

DIANE DA CRUZ MIRANDA

**EFEITO DOS FUNGICIDAS MANCOZEB E TEBUCONAZOL
SOBRE PARÂMETROS TESTICULARES DO MORCEGO
FRUGÍVORO *Artibeus lituratus* (OLFERS, 1818)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M672e
2012

Miranda, Diane da Cruz, 1987-
Efeito dos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol sobre
parâmetros testiculares do morcego frugívoro
Artibeus lituratus (Olfers, 1818) / Diane da Cruz Miranda.
– Viçosa, MG, 2012.
ix, 50f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Mariana Machado Neves.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 41-50.

1. Testículos. 2. Pesticidas e vida selvagem. 3. Histologia.
4. Fungicidas. 5. Reprodução animal. 6. Produtos químicos
agrícolas. 7. Morfologia. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22. ed. 573.655

DIANE DA CRUZ MIRANDA

**EFEITO DOS FUNGICIDAS MANCOZEB E TEBUCONAZOL
SOBRE PARÂMETROS TESTICULARES DO MORCEGO
FRUGÍVORO *Artibeus lituratus* (OLFERS, 1818)**

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

APROVADA: 18 de janeiro de 2012.

Marcos de Lucca Moreira Gomes

Mariella Bontempo Duca de Freitas

Mariana Machado Neves
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Geral pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro concedido através de bolsa de estudo.

À professora Mariana Machado Neves pela verdadeira orientação, ensinamentos, paciência e por ter confiado em mim e ter dito “sim” no momento em que mais precisei.

Ao professor Sérgio Luis Pinto da Matta por ter me acolhido no Laboratório de Histologia desde o início da graduação, pelos seus ensinamentos e momentos de descontração.

À professora Mariella Bontempo Duca de Freitas pela receptividade, disponibilidade e auxílio que foram imprescindíveis para a realização desse trabalho.

Ao professor Oswaldo Pinto Ribeiro Filho pelos ensinamentos e auxílio prestado, principalmente no primeiro ano do mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia: Jerusa, Welliton e Diogo, pelas idas ao campo, ajuda nas coletas, pelos ensinamentos sobre trabalho de campo e por tornar tudo muito agradável. À Dani, Túlio e Raquel por fornecerem parte do material utilizado nesse trabalho.

Aos professores Renato Feio, por ceder o Ranário no Museu de Zoologia João Mojen, e Jorge Dergam pelos empréstimos da chave do Museu e por ambos possuírem uma simpatia ímpar.

A todos os colegas do Laboratório de Histologia, pelos bons momentos de aprendizagem, descontração e risadas. Gostaria de agradecer principalmente à amiga

Marli Cupertino, pelo auxílio nas análises, pelos ensinamentos, competência e humildade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio em eventos científicos ocorridos nesse período.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Geral, Alex, Beth e Diana pela eficiência e competência no cumprimento de suas atividades.

Aos professores do Departamento de Biologia Geral, principalmente pelos ensinamentos e exemplo de profissionalismo.

Ao Hugo, pelos grandes auxílios prestados, por estar sempre disponível, pelo companheirismo e por ser tão amável.

Aos professores Marcos de Lucca Moreira Gomes e Mariella Bontempo Duca de Freitas por participarem da banca de defesa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. Características gerais da Ordem Chiroptera.....	03
2.2. Morcegos da espécie <i>Artibeus lituratus</i>	04
2.3. Agrotóxicos.....	06
2.3.1. Espalhante adesivo.....	08
2.3.2. Mancozeb.....	10
2.3.3. Tebuconazol.....	12
2.4. Testículo.....	13
2.5. Células de Leydig.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Fungicidas.....	17
3.2. Animais e tratamento.....	17
3.3. Eutanásia e coleta dos órgãos.....	19
3.4. Processamento histológico do material.....	20
3.5. Histomorfometria testicular.....	20
3.5.1. Índice gonadossomático (IGS).....	20
3.5.2. Proporção volumétrica (%) e volume dos componentes do testículo.....	20
3.5.3. Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento dos túbulos seminíferos.....	21
3.5.4. Proporção volumétrica e volume dos elementos do intertúbulo....	22
3.5.5. Morfometria de células de Leydig.....	22
3.6. Análises estatísticas.....	23
4. RESULTADOS	23
4.1. Peso corporal, testicular e índice gonadossomático.....	23
4.2. Morfometria do túbulo seminífero.....	24
4.3. Avaliação morfométrica dos elementos do intertúbulo.....	28
4.4. Morfometria de células de Leydig.....	30
5. DISCUSSÃO.....	33

6. CONCLUSÕES	39
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

RESUMO

MIRANDA, Diane da Cruz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2012. **Efeito dos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol sobre parâmetros testiculares do morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818)**. Orientadora: Mariana Machado Neves. Coorientadores: Sérgio Luis Pinto da Matta e Oswaldo Pinto Ribeiro Filho.

Com a destruição do seu habitat natural, morcegos frugívoros vêm se alimentando de frutos obtidos de pomares pulverizados com fungicidas. Uma vez que esses animais atuam na manutenção do ecossistema e na regeneração de ambientes degradados, o efeito dos agrotóxicos sobre eles pode colocar em risco não somente sua sobrevivência e adaptação, mas também a manutenção de ambientes florestais. Dessa forma, como não foram encontrados estudos avaliando os impactos da ingestão dessas substâncias sobre a morfofisiologia testicular destes animais, o objetivo deste trabalho foi analisar alguns parâmetros testiculares em *Artibeus lituratus* (n=28) após exposição, aguda e/ou crônica, aos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol. Os animais foram divididos em cinco grupos: controle 1 (G1; n=5), em que os animais foram alimentados com frutas sem fungicidas e sem espalhante adesivo (EA) por sete dias, controle 2 (G2; n=5), com animais alimentados com frutos + EA por sete dias, e três outros grupos contendo animais alimentados com frutos banhados com mancozeb + EA (G3; n=6; 2g/L) e tebuconazol + EA (G4; n=6; 1mL/L) por sete dias e tebuconazol + EA (G6; n=6) por 30 dias. Após eutanásia, os animais foram pesados, sendo os testículos dissecados e fixados (solução de Karnovsky) para serem processados e incluídos em resina. Os cortes histológicos (3 μ m) foram corados e avaliados, em microscópio óptico e no software Image Pro Plus, nos seguintes parâmetros: diâmetro e comprimento dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero, proporção volumétrica e volume de elementos dos compartimentos tubular e intertubular, morfometria das células de Leydig e índices gonadossomático, tubulossomático e leydigossomático. Após submeter os resultados à análise estatística (ANOVA), comparando-se as médias pelo teste de Student Newman-Keuls (p=0,05), observou-se que a exposição por sete dias aos dois fungicidas não causou alterações morfométricas testiculares, quando comparados aos controles, mostrando que as substâncias possuem baixa toxicidade aguda. Já animais expostos cronicamente ao tebuconazol (30 dias) apresentaram diminuição no percentual de túbulos seminíferos por parênquima testicular, o que coincidiu com o aumento do

percentual de intertúbulo (por parênquima testicular), diminuição do percentual de epitélio seminífero e menores valores para diâmetro tubular e índice tubulossomático, quando comparados aos animais controle. No intertúbulo também foi observada maior proporção de vasos sanguíneos e menor percentual de espaço linfático. Além disso, as células de Leydig apresentaram alterações morfométricas, como redução na proporção do seu citoplasma no intertúbulo, no diâmetro e volume nuclear, no volume citoplasmático e celular, além do aumento no número dessas células por grama de testículo. Pode-se concluir que, nas concentrações estabelecidas para uso no campo e testadas no presente trabalho, mancozeb e tebuconazol não causam alterações testiculares quando a exposição é aguda. No entanto, a exposição crônica ao tebuconazol causa alterações histomorfométricas testiculares a nível de túbulos seminíferos, intertúbulo e de células de Leydig.

ABSTRACT

MIRANDA, Diane da Cruz, M.Sc., Federal University of Viçosa, January, 2012. **Effect of Mancozeb and Tebuconazole on testicular parameters of the frugivorous bat *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818).** Adviser: Mariana Machado Neves. Co-advisers: Sérgio Luis Pinto da Matta and Oswaldo Pinto Ribeiro Filho.

Due to destruction of their natural habitat, fruit bats are feeding on fruits obtained from orchards sprayed with fungicides. Once these animals act in maintaining the ecosystem and the regeneration of degraded environments, the effect of pesticides on them can endanger not only their survival and adaptation, but also the maintenance of forests. Thus, as no studies were found assessing the impact of ingestion of these substances on testicular morphophysiology in these animals, the objective of this study was to analyze some testicular parameters in *Artibeus lituratus* (n = 28) after acute and/or chronic exposure to fungicides Mancozeb e Tebuconazole. The animals were divided into five groups: control group 1 (G1, n = 5), in which animals were fed with fruits without fungicides and without adjuvant (AD) for seven days, control 2 (G2, n = 5), animals fed with fruit + AD for seven days, and other three groups containing animals fed fruits with Mancozeb + AD (G3, n = 6; 2g/L) and Tebuconazole + AD (G4, n = 6; 1 mL/L) for seven days and Tebuconazole + AD(G6, n = 6) for 30 days. After euthanasia, the animals were weighed, and their testes were dissected and fixed (Karnovsky solution) to be processed and enclosed in resin. Histological sections (3µm) were stained and evaluated concerning the following parameters in a light microscope and Image Pro Plus software: diameter and length of seminiferous tubules, seminiferous epithelium height, proportion and volume of tubule and intertubule components, Leydig cell morphometry, and gonadosomatic, tubulossomatic and leydigossomatic indexes. After submitting the results to statistical analysis (ANOVA), comparing the means by Newman-Keuls test (p = 0.05), we observed that exposure for seven days to two fungicides caused no testicular morphological changes when compared to controls, showing that the substances have low acute toxicity. Conversely, animals chronically exposed to Tebuconazole (30 days) showed decrease in the percentage of seminiferous tubules per testicular parenchyma, which coincided with increase in the percentage of intertubule (for testicular parenchyma), decreased in the percentage of seminiferous epithelium and lower values for tubule diameter and tubulossomatic index when

compared to control groups. In the intertubule there was a greater proportion of blood vessels and a lower percentage of lymphatic space. In addition, the Leydig cells showed morphometric changes such as reduction in their proportion of cytoplasm (in the intertubule), in nuclear diameter, in nuclear volume and cytoplasmic and cell volume, and increased number of these cells per gram of testis. It can be concluded that in the concentrations established for use in the field and tested in this study, Mancozeb and Tebuconazole did not cause testicular changes when the exposure is acute. However, chronic exposure to Tebuconazole causes histomorphometric changes at the level of testicular seminiferous tubules, intertubule and Leydig cells.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, uma das alternativas encontradas para aumentar a produção alimentícia mundial está centrada no uso de agrotóxicos (Carvalho, 2006). Estes compostos químicos, também chamados de agrotóxicos, são substâncias ou misturas de substâncias, naturais ou sintéticas, destinadas a repelir ou combater pragas e organismos que atacam as lavouras (Larini, 1999; Carvalho, 2006). O uso de agrotóxicos teve aumento significativo nos últimos 50 anos, principalmente em países subdesenvolvidos e agro-exportadores (Berny, 2007). Atualmente, o Brasil ocupa a primeira posição no mercado mundial como consumidor de agrotóxicos (Caldas et al., 2004) e, devido a sua política reguladora incipiente ou inexistente, o uso indiscriminado dessas substâncias tem sido uma grave ameaça à saúde pública e ao ambiente (Galt, 2008).

A utilização crescente e o desenvolvimento de novos agrotóxicos têm despertado o interesse da comunidade científica para o estudo dos danos causados aos organismos, humano e animal, além do seu efeito sobre o ambiente. Sabe-se que o uso de agroquímicos nas lavouras pode afetar diretamente os ambientes aquíferos, causando danos agudos e crônicos aos humanos, como o desenvolvimento de neoplasias e problemas relacionados aos aparelhos nervoso, endócrino e reprodutor (Carvalho, 2006).

Apesar dos estudos já realizados nesta área, na sua maioria utilizando camundongos e ratos como modelos experimentais, diversas classes de agrotóxicos ainda não têm definidos seus efeitos sobre o aparelho reprodutor masculino. Além disso, são escassos os estudos que mostram o impacto do uso de agrotóxicos e seu potencial risco sobre populações de espécies silvestres, como é o caso do morcego-da-fruta-do-sudeste (*Artibeus lituratus*).

Morcegos frugívoros são cruciais para a dinâmica de florestas tropicais, por serem dispersores de sementes de diversas plantas pioneiras, atuando, assim, na manutenção do ecossistema e na regeneração de ambientes degradados. No entanto, esses animais são comumente vistos em pomares pulverizados com agrotóxicos, destinados à produção, principalmente devido à destruição do seu ambiente natural. Eles formam abrigos temporários em copas de árvores próximas a estes locais e se alimentam dos frutos contaminados (Tavoloni, 2005). O efeito dos agrotóxicos sobre esses animais pode colocar em risco não somente a sobrevivência e adaptação deles,

mas também a manutenção de ambientes florestais. Além disso, efeitos observados em mamíferos muitas vezes representam um alerta para possíveis danos aos humanos (Mcklinlay et al., 2007)

Com base no presente exposto, o objetivo geral deste trabalho foi estudar as possíveis alterações histomorfométricas testiculares em animais da espécie *Artibeus lituratus* quando expostos de forma aguda aos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol (sete dias) e cronicamente ao Tebuconazol (30 dias) nas concentrações utilizadas em campos de cultivo. Para isto, foram estabelecidos como objetivos específicos:

- avaliar o efeito dos dois fungicidas sobre o peso corporal, o peso testicular, mensurações da albugínea, além do índice gonadossomático de morcegos *Artibeus lituratus*;
- determinar e comparar a relação túbulo/intertúbulo testicular de morcegos expostos aos dois fungicidas nos períodos de exposição propostos;
- analisar dados morfométricos do compartimento tubular, como diâmetro tubular, altura do epitélio germinativo, comprimento do túbulo seminífero e volumetria tubular, e comparar os resultados obtidos entre os grupos;
- realizar a morfometria do intertúbulo, determinando a proporção volumétrica e volumetria dos seus componentes, e comparar os resultados obtidos entre os grupos;
- avaliar a ação dos fungicidas sobre a morfometria das células de Leydig.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características gerais da ordem Chiroptera

Os morcegos pertencem à classe Mammalia e à ordem Chiroptera e constituem um dos grupos de mamíferos mais diversificados do mundo, com 18 famílias, 202 gêneros e 1024 espécies (Simmons, 2005; IUCN, 2008), o que representa aproximadamente 22% das espécies de mamíferos conhecidas atualmente (Wilson e Reeder, 2005). Os quirópteros representam a segunda ordem em riqueza de espécies dentre os mamíferos, sendo superada somente pela ordem Rodentia, com 2277 espécies (Wilson e Reeder, 2005; Reis et al., 2007).

