre, G. A.; Telang, A. G., et al. Fipronil induced oxidative stress in kidney and brain of mice: protective effect of vitamin E and vitamin C. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 118, p. 10-18, 2015.
- BARNI S.; BONCOMPAGNI, E; Grosso, A., et al. Evaluation of *Rana esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. **Aquatic Toxicology**, 15:45–54, 2007.
- BARRETO, M. R; FERNANDES, R. A.; SAND, E. M., et al. Conhecendo o Parque Florestal. Prefeitura Municipal de Sinop, Cartilha, p. 18, 2016.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M .C.; FREITAS NETO, A. G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: EDART, 1976.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente, CONAMA. **Resolução CONAMA nº 357, de 17 de Março de 2005**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>. Acesso em: 2 de novembro de 2018.
- BUHLMANN, K. A.; AKRE, T. S.; IVERSON, J. B., et. Al. A global analysis of tortoise and freshwater turtle distributions with identification of priority conservation areas. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 8, n. 2, p. 116-149, 2009.
- CAGLE, F. R. The life history of the slider turtle, *Pseudemys scripta troostii* (Holbrook). *Ecological Monographs*, Durham, V. 20. n.1, p. 31-54. 1950.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **J. Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123–2136, 1990.

CASTRO, P. D. T. A. & Júnior, P. D. F. Caracterização ecogeomorfológica das áreas de desova de quelônios de água doce (gênero *Podocnemis*) no entorno da Ilha do Bananal, Rio Araguaia. **Revista Geografias**, v. 4, n. 2, p. 15-22, 2008.

COSTA, C.; TEIXEIRA, J. P. Efeitos genotóxicos dos pesticidas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p. 19-31, 2012.

COWAY-GOMEZ, K. Effects of human settlements on abundance of *Podocnemis unifilis* and *P. expansa* turtles in Northeastern Bolivia. **Chelonian Conservation and Biology**, v.6, n.2, p.199-205, 2007.

DANIELE, P. G.; STEFANO, C.; PRENESTI, E.; SAMMARTANO, S. Copper (II) complexes of N-(phosphonomethyl) glycine in aqueous solution: a thermodynamic and spectrophotometric study. **Talanta**, v. 45, n. 2, p. 425-431, 1997.

DEDEKE, G. A.; OWAGBORIAYE, F. O.; ADEMOLU, K. O., et al. Comparative assessment on mechanism underlying renal toxicity of commercial formulation of roundup herbicide and glyphosate alone in male albino rat. **International journal of toxicology**, v. 37, n. 4, p. 285-295, 2018.

ESPÍNDOLA, E.L.G.; BRIGANTE, J.; DORNFELD, C.B. Estudos ecotoxicológicos no rio Mogi-Guaçu. In: BRIGANTE, J., ESPÍNDOLA, E.L.G. Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu. São Carlos: Rima, p.129–148, 2003.

FARIA, V. A. D. Conservação dos quelônios amazônicos: ecologia populacional e perfil dos caçadores da espécie *Podocnemis Expansa* (Tartaruga-da-Amazônia) no entorno do Parque Nacional do Araguaia. Tese de Doutorado (Ciências do Ambiente), Universidade Federal do Tocantins, Tocantins. 2018.

FERRI, V. *Turtles & Tortoises: A Firefly guide*. New York: Firefly Books, p. 256, 2002.

FIRMIANO, E. M. S. Descrição histológica e detecção imuno-histoquímica de células do sistema neuroendócrino difuso no oviduto de *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae). Dissertação de Mestrado (Biologia Animal), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

GAO, H.; CHEN, J.; DING, F., et al. Activation of the N-methyl-d-aspartate receptor is involved in glyphosate-induced renal proximal tubule cell apoptosis. **Journal of Applied Toxicology**, 2019.

HEREK, J. S. (2018). Glifosato e seus efeitos sobre duas espécies de anfíbios nativos da América do Sul *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Fronteira Sul, Santa Catarina, 2018.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis. **Manual para requerimento de avaliação ambiental: agrotóxicos e afins**. Brasília: DIQUA/ CGASQ. Brasília: Ibama, 2009. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/manualde-procedimento-pararegistro-de-agrotoxicos/>>. Acesso em: 2 de novembro de 2018.

IBAMA – Instituto Brasileiro do meio ambiente e Recursos Renováveis. **Quelônios Amazônicos**. Brasília, 2016.