A ordem Chiroptera está subdividida em duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera. Os megaquirópteros são conhecidos popularmente como raposas voadoras, devido à semelhança facial com raposas, e ocorrem nas regiões tropicais da África, Índia, sudeste da Ásia e Austrália (Fenton, 1992). Já os microquirópteros encontram-se amplamente distribuídos por todo o globo, não sendo encontrados somente nas regiões polares. Envolvem 17 famílias, 157 gêneros e 930 espécies, com variação de peso entre dois e 200 gramas (Simmons, 2005). No Brasil são conhecidas nove famílias, 64 gêneros e cerca de 170 espécies (Simmons, 2005). Em geral apresentam alta longevidade se comparados a mamíferos de mesmo porte; enquanto um rato de 40g vive até dois anos, um morcego vampiro de aproximadamente 30g pode viver até 20 anos na natureza (Bernand, 2005).

Os microquirópteros são animais noturnos que possuem poucos cones na retina, mas não são cegos. Embora todas as famílias brasileiras utilizem a ecolocalização para se orientar, alguns frugívoros maiores também se orientam pela visão. Como utilizam primariamente o sistema de ecolocalização, os olhos são pequenos, as orelhas grandes, o *tragus* bem desenvolvido e as ornamentações nasais e faciais muitas vezes estão presentes. Durante o processo de ecolocalização, os morcegos emitem sons de alta frequência pela boca ou pelo nariz, que são refletidos por superfícies do ambiente, indicando a distância relativa dos objetos. Este importante sentido adicional lhes permite localizar suas presas, desviar de obstáculos durante o vôo e se comunicar uns com os outros (Fenton, 1992; Reis et al., 2007).

A flexibilidade alimentar dos microquirópteros pode ser apontada como um dos principais motivos de seu grande sucesso de colonização (Reis et al., 2007). Estes hábitos lhes permitem serem considerados como importantes dispersores de sementes

(Bredt et al., 1996), controladores das populações de cupins e de insetos daninhos a lavouras ou transmissores de doenças, além de servirem como polinizadores de pelo menos 500 espécies de plantas neotropicais (Vogel, 1969).

Os morcegos são encontrados em ambientes naturais e em áreas urbanas, podendo abrigar-se em cavernas, ocos e copas de árvores, entre galhos e folhas de palmeiras e bananeiras, e em áreas urbanas, como construções, abandonadas ou não, e forros de telhados (Bernand, 2005).

2.2. Morcegos da espécie *Artibeus lituratus*

A família Phyllostomidae (subordem Microchiroptera) constitui a mais diversa do Brasil, com 90 espécies de morcegos. Essa família engloba todos os morcegos frugívoros do Brasil e apresenta, como característica marcante, a presença de uma folha nasal membranosa em forma de lança ou folha na extremidade do focinho. Em Phyllostomidae, *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Fig. 1) pertence à subfamília Stenodermatinae, caracterizada por apresentar listras claras na face e coloração da pelagem corporal geralmente amarronzada, o que pode variar entre as diferentes regiões em que habita (Reis, 2007).

Os morcegos *Artibeus lituratus* são considerados de grande porte, com antebraço podendo passar de 75 cm e peso acima de 75g. Formam grupos poligâmicos e abrigam-se nas copas de árvores, sob folhas de palmeiras e outras plantas (Vizotto e Taddei, 1973). O período reprodutivo pode variar de acordo com a distribuição geográfica, sendo que no Brasil podem apresentar um padrão de poliestria bimodal, o qual se caracteriza pela ocorrência de dois picos reprodutivos durante o ano. No caso da espécie *Artibeus lituratus*, um pico ocorre de fevereiro a março e o outro de outubro a novembro (Bredt et al., 1996).

A sua distribuição é vasta, incluindo o México até a Bolívia, Trindade e Tobago, pequenas Antilhas, e norte da Argentina, até o sul do Brasil, onde se encontra amplamente distribuído, com presença destacada em ambientes urbanos. Em alguns ambientes, entretanto, a espécie pode estar ameaçada pela destruição crescente do seu habitat (Reis et al., 2007). O status da espécie está definido atualmente como “pouco preocupante” pela Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais, apesar de outras espécies de quirópteros frugívoros que ocorrem no território brasileiro já serem classificadas como ameaçadas, como *Platyrrhinus recifinus* (IUCN, 2008).

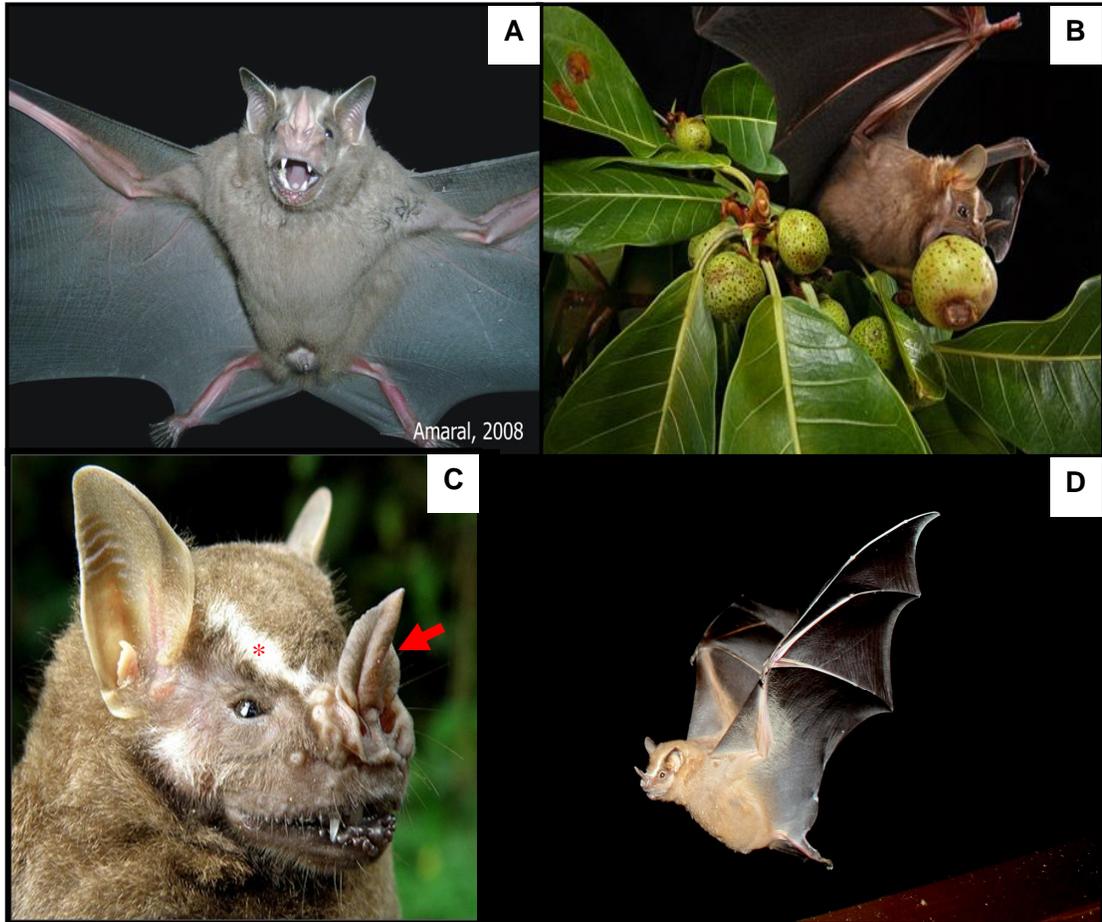


Figura 1: Fotos mostrando o morcego frugívoro *Artibeus lituratus*. **A:** Macho capturado para experimentação em laboratório. **B:** Animal em seu habitat natural alimentando-se de fruto. **C:** Detalhe da face de *Artibeus lituratus*, mostrando a folha nasal (seta vermelha) e uma listra facial (asterisco vermelho). **D:** *Artibeus lituratus* em vôo (Fontes: A - Amaral, 2009; B e C - <http://ngm.nationalgeographic.com/ngm/0706/feature6/gallery3.html>; D - <http://www.flickr.com/photos/idalectio/3732718053/in/photostream/>).

A dieta do *Artibeus lituratus* é variada, podendo alimentar-se de insetos, folhas e néctar, embora a frugivoria predomine como hábito principal, consumindo frutos de várias espécies (Gardner, 1977). Morcegos frugívoros podem consumir uma grande variedade de frutos, infrutescências, folhas, sementes e demais partes vegetais. A dispersão de sementes por morcegos frugívoros é consequência de sua grande mobilidade, assim como pelo fato de não haver destruição das sementes ingeridas (Fleming e Sosa, 1994). Dessa forma, o *Artibeus lituratus*, bem com outras espécies de quirópteros frugívoros, tem uma grande importância na dinâmica e regeneração de

florestas, contribuindo para o estabelecimento de muitas espécies de plantas e possibilitando a regeneração e sucessão secundária de florestas tropicais (Galetti e Morellato, 1994; Passos et al., 2003).

Apesar da grande importância ecológica, os morcegos frugívoros muitas vezes são considerados responsáveis por perdas na produção de frutas por fruticultores, por serem comumente vistos em pomares. Este fato ocorre devido à abundância de alimento no local e pela destruição do seu habitat natural (Larini, 1999). Como os produtores utilizam agrotóxicos com intuito de conseguir uma solução rápida e economicamente viável para diminuir perdas na produção de frutas, os morcegos acabam ingerindo essas substâncias (Carvalho, 2006).

2.3. Agrotóxicos

Os agrotóxicos são compostos químicos destinados a repelir ou combater pragas e organismos que atacam as lavouras, sendo também designados como defensivos agrícolas. Eles podem ser classificados de diferentes formas, como finalidade, modo de ação, persistência, deslocamento, duração do efeito do tratamento, origem ou grupo químico, mas a sua toxicidade é considerada uma das mais importantes. 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 (Larini, 1999).

A estimativa atual é que existem cerca de 1500 substâncias diferentes, dentre inseticidas, herbicidas e fungicidas em todo o mundo, a partir das quais são produzidas inúmeras formulações (Larini, 1999). Estima-se também que há cerca de 95 mecanismos de atuação dos agrotóxicos em alvos bioquímicos distintos (Caldas et al., 2004).

Utilizados em concentrações determinadas com o objetivo de eliminar uma praga específica, os agrotóxicos podem interferir com a ecofisiologia de organismos não-alvos. Os resíduos derivados de agrotóxicos persistem no ambiente, contaminando o solo e a água, sendo posteriormente incorporados às cadeias alimentares (Carvalho, 2006).

Atualmente, um número crescente de produtores rurais tem feito uso de diversos agrotóxicos para proteger seus cultivos de doenças e pragas, que acabam afetando a rentabilidade de seus negócios, sem muitas vezes respeitar o prazo de carência dos produtos. Este prazo corresponde ao tempo em que o princípio ativo permanece

agindo na planta (Picanço et al., 2008). Com isso, acaba-se ingerindo um alimento que ainda está sob o efeito do produto. Isto representa um grande risco, visto que parte dos princípios ativos utilizados nas formulações dos agrotóxicos possuem propriedades genotóxicas, podendo causar alterações nas unidades que controlam a hereditariedade entre as gerações, por exemplo. Além disso, como o efeito é cumulativo, com o passar do tempo podem surgir consequências relacionadas, principalmente, a problemas no sistema nervoso, endócrino, cardiovascular e doenças cancerígenas, já comprovadas por estudos na área médica, além da possível ação em órgãos reprodutivos, particularmente nos testículos (Pereira, 1993; Picanço et al., 2008).

Os agrotóxicos atuam na parte da bioquímica celular, em cadeias de eventos que culminam no comprometimento fisiológico no organismo da praga (Casida, 2009). A ação dos agrotóxicos é efetivada pela ligação da molécula a um alvo primário específico, seja este uma determinada enzima, proteína, canal iônico ou receptor de membrana. Porém, deve-se ressaltar que uma parcela do total de moléculas é degradada ou enviada a receptores secundários (Casida, 2009).

Os animais silvestres são ameaçados pelo uso de agrotóxicos, tanto direta quanto indiretamente. A exposição aguda por contato direto com o agroquímico pode ocorrer por ingestão, inalação ou contato dérmico, sendo mais recorrente a ingestão de alimentos provenientes de lavouras recém tratadas com esses químicos. A exposição aguda também pode ser ocasionada por contato indireto ou secundário, no qual há ingestão de uma presa contaminada (Berny, 2007).

A exposição prolongada ou crônica em animais silvestres resulta em alteração de vários processos biológicos. As consequências mais relatadas são imunotoxicidade, desregulação endócrina, alterações reprodutivas e comportamentais. Considerando um efeito em longo prazo, a exposição crônica representa uma séria ameaça a populações silvestres (Berny, 2007).

A contaminação por agrotóxicos em organismos não-alvos ocorre principalmente por meio da ingestão, embora outras vias também sejam passíveis de ocorrer. Após a ingestão, o pesticida é degradado em seus compostos, os quais atingem a corrente sanguínea. Tais compostos podem ser degradados em subprodutos, que atuam como desreguladores endócrinos em alvos celulares específicos. Outros agrotóxicos, por sua vez, são formados por compostos que atuam diretamente no alvo (Brown et al., 1996).

Estudos que investigam os efeitos da exposição crônica de agrotóxicos sobre populações de animais silvestres ainda são relativamente incipientes. Dados constantes na literatura são, em sua maioria, referentes a compostos organoclorados, uma vez que esses são mais estáveis e persistentes no ambiente (Clark, 2001). A divulgação e compilação de dados de envenenamento por agrotóxicos em animais silvestres são recorrentes em países da União Européia e nos Estados Unidos. Entretanto, em países em desenvolvimento ainda há escassos relatos de casos, embora nesses países a biodiversidade esteja sendo afetada diretamente pela presença de resíduos de agrotóxicos no ambiente (Berny, 2007).

Os quirópteros podem ser diretamente afetados pela exposição a agrotóxicos, dentre os quais os fungicidas, que destroem ou inibem a ação de fungos. O mecanismo de ação dos fungicidas ocorre principalmente por bloqueio do ergosterol (principal esteroide fúngico), da biossíntese da tubulina ou da citocromo c redutase (Casida, 2009).

Cada fungicida apresenta toxicidade diferente conforme a natureza química, dose empregada e seu estado físico (Gallo et al., 2002). Os fungicidas são intensamente dispersos no ambiente para o controle de fungos, mas podem atuar também sobre outras espécies, causando efeitos paralelos em organismos não-alvo. Resíduos desses agrotóxicos 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). Dentre os fungicidas existentes, dois são amplamente utilizados: o Mancozeb, que é um tipo de ditiocarbamato, e o Tebuconazol, do grupo dos triazóis (Belpoggi et al., 2002; Menegola et al., 2008).

2.3.1. Espalhante adesivo

Em um líquido de moléculas polarizadas como a água, a atração entre suas moléculas é significativa e se exerce igualmente em todos os sentidos. Na superfície, pela descontinuidade da fase líquida, a atração entre elas é maior, o que gera uma tensão superficial. A tensão superficial é variável de líquido a líquido e depende também dos solutos. No caso da água pura e livre, em estado líquido, quando em pequena quantidade, a tensão é responsável pela tendência da água em formar gotas esféricas. Pressões externas, como a gravidade, causam deformações e forças diversas causam rupturas, com reagrupamento em gotículas menores (Matuo, 1998).

Quando uma gota de água está sobre uma superfície, o ângulo de contato depende das características dessa superfície. Se for hidrofóbica, o contato será menor e a gota ficará mais esférica. Se a superfície for mais hidrofílica, a água da gota se espalha, podendo até formar um filme uniforme (Matuo, 1998).

Numa planta, a molhabilidade de suas folhas, propriedade importante para a impregnação da calda contendo o agrotóxico na planta, depende dos constituintes de sua epiderme. A atração pela água precisa ser maior que a tensão superficial desse líquido para uma boa molhabilidade. Uma série de compostos, quando dissolvidos em líquidos, reduz a tensão superficial. Esses compostos são conhecidos como surfactantes, tenso-ativos, hipotensores ou espalhantes adesivos (Matuo, 1998).

Reduzindo a tensão superficial, os espalhantes adesivos apresentam os seguintes efeitos: molhante: por apresentarem sítios polares e sítios apolares em suas moléculas, funcionam como pontes de interfase entre líquidos como água (polar) e superfícies apolares (superfície da folha, devido à presença da cutícula), permitindo a molhabilidade de superfícies hidrofóbicas; espalhante: por abaixarem a tensão superficial de líquidos, fazem com que o ângulo de contato das gotas isoladas sobre a superfície seja diminuído e que elas deixem de ser esféricas. O acréscimo de espalhante adesivo nas caldas permite a formação de um filme líquido sobre as superfícies, por coalescência das gotas. Os efeitos molhante e espalhante se confundem na prática, ocorrendo primeiro o efeito molhante, seguindo-se o espalhante. A intensidade relativa desses dois efeitos, contudo, pode ser diferente de um espalhante adesivo para outro; penetrante: com baixa tensão superficial, os líquidos têm maior poder de penetração. Óleos, por exemplo, penetram mais facilmente que a água na maioria dos substratos. Com a diminuição da tensão superficial, a água presente nas caldas aquosas de agrotóxicos penetra de forma mais eficiente, podendo arrastar consigo alguns produtos fitossanitários (Matuo, 1998).

Os espalhantes adesivos, dessa forma, permitem que superfícies hidrofóbicas, como folhas ou frutos com cerosidade, corpos ou coberturas cerosas de pragas, etc, sejam molhadas pela calda do agrotóxico. O líquido aplicado se distribui melhor, cobrindo a superfície de modo uniforme, o que é particularmente importante para agrotóxicos com ação de contato. O espalhante também facilita a penetração da calda em superfícies pilosas (que contêm pelos), entre ranhuras diversas, hifas de fungos e teias de ácaros (Matuo, 1998).

O Polioxietileno Alquil Fenol Éter [$C_{15}H_{24}O(CH_2CHO)_n$] é um espalhante adesivo não iônico que geralmente é aplicado em pulverização, misturado às caldas de fungicidas, inseticidas, acaricidas ou herbicidas (Matuo, 1998).

2.3.2. Mancozeb

O Mancozeb ($C_4H_6MnN_2S_4$) é um fungicida do grupo dos etilenobisditiocarbamatos (EBDC), um subgrupo dos ditiocarbamatos, e é formado por um agrupamento de íons zinco com polímeros de etilenobisditiocarbamatos de manganês (Fig. 2A; Belpoggi et al., 2002). Lançado em 1944, o Mancozeb foi rapidamente adotado como fungicida devido sua eficiência no ataque contra grande variedade de fungos e fitopatologias causadas por fungos. É utilizado amplamente em lavouras para proteger frutas, vegetais e árvores ornamentais (Domico et al., 2006). Na América Latina, mais de 50% de todos os fungicidas utilizados são do grupo dos EBDC e, no Brasil, o volume de fungicidas EBDC supera os 40% do total utilizado no país, representando o principal produto contra fungos (WHO, 1988; Larini, 1999).

Os EBDC, de forma geral, são fungicidas de contato, que agem como inibidores multi-sítio no patógeno e formam uma barreira na superfície da planta, prevenindo a penetração do fungo no tecido vegetal (Gisi e Sierotzki, 2008). São geralmente instáveis em meio alcalino ou ácido, bem como em sistemas biológicos, e se decompõem rapidamente em água e na presença de oxigênio. A degradação pode ocorrer durante a manufatura ou armazenamento do produto formulado, na cultura após o tratamento e, principalmente, durante o processamento do alimento (WHO, 1988).

A decomposição dos EBDC é complexa e resulta na formação de dissulfeto de carbono (CS_2), sulfeto de hidrogênio (H_2S), etileno diamina (EDA), etileno bistiouram dissulfeto (DIDT), etileno diisocianato (EDI), etilenotiouréia (ETU), etilenouréia (EU) e 2-imidazolina (WHO, 1988). Os efeitos biológicos do Mancozeb no organismo de mamíferos devem-se principalmente aos metabólitos dissulfeto de carbono (CS_2) e etilenotiouréia (ETU), tendo o ETU maior importância na toxicidade do Mancozeb (O'Neil e Marshal, 1984).

Etilenotiouréia ou 2-imidazoledinona (ETU) tem como fórmula molecular $C_3H_6N_2S$ e é solúvel e medianamente estável em água. Resíduos de ETU podem ser encontrados em plantas e no ambiente, seguidos do uso na agricultura de EBDC, ou em animais e no ser humano, quando expostos a esses produtos (WHO, 1988). A

principal fonte de ETU é o íon etilenobisditiocarbamato (íon EBDC), um ingrediente ativo do Mancozeb, o qual representa 58,13% dos ingredientes. Os outros ingredientes são manganês (Mn^{+2}) (15%), zinco (Zn^{+2}) (1,87%) e outros ingredientes inertes (25%) (Ksheerasagar e Kaliwal, 2003).

Durante a estocagem, processamento e cozimento dos alimentos ocorre degradação espontânea do EBDC presente no Mancozeb, gerando ETU. Resíduos de ETU também podem ser encontrados na fumaça de cigarros, em plantas pulverizadas com EBDC e nas caldas de aplicação dos agrotóxicos (Lentza, 1990). A ETU tem baixa toxicidade aguda, mas possui atividade carcinogênica, goitrogênica, teratogênica e mutagênica em animais de experimentação (Lentza, 1990). Estudos mostram que este metabólito tem capacidade de induzir tumor na tireóide e no fígado em roedores (Triverdi et al., 1993; Yoshida et al., 1993; Elia et al., 1995; EPA, 2001).

Em morcegos da espécie *Artibeus lituratus*, a exposição aguda a baixas concentrações de Mancozeb (2g/L) levou a alterações metabólicas e hepáticas, o que resultou em aumento da reserva protéica hepática e no acúmulo de lipídios no tecido adiposo, aumento da vacuolização dos hepatócitos e maior vascularização do tecido hepático (Carvalho, 2010; Machado, 2010).

De acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o Mancozeb é classificado toxicologicamente como medianamente tóxico. Quanto à classificação ambiental, é enquadrado como perigoso ao meio ambiente.

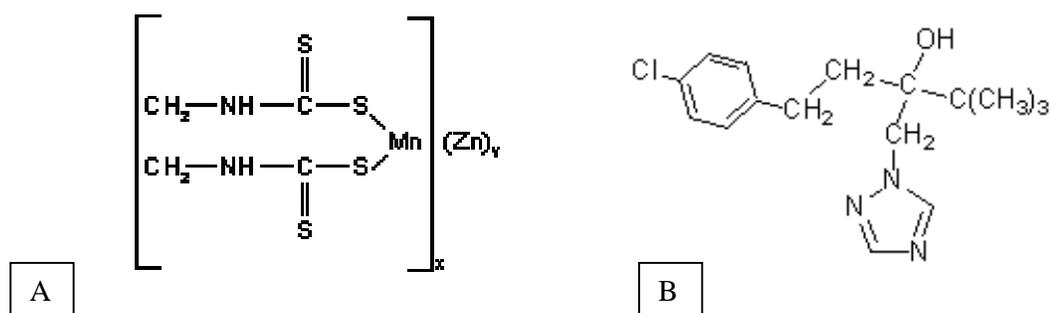


Figura 2: A) Fórmula estrutural do Mancozeb (Fonte: Kackar et al., 1997). B) Fórmula estrutural do Tebuconazol (Fonte: Shen et al., 2012).

2.3.3. Tebuconazol

O Tebuconazol, [(RS)-1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmethyl) pentan-3-ol] (Fig. 2B), está inserido no grupo dos fungicidas azóis, os quais possuem ampla atividade anti-fúngica. De acordo com sua estrutura química, os componentes azóis são classificados em triazóis, que incluem 16 fungicidas inclusive o Tebuconazol, e imidazóis, com três fungicidas no mercado. A atividade anti-fúngica dessas duas classes baseia-se no mesmo mecanismo molecular (Roberts e Hutson, 1999), que causa perturbação na síntese de ergosterol, um componente esterol essencial da membrana plasmática de fungos. Os fungicidas azóis inibem a atividade da enzima esterol 14 α -desmetilase, a qual é um membro da superfamília das heme-proteínas citocromo P450 e participa da conversão de lanosterol em ergosterol (Espinel-Ingroff, 1997; Joseph-Horne e Hollomon, 1997; Georgopapadakou, 1998). Tal inibição leva à formação de esteróis que ainda apresentam o grupo metil C14, alterando a conformação e as propriedades físicas da membrana do fungo (Menegola et al., 2008). Ocorre, então, um aumento na permeabilidade celular com consequente inibição do crescimento do fungo (Goetz et al., 2009).

Uma característica conhecida dos fungicidas azóis é sua atividade como disruptor endócrino (Zarn et al., 2003; Goetz et al., 2007; Taxvig et al., 2007). Em experimentos realizados com Tebuconazol em ratas, observou-se alta incidência de malformação fetal e diminuição da massa corporal dos fetos (Menegola et al., 2008). Outros efeitos conhecidos da bioacumulação dos triazóis, sobre parâmetros reprodutivos, são aumento do período gestacional, virilização dos filhotes fêmeas e alterações nas concentrações plasmáticas de hormônios esteróides (Hass et al., 2007). A exposição crônica a fungicidas triazóis, em experimentos com roedores, também está diretamente relacionada à hepatotoxicidade, neurotoxicidade e tumorigênese (Ward et al., 2006).

Em morcegos da espécie *Artibeus lituratus*, a exposição aguda a baixas concentrações de Tebuconazol (1mL/L) levou a alterações metabólicas e hepáticas, resultando em aumento do acúmulo lipídico nos hepatócitos e no tecido adiposo, aumento da reserva protéica muscular e hepática e diminuição do conteúdo de glicogênio no músculo peitoral (Carvalho, 2010; Machado, 2010).

São poucos os trabalhos encontrados que estudam o efeito desses fungicidas no aparelho reprodutor masculino, especialmente sobre a histomorfometria testicular.

De acordo com o Ministério da Agricultura, o Tebuconazol é classificado toxicologicamente como extremamente tóxico e, quanto à classificação ambiental, é considerado muito perigoso ao meio ambiente (AGROFIT).

2.4. Testículo

Ainda são poucos os estudos sobre as características morfológicas dos testículos de morcegos, principalmente para *Artibeus lituratus*. Sabe-se que testículos de espécies de morcegos tropicais passam por migrações sazonais entre o abdômen e o escroto, a fim de adequar os testículos às flutuações sazonais de temperaturas às quais estão expostos (Morais, 2008).

O testículo é um órgão com função exócrina e endócrina, geralmente envolvido por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, a albugínea testicular. Esta túnica, de maneira variada nas diferentes espécies de mamíferos, emite septos para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, dividindo o testículo em lóbulos nem sempre aparentes. O testículo é constituído por dois compartimentos, o tubular e o intertubular (Russell et al., 1990).

O compartimento tubular constitui a maior parte do testículo, ocupando, na maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (França e Russell, 1998; Godinho, 1999). Nesse compartimento são encontrados os túbulos seminíferos, os quais são responsáveis pela produção dos espermatozoides. Os túbulos seminíferos são constituídos, de sua porção externa para a interna, de túnica própria, epitélio seminífero e lúmen, e se conectam através das duas extremidades à *rete testis*, localizada na região do mediastino testicular. Na túnica própria são observadas as células mióides ou peritubulares, a membrana basal e as fibras colágenas. Dois tipos celulares de origem embriológica distinta estão presentes no epitélio seminífero: as células de Sertoli, provenientes do epitélio celomático, e as células germinativas ou espermatogênicas, originárias do epiblasto (Karl e Capel, 1998). No lúmen tubular encontram-se o fluido testicular, secretado pelas células de Sertoli, e os espermatozoides (Russell et al., 1990).

Os elementos componentes do compartimento intertubular são as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, fibras do tecido conjuntivo e uma população celular variável, constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Russell et al., 1990; Setchell, 1991).

Apesar da estrutura geral do testículo seguir um padrão relativamente rígido para as diversas espécies de mamíferos, existem muitas variações no que se refere à proporção volumétrica dos diferentes componentes que o constituem, principalmente em relação aos túbulos seminíferos, células de Leydig e disposição/proporção dos vasos sanguíneos e espaços linfáticos (Russell et al., 1990; Setchell, 1991; Bardin, 1996).

A espermatogênese ocorre nos túbulos seminíferos, sendo um processo complexo e bem organizado, que dura entre 40 e 60 dias, na maioria dos mamíferos até hoje investigados (França e Russell, 1998). Este processo pode ser dividido em três fases, baseado em considerações morfológicas e funcionais: (1) fase proliferativa (espermatogonial), na qual as células sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; (2) fase meiótica (espermatocitogênica), na qual o material genético duplicado passa por recombinação genética durante a meiose; e (3) fase de diferenciação (espermio gênica), na qual as espermátides sofrem enormes modificações, transformando-se em espermatozoides, células muito especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos. Cada uma destas fases dura aproximadamente 1/3 do processo espermatogênico (Russell et al., 1990).