IUCN – International Union for Conservation of Nature's. Tortoise & Freshwater Turtle Specialist Group 1996. *Podocnemis unifilis* (errata version published in 2016). *The IUCN Red List of Threatened Species* 1996: e.T17825A97397562. Downloaded on 03 November 2018.

KARTHEEK, R. M.; DAVID, M. Assessment of fipronil toxicity on wistar rats: A hepatotoxic perspective. **Toxicology reports**, v. 5, p. 448-456, 2018.

LATORRE, M. A.; GONZÁLEZ, E.C.L.; LARRIERA, A. et al. Effects of *in vivo* exposure to Roundup® on immune system of *Caiman latirostris*. **Journal of Immunotoxicology**, v.10, n. 4, p. 349-354, 2013.

LIMA, F. A. N. D. S. (2015). Saúde, ambiente e contaminação hídrica por agrotóxicos na terra indígena Marãiwatsédé. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Mato Grosso, Mato Grosso, 2015.

MENDONÇA, J. D. S. (2015). Influência da exposição à atrazina e glifosato no desenvolvimento ósseo de *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2015.

MESNAGE, R.; ARNO, M.; COSTANZO, M., et al. Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. **Environmental Health**, v. 14, n. 1, p. 70, 2015.

MODESTO, K. A. (2009). Efeitos de dois herbicidas à base de glifosato para um peixe neotropical, com enfoque nos biomarcadores bioquímicos. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2009.

MOURA, L. R. Aspectos morfológicos do fígado de tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) e *Phrynops geoffroanus* (Schwiegger, 1812) (Testudines, Chelidae). 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

NETO, J. A. M. (2008). Ecologia reprodutiva e manejo conservacionista do tracajá *Podocnemis unifilis* (TROSCHER, 1848) (Testudines, Podocnemididae), no Parque Indígena do Xingu, Mato Grosso. Monografia (Ciências Biológicas), Goiânia, Goiás, 2008.

OHI, M.; DALSENTER, P. R.; ANDRADE, A. J. M.; NASCIMENTO, A.J. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v. 146, p. 121-127, 2004.

OKUMURA, F. (2009). Estudo voltamétrico e desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para determinação do inseticida fipronil utilizando o eletrodo compósito de grafite-poliuretana. Tese (Doutorado) Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PALMA, D. C. A. Agrotóxicos em leite humano de mães residentes em Lucas do Rio Verde-MT. 2011, 103 f. Dissertações (Mestre em Saúde Coletiva) - Universidade Federal de Mato Grosso. Cuiabá, 2011.

PAVANI, N.D. Pesticidas: uma revisão dos aspectos que envolvem esses compostos. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2016.

PERES, F.; ROZEMBERG, B.; LUCCA, S. R. Percepção de riscos no trabalho rural em uma região agrícola do estado do Rio de Janeiro, Brasil: agrotóxicos, saúde e meio ambiente. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 1836- 1844, 2005.

RANGEL, C. D. F.; ROSA, A. C. S.; SARCINELLI, P. D. N. Uso de agrotóxicos e suas implicações na exposição ocupacional e contaminação ambiental. **Cad. saúde colet., (Rio J.)**, 2011.

SANCHES, S.M.; SILVA, C.H.T.P.; CAMPOS, S.X.; VIEIRA, E.M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e meio ambiente**, Curitiba, v.13, p. 53-58, 2003.

TIZHE, E. V.; FATIHU, M. Y.; ONYEBUCHI, I. I., et al. Influence of zinc supplementation on histopathological changes in the stomach, liver, kidney, brain, pancreas and spleen during subchronic exposure of Wistar rats to glyphosate. **Comparative clinical pathology**, v. 23, n. 5, p. 1535-1543, 2014.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VANZOLINI, P. E. On eggs of Brazilian Podocnemis (Testudines, Podocnemididae. **Biologia geral e experimental**, São Cristóvão, v. 2, n. 2, p. 3-17, 2001.

VERA-CANDIOTI, J.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted livebearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1942). **Ecotoxicol. Environ**, v. 89, p. 166-173, 2013.

VERDADE, L. M.; MICHELOTTI, F.; RANGEL, M. C., et al. Manejo de ovos de jacaré- de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) no CIZBAS/ESALQ/USP, in:

Verdade, L. M. Lavorenti, A. (Eds.) In: Anais do I Workshop sobre conservação e manejo do jacaré-do-papo-amarelo (*Caiman latirostris*). ESALQ/USP, Piracicaba, p. 92-99, 1992.

VOGT, R. C. Tartarugas da Amazônia. **Wust ediciones**, Peru. p. 104, 2008.