As células espermatogênicas não estão arranjadas ao acaso no epitélio seminífero, mas sim organizadas numa série bem definida de associações celulares ou estádios, caracterizando o que chamamos de ciclo do epitélio seminífero (Leblond e Clermont, 1952; Ortavant et al., 1977; Russell et al., 1990).

A duração deste ciclo é uma constante biológica espécie específica, a qual está sob controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1995), não sendo influenciada por qualquer fator conhecido (Clermont, 1972; Amann e Schanbacher, 1983). Aproximadamente 4,5 ciclos são requeridos para que o processo espermatogênico se complete em mamíferos, ou seja, ocorra a liberação dos espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero a partir de uma espermatogônia A_i (Amann e Schanbacher, 1983; França e Russell, 1998).

As células de Sertoli, também presentes no epitélio seminífero, desempenham papel fundamental na regulação da espermatogênese, por servir como suporte das células germinativas em desenvolvimento, formar a barreira hematotesticular ao compartimentalizar o epitélio seminífero, através de junções de oclusão, além de participar da liberação de espermatozoides no lúmen tubular, secretar fluidos e proteínas, fagocitar células germinativas em degeneração e excessos de citoplasma

das espermátides em espermição (Russell e Griswold, 1993; França e Russell, 1998). A célula de Sertoli também desempenha papel chave na mediação da ação do hormônio folículo estimulante (FSH) e da testosterona na espermatogênese, provavelmente de maneira cíclica (Russell et al., 1990).

Estudos mostram que o número de células de Sertoli por testículo é o principal fator na determinação da produção espermática e no tamanho do testículo (Orth et al., 1988; Hess et al., 1993; França et al., 1995). Tal assertiva baseia-se no fato de que as células de Sertoli têm uma capacidade de suporte de células germinativas relativamente fixa para cada espécie e que a população deste tipo celular não aumenta após a puberdade (Steinberger e Steinberger, 1971; Orth, 1982; Orth et al., 1988; França e Russell, 1998).

Levando-se em consideração que a população de células de Sertoli é estável ao longo dos estádios do ciclo, estas células ainda têm sido utilizadas numericamente como ponto de referência para a quantificação e correção de contagem de células germinativas (Clermont e Morgentaler, 1955; Bustos-Obregon, 1970; Shakkebak e Heller, 1973; França, 1991). Constituem também a base para o estudo de alterações no processo espermatogênico, em decorrência de fatores patológicos e terapêuticos (Rowley e Heller, 1971; Russell e Clermont, 1977; Sinha-Hikim et al., 1985; Russell et al., 1990).

2.5. Células de Leydig

A célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais frequente no compartimento intertubular, caracterizando-se como células relativamente grandes, poliédricas e limitadas pela membrana plasmática que contém microvilos. Seu núcleo está localizado excentricamente no citoplasma, com um a três nucléolos, e usualmente apresenta forma arredondada ou oval. Grânulos de cromatina condensada formam uma camada intimamente associada ao envoltório nuclear, sendo esta uma característica universal destas células (Setchell, 1991). Durante o desenvolvimento testicular, mais precisamente na puberdade e durante a recrudescência testicular em animais sazonais, a célula de Sertoli deixa de ser modulada unicamente pelo hormônio folículo estimulante (FSH) e, gradativamente, passa a ser modulada também pela testosterona. Assim, como preparação para esta substituição, as células de Leydig devem ser adequadas numérica e fisiologicamente para dar suporte ao novo

requerimento de testosterona, sendo que o FSH parece influenciar diretamente no desenvolvimento desta população (Sharpe, 1994).

As células de Leydig encontram-se em contato íntimo com o sistema de capilares sanguíneos e são responsáveis pela síntese e armazenamento de testosterona, um importante hormônio que promove o comportamento sexual normal e a ocorrência do processo espermatogênico, juntamente com os hormônios FSH e hormônio luteinizante (LH). A testosterona também tem como papel manter a função das glândulas acessórias, promover tanto a diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa na fase fetal (Pelliniemi et al., 1996) quanto o aparecimento dos caracteres sexuais secundários e atuar na manutenção quantitativa da espermatogênese a partir da puberdade (Sharpe, 1994; Zirkin et al., 1994; Russell, 1996).

A produção de testosterona pelas células de Leydig é controlada pelo LH que se une a receptores específicos presentes na face externa das membranas das células de Leydig e ativa a adenosina-monofosfato cíclica (cAMP). Este processo dá início à ativação das proteínas cinases que catalisam a fosforilação das proteínas intracelulares e a mobilização de precursores dos esteróides, principalmente através da conversão do colesterol a pregnenolona. O LH também tem efeito trófico sobre as células de Leydig, estimulando-as a se hipertrofiar. A remoção do LH cessa a produção de testosterona e leva à grande redução no tamanho das células de Leydig (Bardin, 1996; Stanbenfeldt e Edqvist, 2006). A testosterona produzida pelas células de Leydig tem uma ação parácrina ao se difundir para os túbulos seminíferos, atravessando facilmente a barreira hematotesticular (Goodman, 2000; Stanbenfeldt e Edqvist, 2006). Altas concentrações são necessárias para a espermatogênese e especialmente para o processo de meiose. A ação dos andrógenos na espermatogênese acontece via células de Sertoli, já que as células germinativas não possuem receptores para andrógenos (Lyu e Handelsman, 2003).

Inúmeros fatores podem influenciar na quantidade de células de Leydig por animal, dentre os quais podem ser destacados a quantidade de LH disponível, o número de receptores de LH por células, a quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar por unidade de tempo, a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fluidos seminiais, o volume sanguíneo do animal e a taxa de metabolismo da testosterona (Russell, 1996).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Fungicidas

Os fungicidas utilizados no estudo foram o Mancozeb BR® (80% p/p), na concentração 2g/L e o Folicur® (200g/L) na concentração 1mL/L. Os ingredientes ativos desses fungicidas são o Mancozeb e o Tebuconazol, respectivamente. As concentrações dos fungicidas utilizadas no experimento foram as mesmas recomendadas pelos fabricantes para uso nas lavouras. Os fungicidas foram aplicados nas frutas juntamente com o espalhante adesivo Polioxietileno Alquil Fenol Éter (200g/L) na concentração 1mL/L, de acordo com as especificações do fabricante. Tanto os fungicidas, quanto o espalhante, foram obtidos no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas do Departamento de Biologia Animal da UFV.

3.2. Animais e tratamento

Morcegos machos (n=28) da espécie *Artibeus lituratus* foram capturados na Mata do Paraíso localizada no campus da Universidade Federal de Viçosa/MG e na fazenda do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, em Araponga/MG, no período de agosto a dezembro de 2009 e 2011. A coleta foi autorizada pelo IBAMA (1936505) e pelo IEF (121/06) e foi realizada utilizando-se redes de neblina nas regiões onde se encontra pomares. Os participantes da captura dos animais possuíam conhecimento prévio da manipulação dos animais e foram previamente imunizados com as vacinas antirrábica e antitetânica. Toda a metodologia do experimento que faz referência ao uso e eutanásia dos animais foi aprovada pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Feral de Viçosa – CEUA/UFV, sendo o número da aprovação no comitê 02/2012.

Após a captura, os animais foram mantidos em gaiolas adaptadas para sua posição de repouso até o dia seguinte. Os morcegos permaneceram por um período de adaptação de dois dias em um morcegário instalado no Museu de Zoologia da Universidade Federal de Viçosa (Fig. 3A). Transcorrido esse período, os animais foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos, descritos na Tabela 1. Durante todo o tratamento os animais permaneceram no morcegário, sendo que cada grupo foi separado espacialmente um do outro.

Tabela1: Distribuição dos grupos experimentais de morcegos *A. lituratus* tratados com dois tipos de fungicidas por sete ou 30 dias.

Grupos	Tratamentos
GC	Controle, sem fungicida e espalhante (sete dias; n=5)
GCE	Controle com espalhante adesivo Polioxietileno Alquil Fenol Éter por sete dias (1mL/L; n=5)
GME7	Mancozeb (2g/L) + espalhante (1mL/L) por sete dias (n=6)
GTE7	Tebuconazol (1mL/L) + espalhante (1mL/L) por sete dias (n=6)
GTE30	Tebuconazol (1mL/L) + espalhante (1mL/L) por 30 dias (n=6)

Os morcegos frugívoros foram alimentados em cativeiro diariamente às 18:00 horas, sendo a água oferecida *ad libitum*. Aos animais foram oferecidas metades de mamão, pesando aproximadamente 200g cada. As frutas destinadas aos animais do grupo controle foram fornecidas após a lavagem da casca com água corrente. Os animais do grupo controle com espalhante receberam frutos lavados e imersos somente em calda contendo o espalhante. Já os animais submetidos aos tratamentos com fungicidas receberam frutos previamente lavados e que foram imersos, primeiramente, em calda contendo o espalhante adesivo e, em seguida, em uma calda preparada com Mancozeb ou Tebuconazol, dependendo do grupo.

Para minimizar a perda por contato da camada de fungicida, as porções de frutas, após serem imersas nas caldas, foram mantidas suspensas em recipientes adaptados, evitando o contato delas com superfícies (Fig. 3B). As frutas foram ofertadas com as cascas posicionadas para cima, no intuito de simular condições mais fiéis às da natureza (Fig. 3C e 3D).

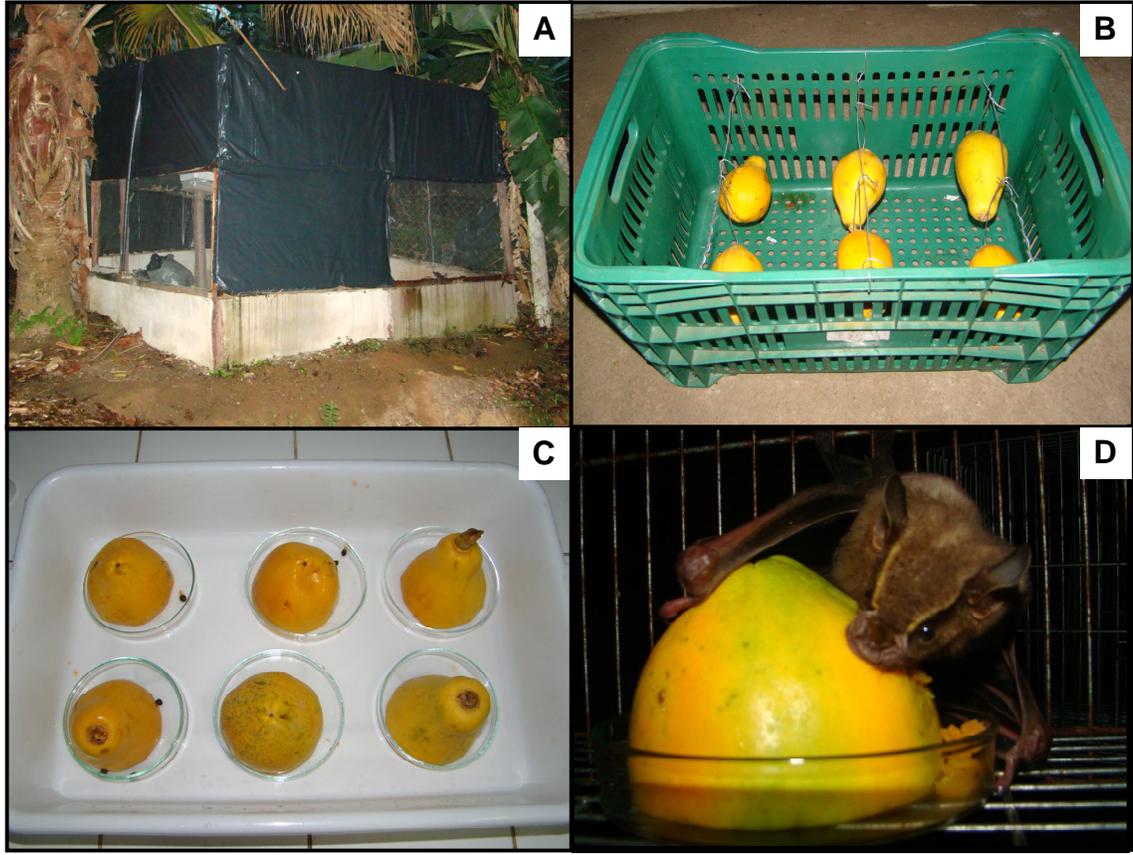


Figura 3: **A:** morcegário instalado no Museu de Zoologia da Universidade Federal de Viçosa; **B:** Recipiente adaptado contendo frutos que foram imersos em caldas preparadas com o espalhante adesivo e os fungicidas; **C:** metades dos mamões prontas para serem servidas aos animais; **D:** morcego *Artibeus lituratus* alimentando-se do fruto, o qual era oferecido com a casca posicionada para cima no intuito de tornar as condições em cativeiro mais fiéis às encontradas na natureza.

3.3. Eutanásia e coleta dos órgãos

Os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina, seguido pela pesagem da carcaça total do animal em balança de precisão (0,001g). A coleta dos testículos foi feita a partir de uma incisão longitudinal mediana na região ventral dos animais. Os órgãos foram fixados em Karnovsky por 24 horas em temperatura ambiente.

3.4. Processamento histológico do material

Para estudos em microscopia de luz, os testículos foram processados no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV. Todas as análises morfológicas também foram realizadas nesse local.

Após a fixação por imersão em solução de Karnovsky (paraformaldeído 4% e glutaraldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4), fragmentos testiculares foram submetidos a uma série crescente de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e absoluto), respeitando-se o intervalo de 30 minutos entre cada concentração de álcool. Concluído o processo de desidratação, os órgãos foram incluídos em resina à base de hidroxietilmetacrilato (Historesin®, Leica) e posteriormente mantidos em estufa a 37° C por 24 horas.

Cortes histológicos foram obtidos de modo sequencial semi-seriado com 3µm de espessura (intervalo entre cortes de 39µm) utilizando-se micrótomo automático (Reichert-Jung, Alemanha) e navalha de vidro. Os cortes foram corados com solução de azul de toluidina/ borato de sódio 1% e a montagem das lâminas foi feita utilizando-se Entellan® (Merck) para análise em microscópio de luz Olympus BX-50.

3.5. Histomorfometria testicular

3.5.1. Índice gonadossomático (IGS)

O índice gonadossomático (IGS) foi calculado utilizando-se os dados dos pesos corporal e testicular para cada animal, aplicando-se estes valores à seguinte fórmula: $IGS = PG/PC \times 100$, em que PG corresponde ao peso gonadal e PC ao peso corporal.

3.5.2. Proporção volumétrica (%) e volume dos componentes do testículo

Como o testículo é dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular, as proporções volumétricas entre esses elementos foram estimadas a partir da contagem de 2.420 pontos projetados sobre as imagens obtidas em lâminas histológicas, em aumento de 100x. Para tal utilizou-se fotomicroscópio Olympus BX-40 e através do programa para análise de imagens Image Pro Plus®, com uso de um retículo de 242 intersecções (pontos), realizou-se a contagem de 10 campos aleatoriamente distribuídos nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal. Foram computados pontos coincidentes com a túnica própria, o epitélio seminífero e o

lúmen, e os pontos sobre o espaço intertubular. Os resultados foram expressos em porcentagem.

O volume de cada componente testicular, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado por eles no testículo e do conhecimento do volume do parênquima testicular. O valor deste último foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo o peso da albugínea e do mediastino testicular. Como a densidade do testículo é em torno de 1 (França, 1991), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

Baseado nos volumes de túbulos seminíferos e nos pesos corporais foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da fórmula: $ITS = VT/PC \times 100$, sendo que: VT=volume do túbulo seminífero e PC=peso corporal.

3.5.3. Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento dos túbulos seminíferos.

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentaram contorno o mais circular possível. Estas medidas, expressas em μm , não levaram em consideração o estágio do ciclo e foram realizadas utilizando-se o software de análise de imagens Image-Pro Plus® em aumento de 200x.

Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular mensurou-se a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da membrana basal até o lume tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo representa a média de quatro medidas tomadas de forma diametralmente opostas expressas em μm .

Estimou-se o comprimento total dos túbulos seminíferos (CT), expresso em metros, por testículo e por grama de testículo. O CT por testículo foi calculado a partir da fórmula: $CT = VTS/\pi R^2$, em que VTS=volume total dos túbulos seminíferos; πR^2 =área da secção transversal dos túbulos seminíferos e R=diâmetro tubular/2. Para cálculo deste comprimento por grama de testículo, dividiu-se o valor anterior pelo peso testicular total. O comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo (CTT), também expresso em metros, foi obtido multiplicando-se o CT por testículo por dois (Attal e Courot, 1963; Dorst e Sajonski, 1974).

3.5.4. Proporção volumétrica e volume dos elementos do intertúbulo

Avaliou-se o intertúbulo registrando-se 1.000 pontos sobre o núcleo e citoplasma das células de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático e tecido conjuntivo. Estas contagens foram feitas utilizando-se o programa para análise de imagens Image pro Plus®, associado ao fotomicroscópio Olympus BX-40.

O percentual de cada elemento do intertúbulo foi obtido multiplicando por 100 o número de pontos contados sobre este elemento, e dividindo o valor por 1.000. O volume que o elemento ocupa no parênquima testicular, expresso em mL, foi obtido multiplicando-se a porcentagem desse elemento no intertúbulo pelo peso do parênquima testicular, dividindo-se esse valor por 100.

3.5.5. Morfometria de células de Leydig

O diâmetro nuclear médio das células de Leydig foi mensurado em imagens capturadas com objetiva de 40x. Trinta núcleos de células de Leydig foram mensurados por animal, utilizando-se o programa para análise de imagens Image Pro Plus®, escolhendo-se os núcleos que apresentaram contorno circular, cromatina perinuclear padrão e nucléolos evidentes. A proporção núcleo-plasmática foi obtida através da proporção volumétrica dos elementos do intertúbulo.

Foram calculados os volumes nuclear e citoplasmático e, conseqüentemente, o volume de cada célula de Leydig por animal. O volume nuclear (VN) foi obtido a partir da fórmula: $VN=4/3\pi R^3$, em que R=raio nuclear. Para cálculo do volume citoplasmático (VC) utilizou-se a fórmula: $VC= \% \text{ citoplasma} \times VN/\% \text{ núcleo}$. Finalmente o volume celular foi obtido somando-se o VN e o VC. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos (μm^3).

Para cálculo do número total de células de Leydig e do número de células de Leydig por grama de testículo, os volumes nucleares e o volume de células de Leydig foram convertidos para cm^3 . Dividiu-se, então, o volume total de células de Leydig por parênquima testicular pelo volume de células de Leydig (cm^3), obtendo-se, desta forma, o número total de células de Leydig. Para se estimar o número destas células por grama de testículo, dividiu-se o valor obtido anteriormente pelo peso gonadal total.

Com o objetivo de se quantificar o investimento em células de Leydig em relação à massa corporal, foi calculado o índice leydigossomático (ILS), utilizando-se

a fórmula: $ILS = \text{volume total de células de Leydig por parênquima testicular} / PC \times 100$, em que PC=peso corporal.

3.6. Análises Estatísticas

Os dados utilizados nesse experimento referentes às médias e aos desvios padrão foram obtidos utilizando a função estatística do programa Microsoft Office Excel® 2003. As médias entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA), sendo posteriormente comparadas pelo teste de Student Newman-Keuls ao nível de significância de 5%, utilizando-se o programa STATISTICA.

4. RESULTADOS

4.1. Peso corporal, testicular e índice gonadossomático:

Os valores médios obtidos para peso corporal, peso testicular total e índice gonadossomático estão mostrados na Tabela 2. Não foi observada diferença entre os grupos para estes parâmetros ($p > 0,05$), assim como para as médias encontradas para o peso da albugínea, peso do parênquima testicular e percentual de albugínea nos testículos (Tab. 3).

Tabela 2: Peso corporal (PC) e testicular (PT) e índice gonadossomático (IGS) de *Artibeus lituratus* expostos aos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol ($p > 0,05$).

Grupos	PC (g)	PT (g)	IGS (%)
GC	71,44 ± 3,77	0,29 ± 0,12	0,40 ± 0,17
GCE	77,59 ± 6,22	0,30 ± 0,12	0,38 ± 0,14
GME7	76,46 ± 4,19	0,27 ± 0,07	0,35 ± 0,09
GTE7	77,14 ± 4,86	0,31 ± 0,09	0,40 ± 0,12
GTE30	77,88 ± 5,34	0,17 ± 0,04	0,22 ± 0,05

Média e desvio-padrão; **GC**: animais sem aplicação de fungicidas e espalhante adesivo (controle 7 dias); **GCE**: animais com aplicação do espalhante adesivo (controle 7 dias); **GME7**: animais expostos ao Mancozeb 2g/L por 7 dias; **GTE7**: animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 7 dias; **GTE30**: animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 30 dias.

Tabela 3: Peso médio da albugínea (PA) e do parênquima testicular (PPT) e percentual de albugínea (A) nos testículos de *Artibeus lituratus* expostos aos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol ($p>0,05$).

Grupos	PA (g)	PPT (g)	A (%)
GC	0,011 ± 0,003	0,27 ± 0,11	8,13 ± 1,89
GCE	0,013 ± 0,004	0,27 ± 0,11	9,09 ± 1,25
GME7	0,012 ± 0,005	0,25 ± 0,07	9,18 ± 3,61
GTE7	0,012 ± 0,003	0,28 ± 0,08	8,16 ± 1,94
GTE30	0,009 ± 0,005	0,15 ± 0,03	10,09 ± 3,81

Média e desvio-padrão; **GC**: animais sem aplicação de fungicidas e espalhante adesivo (controle 7 dias); **GCE**: animais com aplicação do espalhante adesivo (controle 7 dias); **GME7**: animais expostos ao Mancozeb 2g/L por 7 dias; **GTE7**: animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 7 dias; **GTE30**: animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 30 dias.

4.2. Morfometria do túbulo seminífero

As médias obtidas para a proporção volumétrica e o volume dos componentes do parênquima testicular estão mostradas na tabela 4. Os animais expostos ao Tebuconazol por 30 dias apresentaram menor porcentagem de túbulo seminífero no parênquima testicular que os animais dos grupos controle sem e com espalhante ($p<0,05$). Este grupo de tratamento crônico também apresentou menor percentual médio do índice tubulossomático que o grupo controle sem espalhante e fungicida ($p<0,05$). Já no que se refere à porcentagem de intertúbulo no parênquima testicular, os animais expostos ao Tebuconazol (30 dias) apresentaram valores maiores do que os animais dos grupos controle, com e sem espalhante ($p<0,05$). Não foram encontradas diferenças entre as médias dos grupos para os volumes totais dos túbulos seminíferos e do intertúbulo ($p>0,05$).

Considerando os componentes presentes no compartimento tubular (Tab. 5), verificou-se que os animais expostos ao Tebuconazol por 30 dias apresentaram menor valor médio para a porcentagem de epitélio seminífero em relação aos animais dos grupos controle, sem e com espalhante adesivo ($p<0,05$). Já os percentuais de lúmen e túnica própria não apresentaram diferenças entre os grupos ($p>0,05$).

Tabela 4: Proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular, dos volumes totais dos túbulos seminíferos e do compartimento intertubular e do índice tubulossomático (ITS) dos testículos de *Artibeus lituratus* expostos aos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol.

Grupos	TS (%)	INT (%)	VTTS (mL)	VTI (mL)	ITS (%)
GC	90,42 ± 2,06 ^a	9,58 ± 2,06 ^a	0,24 ± 0,11 ^a	0,024 ± 0,008 ^a	0,34 ± 0,15 ^a
GCE	88,91 ± 2,58 ^a	11,09 ± 2,58 ^a	0,24 ± 0,09 ^a	0,031 ± 0,017 ^a	0,31 ± 0,11 ^{ab}
GME7	85,21 ± 3,69 ^{ab}	14,79 ± 3,69 ^{ab}	0,21 ± 0,06 ^a	0,038 ± 0,018 ^a	0,27 ± 0,07 ^{ab}
GTE7	86,38 ± 4,35 ^{ab}	13,62 ± 4,35 ^{ab}	0,25 ± 0,08 ^a	0,037 ± 0,011 ^a	0,32 ± 0,11 ^{ab}
GTE30	81,59 ± 3,37 ^b	18,41 ± 3,37 ^b	0,13 ± 0,03 ^a	0,028 ± 0,009 ^a	0,16 ± 0,003 ^b

Média e desvio-padrão; ^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (p<0,05) pelo teste de Student Newman-Keuls; **GC**: animais sem aplicação de fungicidas e espalhante adesivo (controle 7 dias); **GCE**: animais com aplicação do espalhante adesivo (controle 7 dias); **GME7**: animais expostos ao Mancozeb 2g/L por 7 dias; **GTE7**: animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 7 dias; **GTE30**: animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 30 dias; **TS**: túbulos seminíferos; **INT**: intertúbulo; **VTTS**: volume total dos túbulos seminíferos; **VTI**: volume total do intertúbulo; **ITS**: índice tubulossomático.

Tabela 5: Percentual dos componentes do compartimento tubular dos testículos de *Artibeus lituratus* expostos aos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol.

Grupos	ES (%)	L (%)	TP (%)
GC	79,55 ± 1,84 ^a	9,30 ± 0,85 ^a	1,58 ± 0,50 ^a
GCE	77,95 ± 2,56 ^a	9,35 ± 0,62 ^a	1,61 ± 0,21 ^a
GME7	74,86 ± 2,99 ^{ab}	9,02 ± 1,71 ^a	1,34 ± 0,39 ^a
GTE7	74,44 ± 4,57 ^{ab}	10,35 ± 1,51 ^a	1,60 ± 0,16 ^a
GTE30	70,65 ± 3,28 ^b	9,32 ± 1,11 ^a	1,62 ± 0,19 ^a

Média e desvio-padrão; ^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (p<0,05) pelo teste de Student Newman Keuls; **GC**: animais sem aplicação de fungicidas e espalhante adesivo (controle 7 dias); **GCE**: animais com aplicação do espalhante adesivo (controle 7 dias); **GME7**: animais expostos ao Mancozeb 2g/L por 7 dias; **GTE7**: animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 7 dias; **GTE30**: animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 30 dias; **ES**: epitélio seminífero; **L**: lúmen; **TP**: túnica própria.

Na tabela 6 encontram-se as médias dos grupos quanto ao diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero, comprimento dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo e comprimento total dos túbulos seminíferos. Enquanto os valores médios para altura do epitélio seminífero, comprimento dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo e comprimento total dos túbulos seminíferos não variaram entre os grupos ($p>0,05$), o diâmetro tubular médio foi menor nos animais tratados com Tebuconazol por 30 dias, quando comparado ao valor médio obtido para os animais dos grupos controle sem espalhante, tratados com Mancozeb e Tebuconazol, ambos por sete dias ($p<0,05$).

Tabela 6: Média e desvio-padrão do diâmetro tubular (DT), da altura do epitélio seminífero (AES), dos comprimentos dos túbulos seminíferos por testículo (CTST) e por grama de testículo (CTSGT) e do comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS) dos testículos de *Artibeus lituratus* expostos aos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol.

Grupos	DT (μm)	AES (μm)	CTST (m)	CTSGT (m)	CTTS (m)
GC	201,46 \pm 26,28 ^a	70,03 \pm 9,17 ^a	3,61 \pm 0,70 ^a	27,03 \pm 6,51 ^a	7,23 \pm 1,41 ^a
GCE	187,49 \pm 24,47 ^{ab}	67,74 \pm 10,30 ^a	4,35 \pm 1,45 ^a	30,75 \pm 9,80 ^a	8,70 \pm 2,90 ^a
GME7	185,20 \pm 7,94 ^a	70,35 \pm 3,42 ^a	3,84 \pm 0,75 ^a	28,84 \pm 2,69 ^a	7,69 \pm 1,49 ^a
GTE7	185,17 \pm 15,70 ^a	70,76 \pm 4,91 ^a	4,47 \pm 0,90 ^a	29,89 \pm 4,78 ^a	8,94 \pm 1,79 ^a
GTE30	158,81 \pm 8,65 ^b	61,55 \pm 2,68 ^a	3,14 \pm 0,44 ^a	37,43 \pm 5,81 ^a	6,27 \pm 0,88 ^a

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p<0,05$) pelo teste de Student Newman Keuls. **GC:** animais sem aplicação de fungicidas e espalhante adesivo (controle 7 dias); **GCE:** animais com aplicação do espalhante adesivo (controle 7 dias); **GME7:** animais expostos ao Mancozeb 2g/L por 7 dias; **GTE7:** animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 7 dias; **GTE30:** animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 30 dias.

A análise histológica dos testículos dos morcegos mostrou que todos os animais, independente do grupo, apresentaram túbulos seminíferos íntegros, com morfologia normal e com células germinativas em diferentes estágios da espermatogênese (Fig. 5). Embora não quantificados, todos os animais exibiram espermatozóides no lúmen e espermátides alongadas no epitélio seminífero.

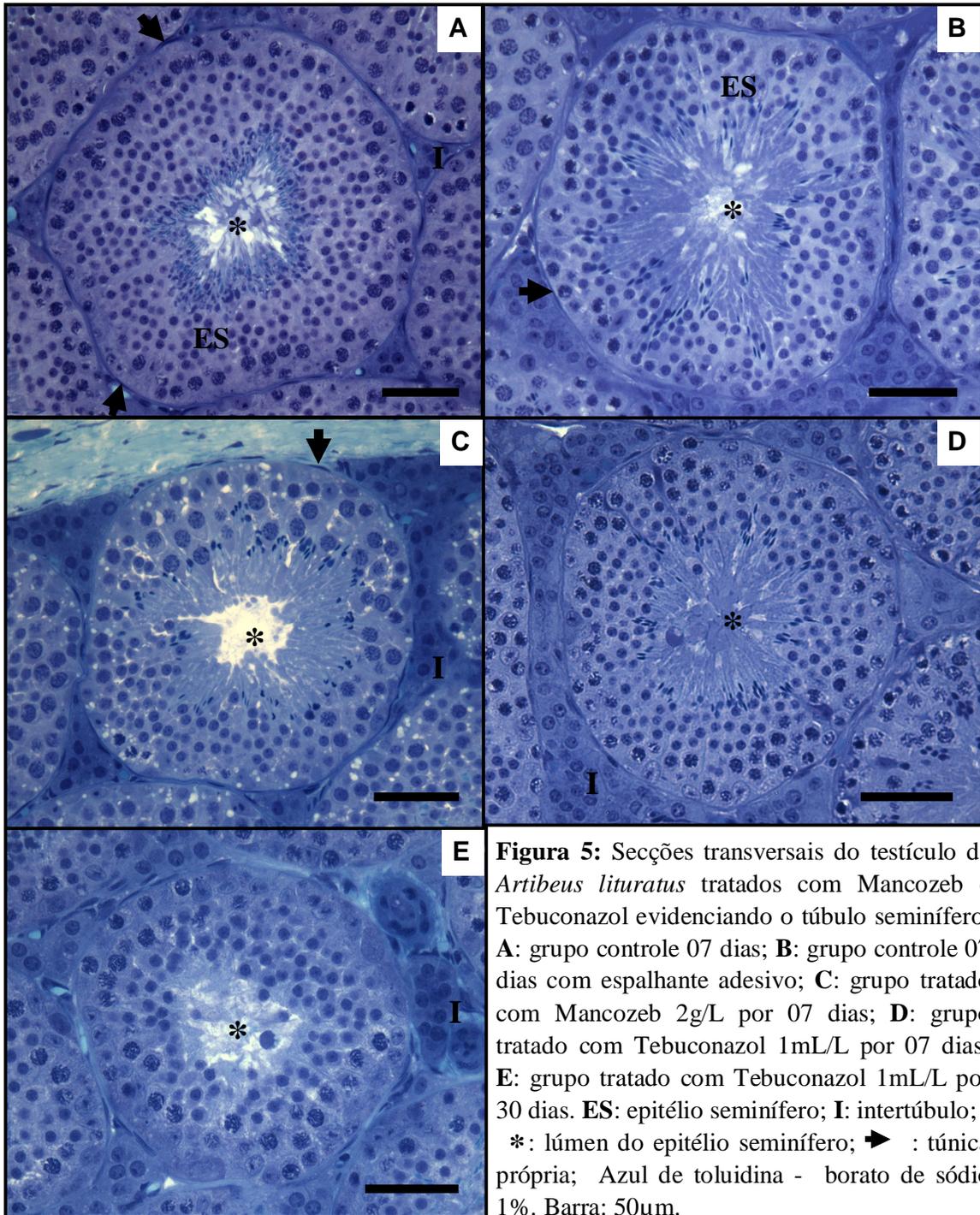


Figura 5: Secções transversais do testículo de *Artibeus lituratus* tratados com Mancozeb e Tebuconazol evidenciando o túbulo seminífero. **A:** grupo controle 07 dias; **B:** grupo controle 07 dias com espalhante adesivo; **C:** grupo tratado com Mancozeb 2g/L por 07 dias; **D:** grupo tratado com Tebuconazol 1mL/L por 07 dias; **E:** grupo tratado com Tebuconazol 1mL/L por 30 dias. **ES:** epitélio seminífero; **I:** intertúbulo; *****: lúmen do epitélio seminífero; **➤** : túnica própria; Azul de toluidina - borato de sódio 1%. Barra: 50µm.

4.3. Avaliação morfológica dos elementos do intertúbulo

Em relação à morfometria do intertúbulo, a proporção volumétrica de ocupação por cada um dos elementos intertubulares está mostrada na tabela 7. Considerando-se o percentual de célula de Leydig e do núcleo dessas células no intertúbulo, não foram encontradas diferenças entre as médias dos grupos ($p>0,05$). Entretanto, ao se analisar a proporção de citoplasma de célula de Leydig no intertúbulo, observou-se redução dessa proporção nos animais tratados com Tebuconazol por 30 dias, quando comparados aos animais do grupo controle com espalhante e tratados com Mancozeb por sete dias ($p<0,05$). Animais tratados com Tebuconazol por 30 dias também apresentaram maior percentual de vasos sanguíneos que os animais controle sem tratamento com espalhante e redução no percentual de espaço linfático, quando comparado aos animais tratados com Tebuconazol por sete dias ($p<0,05$). Não foi encontrada diferença entre os grupos quanto à proporção de tecido conjuntivo presente no intertúbulo ($p>0,05$).

Tabela 7: Média e desvio-padrão dos percentuais de célula de Leydig (CL) e de componentes do compartimento intertubular dos testículos de *Artibeus lituratus* expostos aos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol.

Grupos	CL (%)	NCL (%)	CCL (%)	VS (%)	EL (%)	TC (%)
GC	83,88 ± 2,27 ^a	22,94 ± 4,54 ^a	60,94 ± 3,65 ^{ab}	10,56 ± 2,10 ^a	5,06 ± 0,86 ^{ab}	0,50 ± 0,10 ^a
GCE	83,08 ± 4,72 ^a	21,20 ± 4,59 ^a	61,88 ± 5,27 ^a	12,24 ± 3,36 ^{ab}	4,30 ± 2,27 ^{ab}	0,38 ± 0,31 ^a
GME7	83,77 ± 2,74 ^a	20,52 ± 4,47 ^a	63,25 ± 5,92 ^a	11,75 ± 2,52 ^{ab}	4,23 ± 1,22 ^{ab}	0,25 ± 0,29 ^a
GTE7	81,15 ± 4,24 ^a	22,68 ± 2,91 ^a	58,47 ± 3,06 ^{ab}	12,53 ± 3,31 ^{ab}	6,10 ± 1,33 ^a	0,22 ± 0,19 ^a
GTE30	80,35 ± 4,10 ^a	25,78 ± 3,89 ^a	54,57 ± 2,45 ^b	16,07 ± 3,22 ^b	3,37 ± 1,16 ^b	0,22 ± 0,17 ^a

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p<0,05$) pelo teste de Student Newman Keuls;

GC: animais sem aplicação de fungicidas e espalhante adesivo (controle 7 dias); **GCE:** animais com aplicação do espalhante adesivo (controle 7 dias); **GME7:** animais expostos ao Mancozeb 2g/L por 7 dias; **GTE7:** animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 7 dias; **GTE30:** animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 30 dias; **CL:** célula de Leydig; **NCL:** núcleo de célula de Leydig; **CCL:** citoplasma de célula de Leydig; **VS:** vaso sanguíneo; **EL:** espaço linfático; **TC:** tecido conjuntivo.

Na tabela 8 estão mostrados os percentuais dos elementos do intertúbulo no parênquima testicular de *Artibeus lituratus*. Os animais tratados com Tebuconazol (30 dias) apresentaram maior percentual de célula de Leydig no testículo em relação aos animais dos dois grupos controles ($p < 0,05$). Este mesmo grupo (Tebuconazol 30 dias) também apresentou maior proporção de vasos sanguíneos no testículo, quando comparados a todos os outros grupos ($p < 0,05$). Como já observado anteriormente, o intertúbulo desse grupo (Tebuconazol 30 dias) foi encontrado em maior proporção ($p < 0,05$) no testículo do que nos dois grupos controles. Não foram observadas diferenças entre os grupos para os percentuais de espaço linfático e de tecido conjuntivo ($p > 0,05$).

Considerando-se o volume médio total de cada elemento do intertúbulo no parênquima testicular, mostrados na tabela 9, não foram observadas diferenças entre as médias ($p > 0,05$).

Tabela 8: Média e desvio-padrão dos percentuais de célula de Leydig (CL), vaso sanguíneo (VS), espaço linfático (EL), tecido conjuntivo (TC) e de intertúbulo (INT) no parênquima testicular de *Artibeus lituratus* expostos aos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol.

Grupos	CL (%)	VS (%)	EL (%)	TC (%)	INT (%)
GC	8,05 ± 1,79 ^a	1,01 ± 0,31 ^a	0,47 ± 0,006 ^a	0,05 ± 0,02 ^a	9,58 ± 2,06 ^a
GCE	9,16 ± 1,92 ^a	1,37 ± 0,60 ^a	0,51 ± 0,35 ^a	0,04 ± 0,04 ^a	11,09 ± 2,58 ^a
GME7	12,44 ± 3,25 ^{ab}	1,69 ± 0,36 ^a	0,62 ± 0,25 ^a	0,04 ± 0,05 ^a	14,79 ± 3,69 ^{ab}
GTE7	11,17 ± 3,91 ^{ab}	1,61 ± 0,33 ^a	0,82 ± 0,29 ^a	0,02 ± 0,02 ^a	13,62 ± 4,35 ^{ab}
GTE30	14,74 ± 2,54 ^b	2,98 ± 0,85 ^b	0,64 ± 0,30 ^a	0,04 ± 0,03 ^a	18,41 ± 3,37 ^b

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Student Newman Keuls; **GC**: Animais sem aplicação de fungicidas e espalhante adesivo (controle 7 dias); **GCE**: Animais com aplicação do espalhante adesivo (controle 7 dias); **GME7**: animais expostos ao Mancozeb 2g/L por 7 dias; **GTE7**: animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 7 dias; **GTE30**: animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 30 dias.

Tabela 9: Média e desvio-padrão do volume total (mL) de célula de Leydig (CL), vaso sanguíneo (VS), espaço linfático (EL) e tecido conjuntivo (TC) no parênquima testicular de *Artibeus lituratus* expostos aos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol ($p>0,05$).

Grupos	CL (mL)	VS (mL)	EL (mL)	TC (mL)
GC	0,020 ± 0,007	0,0026 ± 0,0011	0,0012 ± 0,0005	0,00012 ± 0,00003
GCE	0,025 ± 0,013	0,0037 ± 0,0019	0,0016 ± 0,0016	0,00014 ± 0,00017
GME7	0,032 ± 0,015	0,0043 ± 0,0018	0,0016 ± 0,0010	0,00011 ± 0,00017
GTE7	0,030 ± 0,09	0,0045 ± 0,0015	0,0023 ± 0,0010	0,00006 ± 0,00005
GTE30	0,023 ± 0,008	0,0045 ± 0,0013	0,0010 ± 0,0005	0,00006 ± 0,00005

GC: animais sem aplicação de fungicidas e espalhante adesivo (controle 7 dias); **GCE:** animais com aplicação do espalhante adesivo (controle 7 dias); **GME7:** animais expostos ao Mancozeb 2g/L por 7 dias; **GTE7:** animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 7 dias; **GTE30:** animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 30 dias.

A análise histológica da região do intertúbulo dos testículos dos morcegos mostrou que todos os animais, independente do grupo, apresentaram essa região íntegra e organizada, podendo ser observados todos os seus componentes (Fig. 6).

4.4. Morfometria de células de Leydig

Os resultados referentes às médias dos grupos em relação ao diâmetro nuclear de célula de Leydig, volumes nuclear e citoplasmático de célula de Leydig, volume celular de Leydig e volume de célula de Leydig por grama de testículo estão descritos na tabela 10. Animais tratados com Tebuconazol por 30 dias apresentaram valores médios para diâmetro nuclear e volumes (nuclear, citoplasmático e celular) das células de Leydig menores que os encontrados para animais tratados com Mancozeb por sete dias ($p<0,05$). O volume ocupado por células de Leydig por grama de testículo foi menor nos animais tratados com Tebuconazol por 30 dias em relação aos dois grupos controle ($p<0,05$).

O valor médio referente ao número de células de Leydig por grama de testículo foi maior nos animais tratados com Tebuconazol por 30 dias (Tab. 11) quando comparado aos demais tratamentos e aos controles ($p<0,05$). Não foram observadas diferenças entre as médias dos grupos em relação ao número total de células de Leydig e índice leydigossomático ($p>0,05$; Tab. 11).

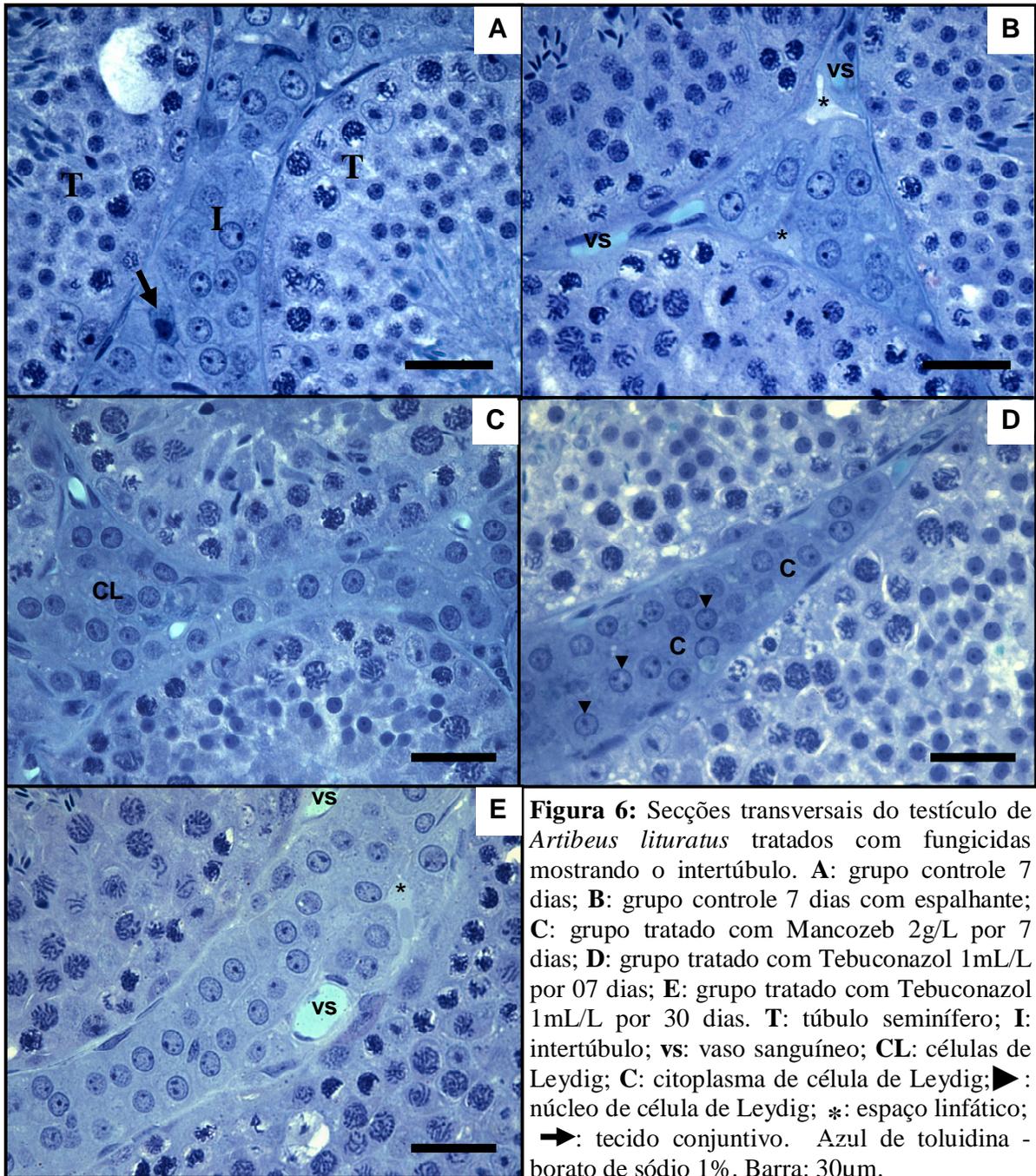


Tabela 10: Diâmetro nuclear (DN) e volumes nuclear (VN), citoplasmático (VCIT) e celular (VC) das células de Leydig, bem como volume ocupado pelas células de Leydig por grama de testículo (VCGT) de *Artibeus lituratus* expostos aos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol.

Grupos	DN (μm)	VN (μm^3)	VCIT (μm^3)	VC (μm^3)	VCGT (mL)
GC	8,23 \pm 0,64 ^{ab}	296,63 \pm 69,19 ^{ab}	839,11 \pm 330,13 ^{ab}	1135,73 \pm 396,94 ^{ab}	0,07 \pm 0,02 ^a
GCE	8,04 \pm 0,51 ^{ab}	274,96 \pm 51,82 ^{ab}	874,18 \pm 442,51 ^{ab}	1149,13 \pm 483,28 ^{ab}	0,08 \pm 0,02 ^a
GME7	8,65 \pm 0,22 ^a	339,88 \pm 26,63 ^a	1097,30 \pm 312,82 ^a	1437,18 \pm 308,08 ^a	0,11 \pm 0,03 ^{ab}
GTE7	8,02 \pm 0,54 ^{ab}	273,07 \pm 54,47 ^{ab}	708,11 \pm 144,43 ^{ab}	981,18 \pm 190,28 ^{ab}	0,10 \pm 0,04 ^{ab}
GTE30	7,79 \pm 0,37 ^b	249,05 \pm 33,56 ^b	540,21 \pm 126,29 ^b	789,25 \pm 151,36 ^b	0,13 \pm 0,02 ^b

Média e desvio-padrão; ^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Student Newman Keuls. **GC:** animais sem aplicação de fungicidas e espalhante adesivo (controle 7 dias); **GCE:** animais com aplicação do espalhante adesivo (controle 7 dias); **GME7:** animais expostos ao Mancozeb 2g/L por 7 dias; **GTE7:** animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 7 dias; **GTE30:** animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 30 dias.

Tabela 11: Média e desvio-padrão do número total de células de Leydig (NTL), do número de células de Leydig por grama de testículo (NGT) e do índice leydigossomático (ILS) em *Artibeus lituratus* expostos aos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol.

Grupos	NTL ($\times 10^6$)	NGT ($\times 10^6$)	ILS (%)
GC	18,60 \pm 4,63 ^a	74,98 \pm 37,81 ^a	0,028 \pm 0,009 ^a
GCE	21,35 \pm 2,88 ^a	75,07 \pm 26,78 ^a	0,032 \pm 0,017 ^a
GME7	21,64 \pm 8,05 ^a	79,55 \pm 18,67 ^a	0,041 \pm 0,018 ^a
GTE7	30,28 \pm 7,05 ^a	103,56 \pm 31,17 ^a	0,039 \pm 0,014 ^a
GTE30	31,33 \pm 17,04 ^a	175,79 \pm 60,55 ^b	0,029 \pm 0,008 ^a

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Student Newman Keuls. **GC:** Animais sem aplicação de fungicidas (controle 7 dias); **GCE:** Animais com aplicação do espalhante adesivo (controle 7 dias); **GME7:** animais expostos ao Mancozeb 2g/L por 7 dias; **GTE7:** animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 7 dias; **GTE30:** animais expostos ao Tebuconazol 1mL/L por 30 dias.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que, quando morcegos *Artibeus lituratus* foram tratados com Mancozeb e Tebuconazol durante sete e/ou 30 dias, somente foram encontradas alterações morfológicas testiculares nos animais tratados cronicamente com Tebuconazol.

Em relação aos túbulos seminíferos, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística para o seu comprimento total, tanto em relação ao testículo quanto por grama de testículo, bem como seu volume, observou-se que animais tratados cronicamente com Tebuconazol apresentaram menor percentual de túbulos seminíferos por parênquima testicular que animais dos dois grupos controle. Essa redução coincidiu com o aumento do percentual de intertúbulo (por parênquima testicular) e com a diminuição do diâmetro tubular. Com relação à proporção volumétrica dos componentes tubulares, epitélio seminífero, lúmen e túnica própria, somente o primeiro apresentou redução no seu percentual, o que pode estar mais relacionado à redução do diâmetro tubular do que com alterações na altura do epitélio seminífero que, no presente estudo, não apresentou diferença estatística entre os grupos. Além disso, o índice tubulossomático foi menor nos animais tratados com Tebuconazol (30 dias) que em animais do grupo controle sem fungicida e sem espalhante. Não foram encontrados na literatura trabalhos que tenham avaliado esses parâmetros em morcegos, principalmente analisando efeitos de agrotóxicos dessa classe de triazóis. Em animais de laboratório esses estudos são escassos.

O que podemos sugerir para tentar explicar os resultados encontrados, em relação a esses parâmetros em questão, seria o mecanismo de ação do Tebuconazol. Esse antifúngico atua causando perturbações na síntese do ergosterol, um componente essencial da membrana plasmática de fungos. A enzima envolvida é a esterol 14 α -desmetilase, a qual é um membro da superfamília das heme-proteínas citocromo P450 (Espinell-Ingroff, 1997; Joseph-Horne e Hollomon, 1997; Georgopapadakou, 1998). Porém, essa enzima não é expressa somente em fungos, mas também encontrada desde bactérias até mamíferos (Stromstedt et al., 1996; Nitahara et al., 1999; Debeljak et al., 2000; Kojima et al., 2000). Em animais, a reação catalisada pela esterol 14 α -desmetilase faz parte da via metabólica que leva à síntese do colesterol. O colesterol, por sua vez, é substrato para a produção de muitos outros esteróis, como por exemplo, os hormônios esteróides (Byskov et al., 1995).

Outra enzima que tem sua ação bloqueada por este agrotóxico é a aromatase (Vinggaard et al., 2000; Andersen et al., 2002), uma enzima P450 envolvida na esteroidogênese. A aromatase converte andrógenos, como androstenediona e testosterona, em estrógenos, como estrona e estradiol (Conley e Hinshelwood, 2001). Em mamíferos, ela é expressa no cérebro e nas gônadas, mas também é encontrada na placenta e nos tecidos adiposo e ósseo (Conley e Hinshelwood, 2001).

Estudos mostram que a manutenção do epitélio seminífero do compartimento tubular é altamente dependente da concentração de testosterona local (Griswold e Skinner, 2004). Esta testosterona é convertida por células germinativas, como espermatócitos, espermatídes arredondadas e alongadas, em estrógenos, que atuam de forma parácrina sobre as células de Sertoli, estimulando a liberação de fatores que regulam o desenvolvimento dessas células e, conseqüentemente, influenciam a produção espermática (Nitta et al., 1993; Levallet et al., 1998; Robertson et al., 1999).

Joshi e Gulati (2005), ao avaliar ratos submetidos ao tratamento com Tebuconazol 175mg/Kg/dia por 30 dias, observaram diminuição da densidade espermática nos testículos e na cauda do epidídimo, quando comparados ao grupo controle. Os autores citam que essa redução espermática ocorreu devido à diminuição da concentração testicular de testosterona, essencial para completar a meiose e a espermiogênese nas células germinativas (Griswold e Skinner, 2004). Ratos adultos cujas mães receberam tratamento com o fungicida triazol epoxiconazol 15mg, durante a gestação, também apresentaram reduzido número de espermatozoides no sêmen, quando comparados ao controle (Taxvig et al., 2007). Portanto, a inibição da esterol 14 α -desmetilase, juntamente com a falta de conversão da testosterona em estrógeno, pelo efeito inibitório do Tebuconazol sobre a enzima aromatase, podem ter influenciado as alterações encontradas para o compartimento tubular. Robertson e colaboradores (1999) observaram redução do volume do epitélio seminífero em ratos nocaute para aromatase com um ano de idade.

A contagem de células germinativas é um tipo de análise que poderia ajudar a explicar as alterações tubulares, pois a diminuição na porcentagem de epitélio seminífero pode ter ocorrido devido à redução do número dessas células, o que levaria, conseqüentemente, à redução do diâmetro dos túbulos seminíferos. Segundo Griswold e Skinner (2004) a manutenção das células germinativas é altamente dependente de testosterona, ocorrendo apoptose das mesmas a partir de três a quatro

dias após a ausência desse hormônio no organismo. Estudos citam que a interrupção da espermatogênese em ratos nocaute para aromatase pode ser causada pela deficiência desta enzima nas células de Leydig, do epitélio seminífero ou de ambos (Tsai-Morris et al., 1985; Janulis et al., 1996; Robertson et al., 1999).

A diminuição do percentual dos túbulos seminíferos permitiu uma expansão do percentual do intertúbulo no parênquima testicular dos animais tratados com Tebuconazol por 30 dias, em relação aos animais dos dois grupos controle. O intertúbulo é composto por células de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático e por tecido conjuntivo (Russell et al., 1990; Setchell, 1991). A expansão do intertúbulo pode ter se dado devido a alterações observadas nos parâmetros morfométricos das células de Leydig. Nestas, foi observada redução na proporção de citoplasma de célula de Leydig nos animais tratados com Tebuconazol (30 dias), quando comparados aos animais do grupo controle com espalhante e tratados com Mancozeb (sete dias). Essa redução provavelmente ocorreu devido à menor atividade sintética destas células, o que levou à redução nas quantidades de organelas presentes e consequente redução do seu volume citoplasmático. Sabe-se que a redução da síntese de testosterona pela célula de Leydig é acompanhada pela redução do seu tamanho (Stabenfeldt e Edqvist, 2006). Tal fato poderia explicar a redução que ocorreu nas células de Leydig dos animais tratados com Tebuconazol por 30 dias quanto às mensurações do diâmetro nuclear, volume nuclear, volume citoplasmático e volume celular em relação ao grupo tratado com Mancozeb (sete dias). Para compensar a redução do volume celular (Tebuconazol 30 dias), houve hiperplasia das células de Leydig, que foram mais numerosas neste grupo, o que contribuiu para que elas apresentassem maior percentual no parênquima testicular, quando comparado aos dois grupos controles.

Robertson e colaboradores (1999) observaram, após inibição da aromatase em ratos, hipertrofia e hiperplasia das células de Leydig, culminando com aumento do volume celular. Eles propuseram que esta inibição causou distúrbios nas concentrações de certos hormônios, como o LH, induzindo a proliferação das células de Leydig. No presente estudo, a hiperplasia das células de Leydig encontrada nos animais tratados com Tebuconazol por 30 dias pode ser explicada como um mecanismo compensatório do organismo na tentativa de aumentar a síntese da testosterona. O tratamento de ratos e cães com inibidores de aromatase induziu diferentes alterações testiculares nas células de Leydig. Em cães houve hipertrofia e

hiperplasia, enquanto que em ratos não foram observados efeitos nessas células. A diversidade de respostas em diferentes espécies ao tratamento com inibidores de aromatase pode ser explicada por diferentes mecanismos de regulação da secreção de gonadotrofinas pela pituitária (Walker e Nogueira, 1994).

No intertúbulo, além do aumento da proporção de células de Leydig no parênquima testicular, os animais tratados com Tebuconazol por 30 dias, quando comparados aos grupos controle, apresentaram aumento da proporção de vasos sanguíneos, o que também contribuiu para o aumento do percentual desse compartimento. Um fator que poderia causar esse aumento proporcional de vasos sanguíneos seria a ocorrência de reação inflamatória, mas não foram observados infiltrados inflamatórios nem aumento no número de mastócitos locais.

Os resultados obtidos no presente estudo não mostraram alteração em parâmetros macroscópicos, como pesos corporal, testicular, do parênquima testicular e da albugínea, além do percentual de albugínea e do índice gonadossomático dos animais tratados, independente do fungicida utilizado e do período de tratamento. Apesar disso, observou-se que animais tratados com Tebuconazol (30 dias) apresentaram valores inferiores para índice gonadossomático e pesos testicular e do parênquima testicular, quando comparados aos valores obtidos para os demais tratamentos. Isso sugere que este fungicida pode reduzir esses valores, se aplicado por mais tempo. A redução do peso testicular foi demonstrada em experimentos realizados por Robertson et al. (1999), em ratos nocaute para aromatase de um ano de idade, e por Joshi e Gulati (2005), que submeteram ratos ao tratamento com Tebuconazol (30 dias) na dosagem de 175mg/Kg/dia/gavagem. Joshi e Gulati (2005) observaram também redução de outros órgãos, como epidídimo, vesícula seminal e próstata, todos andrógeno-dependentes, além de ausência de alteração do peso corporal, como no presente estudo.

Taxvig e colaboradores (2007), realizando um estudo sobre a reprodução de ratos nascidos de fêmeas tratadas com Tebuconazol (0, 50 ou 100 mg/Kg/gavagem/dia) durante a gestação, observaram que doses mais altas causaram redução do ganho de peso corporal das fêmeas prenhes, aumento do tempo de gestação, perda de fetos e morte de filhotes recém-nascidos. Nestes foi observada feminilização dos machos e redução da concentração de testosterona. Os poucos filhotes que conseguiram chegar à maturidade sexual apresentaram redução dos testículos e alterações histológicas, como necrose e fibrose. Esses resultados mostram

que, em altas concentrações, este fungicida age como disruptor endócrino (Taxvig et al., 2007). Vale ressaltar que os efeitos sobre a fertilidade, comportamento sexual e desenvolvimento dos órgãos reprodutores são dependentes da dose e do tempo de exposição (Zarn et al., 2003).

Joshi e Gulati (2005), assim como Taxvig et al. (2007), associaram o tratamento crônico com Tebuconazol à diminuição na concentração de testosterona e aumento de colesterol e de proteínas testiculares. Tal fato pode ter ocorrido devido à inibição de enzimas da via de síntese da testosterona pelo Tebuconazol. Embora as concentrações de testosterona dos morcegos não tenham sido avaliadas no presente estudo, considerando a ação disruptora da homeostase de testosterona comprovada dos fungicidas azóis (Goetz et al., 2007), incluindo o Tebuconazol (Joshi e Gulati, 2005; Taxvig et al., 2007), somos levados a pensar que tal hormônio pode ter sofrido alterações em suas concentrações no presente estudo. Análises hormonais serão feitas para comprovar essa ideia.

Animais tratados com Tebuconazol por sete dias não apresentaram alterações morfométricas testiculares quando comparados ao grupo controle. A ausência de alterações pode ser explicada pelo fato do Tebuconazol ter baixa toxicidade aguda (WHO, 1995; Shen et al., 2012). Isto se deve a sua rápida degradação em vários tecidos, como o fígado, com exceção do coração e cérebro (Zhu et al., 2007). A degradação é bastante complexa e dependente de NADPH, sendo recentemente entendido seu processo. Estudos sobre a bioacumulação do Tebuconazol mostram que isômeros deste fungicida se acumulam e biotransformam em peixes, quando em águas contaminadas (Liping, 2002; Konwick et al., 2006; Zhu et al., 2007). A eliminação de 95% dos metabólitos desse fungicida pelos peixes demora aproximadamente 105 dias, permitindo-se, então, seu consumo (Andreu-Sánchez et al., 2010).

Em relação ao Mancozeb, todas as análises morfométricas realizadas não apresentaram alterações, quando comparadas ao grupo controle. Diversos estudos já foram realizados testando-se os efeitos do Mancozeb, bem como outras substâncias da classe dos ditiocarbamatos, sobre o aparelho reprodutor de ratos e camundongos, em diferentes concentrações e períodos de exposição. Ksheerasagar e Kaliwal (2003), estudando os efeitos do Mancozeb sobre testículos de camundongos (800mg/Kg/dia/gavagem durante 5, 10, 20 e 30 dias), observaram que alterações testiculares ocorreram somente após 20 dias, sendo os principais efeitos redução do

peso testicular, redução no número de espermatogônias e de espermátides, redução no diâmetro dos espermátocitos e das espermátides, inibição da espermatogênese e desorganização do tecido intersticial. Diversos pesquisadores, ao expor cronicamente ratos ou camundongos ao Mancozeb, identificaram efeitos negativos nos testículos, como redução do peso testicular, redução no volume das células de Leydig, número e diâmetro de células da linhagem germinativa, inibição da espermatogênese, redução do peso da próstata e epidídimo, além de degeneração nos túbulos seminíferos e diminuição no número de espermatozoides (Khan e Sinha, 1994; Kackar et al., 1997; Ksheerasagar e Kaliwal, 2010). Sakr et al. (2009) observaram, após quatro e seis semanas de exposição a esse fungicida, alterações morfométricas e histopatológicas nos testículos de ratos, como diminuição no diâmetro dos túbulos seminíferos e na altura do epitélio, redução do número de espermatozoides, degeneração das células de Leydig e dilatação dos vasos sanguíneos.

Estudos com o fungicida Mancozeb têm mostrado que seus efeitos biológicos são ocasionados por seus metabólitos, principalmente o dissulfeto de carbono e a etilenotiuréia (ETU). O dissulfeto de carbono, quando administrado cronicamente por via intra-peritoneal, causa diminuição nas concentrações de testosterona, alterações degenerativas testiculares, afetando a espermatogênese e desorganização epididimária (Kumud et al., 1999). Não foram encontrados estudos sobre o efeito diretos da ETU sobre a fisiologia da reprodução em machos. Sabe-se que a ETU, ao ser ingerida, é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal e logo aparece no sangue de ratos tratados com 100mg/kg/PC. Após 48 horas, aproximadamente 82-99% da dose oral é eliminada, via urina, e apenas 3% está presente nas fezes, via eliminação biliar (Kato et al., 1976; Rose et al., 1980). Estudos com administração de Mancozeb em animais de experimentação revelaram que a maior parte da dose ingerida é eliminada inalterada pelas fezes e 15,5% é biotransformada e eliminada na urina na forma de ETU (Kurtio et al., 1990; Canossa, 1993).

Em ratos, o metabolismo da ETU ocorre, preferencialmente, pela via da flavina monooxigenase (FMO), uma enzima microsomal que requer NADPH para oxidar a ETU. Essa metabolização pelo sistema FMO é rápida, contribuindo para a baixa toxicidade aguda e teratogenicidade exibida por ratos expostos a fungicidas EBDC (Devereaux e Fouta, 1975; Sum e Kasper, 1982; Montellano, 1988; Decker e Doerge, 1991). Embora a ETU seja metabolizada rapidamente, a ligação mediada pela FMO dos metabólitos da ETU às proteínas do fígado de ratos (citocromo P-450,

principalmente) pode levar, a longo prazo, à hepatotoxicidade crônica em ratos e a diversos efeitos em outros órgãos (Hui et al., 1988; Decker e Doerge, 1991). Tal fato explicaria o motivo pelo qual as alterações causadas pelo Mancozeb são geralmente ocasionadas por exposição crônica a esse fungicida.

Analisando qualitativamente a arquitetura tecidual dos testículos, independente dos grupos testados, não houve alteração na morfologia e nos componentes presentes em ambos os compartimentos tubulares e intertubular. Em todos os animais, a morfologia testicular seguiu o padrão descrito por Morais (2008) para morcegos insetívoros na primavera, sendo encontradas altas proporções de túbulos seminíferos, com comprimento tubular acima da média dos mamíferos já estudados, resultando em grande investimento em compartimento tubular.

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que tanto o Mancozeb quanto o Tebuconazol apresentam baixa toxicidade aguda para os testículos de morcegos *Artibeus lituratus*, quando expostos às concentrações 2g/L e 1mL/L, respectivamente, não causando danos na histomorfometria testicular desses animais. Já a exposição crônica ao Tebuconazol, na concentração determinada pelo fabricante para utilização em campos de cultura (1mL/L), causa alterações histomorfométricas testiculares tanto no compartimento tubular, quanto no intertubular, mostrando que o Tebuconazol é tóxico para o sistema reprodutor masculino de morcegos, mesmo em baixas concentrações.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Frente aos resultados obtidos nesse trabalho, somos levados a refletir sobre as concentrações de agrotóxicos permitidas para uso em lavouras. Tais concentrações devem ser repensadas, principalmente em relação ao Tebuconazol.

O presente estudo contribui com dados para a morfofisiologia comparativa, e auxilia na compreensão e avaliação da exposição ao Mancozeb e do Tebuconazol não somente na espécie analisada (*Artibeus lituratus*), mas também em outros organismos que consomem estes frutos, como aves e até mesmo o ser humano. Dados obtidos desse estudo poderão ser utilizados como ferramentas de auxílio na conservação da espécie analisada, bem como de outros animais silvestres que se alimentam dos mesmos frutos contaminados, podendo, ainda, serem aplicados diretamente na área da saúde, nutrição e fisiologia humana, pois muitas vezes seres humanos e outros animais compartilham a mesma região geográfica e possíveis vias de exposição.

As alterações encontradas nos testículos dos morcegos *Artibeus lituratus* expostos de forma crônica ao Tebuconazol na concentração 1mL/L ganham importância maior se considerarmos a alta longevidade desses animais, o que associada à exposição contínua, poderia levar a alterações testiculares ainda mais pronunciadas.

A contagem de células da linhagem espermatogênica, a mensuração das concentrações de testosterona, bem como o conhecimento dos efeitos do Mancozeb e do Tebuconazol sobre o epidídimo são análises que podem auxiliar na compreensão dos efeitos desses fungicidas sobre parâmetros reprodutivos nesta espécie.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT – **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário**. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: janeiro de 2012.

AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science Supplement**, 1983. 57(2): 380-403.

AMARAL, T.S. **Alterações metabólicas e histopatológicas induzidas pelos inseticidas fentiona e espinosina em morcegos frugívoros**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2009. 46p.

ANDERSEN, H.R.; VINGGAARD, A.M.; RASMUSSEN, E.S.; GJERMANDSEN, I.M.; BONEFELD-JORGENSEN, E.C. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2002. 179:1-12.

ANDREU-SÁNCHEZ, O.; PARAÍBA, L.C.; JONSSON, C.M.; CARRASCO, J.M. Acute toxicity and bioconcentration of fungicide tebuconazole in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology**, 2010. DOI 10.1002/tox.

ATTAL, J.; COUROT, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. **Annales Biologie Animale, Biochimie e Biophysique**, 1963. 3: 219- 241.

BARDIN, C.W. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: PAYNE, A.H.; HARDY, M.P.; RUSSELL, L.D. **The Leydig cell**. Ed. Viena: Cache River Press, 1996. Cap.2, p.31-42.

BELPOGGI, F.; SOFRITTI, M.; GUARINO, M.; LAMBERTINI, L.; CEVOLANI, D.; MALTONI, C. Results of long term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bis-dithiocarbamate (Mancozeb) in rats. **Annual New York Academy of Science**, 2002. 982: 123-136.

BERNAND, E. Morcegos vampiros: sangue, raiva e preconceito. **Ciência Hoje**, 2005. 36(214): 44-49.

BERNY, P. Pesticides and the intoxication of wild animals. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapy**, 2007. 30(2): 93-100.

BRETT, A.I.; ARAÚJO, F.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. **Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde, 1996. 117p.

BROWN, P.; CHARLTON, A.; CUTHBERT, M.; BARNETT, L.; ROSS, L.; GREEN, M.; SHAW, K.; FLETCHER, M. Identification of pesticides poisoning in wildlife. **Journal of Chromatography**, 1996. 754(1): 463-478.

- BUSTOS-OBREGON, E. On Sertoli cell number and distribution in rat testis. **Archives de Biologie**, 1970. 81: 99-108.
- BYSKOV, A.G.; ANDERSEN, C.Y.; NORDHOLM, L.; THOGERSEN, H.; XIA, G.; WASSMANN, O. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. **Nature**, 1995. 374: 559-562.
- CALDAS, E.D.; MIRANDA, M.C.C.; CONCEIÇÃO, M.H.; DE SOUZA, L.C.K.R. Dithiocarbamates residues in brazilian food and potential risk for consumers. **Food and Chemical Toxicology**, 2004. 42(11): 1877-1883.
- CANOSSA, E.; ANGIULI, G.; GARASTO, G.; BUZZONI, A.; DE ROSA, E. Indicatori di dose in agricoltori esposti a mancozeb. **Méd Lav**, 1993. 84: 42-50.
- CARVALHO, F.P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environmental Science & Policy**, 2003. 9: 685-692.
- CARVALHO, T.F. **Alterações metabólicas induzidas pela exposição a agrotóxicos em morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*)**. Monografia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2010. 27 p.
- CASIDA, J.E. Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. **Chemical Research in Toxicology**, 2009. 22(4): 609-619.
- CLARK, D.R.J. DDT and the decline of free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) at Carlsbad Cavern, New Mexico. **Archives Environmental Contaminants Toxicology**, 2001. 40(4): 537-543.
- CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological Reviews**, 1972. 52(1): 198-236.
- CLERMONT, Y.; MORGENTALER, H. Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. **Endocrinology**, 1955. 57: 369-382.
- CONLEY, A.; HINSHELWOOD, M. Mammalian aromatases. **Reproduction**, 2001. 121: 685-695.
- DEBELJAK, N.; HORVAT, S.; VOUK, K.; LEE, M.; ROZMAN, D. Characterization of the mouse lanosterol 14 α -demethylase (CYP51), a new member of the evolutionarily most conserved cytochrome P450 family. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2000. 379: 37-45.
- DECKER, C.J.; DOERGE, D.R. Rat hepatic microsomal metabolism of ethylenethiourea. Contributions of the flavin-containing monooxygenase and cytochrome P-450 Isozymes. **Chemical Research in Toxicology**, 1991. 4(4): 482-489.
- DEVEREAUX, T.R.; FOUTA, J.R. Effect of pregnancy or treatment with certain steroids on N,N-dimethylaniline demethylation and N-oxidation by rabbit liver or lung microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, 1975. 3: 254-258.

DOMICO, L.M.; ZEEVALK, G.D.; BERNARD, L.P.; COOPER, K.R. Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. **Neurotoxicology**, 2006. 27(5): 816-825.

DORST, V.J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchungen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. **Monotsh Veterinarmed**, 1974. 29: 650-652.

ELIA M.C.; ARCE G.; HURT S.S.; NEILL, P.J.; SCRIBNER, H.E. The genetic toxicology of ethylenethiourea: a case study concerning the evaluation of a chemical's genotoxic potencial. **Mutation Research**, 1995. 341(3): 341-9.

EPA (Environmental Protection Agency). Determination of wheter dithiocarbamate pesticides share a commom mechanism of toxicit. **Office of Pesticides Programs**, 2001. Washington.

ESPINEL-INGROFF, A. Clinical relevance of antifungal resistance. **Infectious Diseases Clinics of North America**, 1997. 11: 929-944 .

FENTON, M.B. **Bats. Facts on File**, New York, 1992. 207p.

FLEMING, T.H.; SOSA, V.J. Effects of nectarivorous and frugivorous mammals on reproductive success of plants. **Journal of Mammalogy**, 1994. 75(4): 845-851.

FRANÇA, L.R. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau**. Belo Horizonte: Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 1991. 180p.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. **The testis of domestic mammals**. In: Regadera, J., Martinez-Garcia (Eds.). Male reproduction. A multidisciplinary overview. Churchill, Livingstone, Madrid, 1998. 197-219.

FRANÇA, L.R.; YE, S.J.; YING, L.; SANDBERG, M.; RUSSELL, L.D. Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. **Anatomical Record**, 1995. 241: 181-204.

GALETTI, M.; MORELLATO, L.P.C. Diet of the large fruit eating bat *Artibeus lituratus* in a forest fragment in Brazil. **Mammalia**, 1994. 58(4): 661-665.

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. **Manual de Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GALT, R.E. Pesticides in export and domestic agriculture: Reconsidering market orientation and pesticide use in Costa Rica. **Geoforum**, 2008. 39: 1378-1392.

GARDNER, A.L. FEEDING HABITS IN: BAKER, R.J., JONES, J.K., CARTER, D.C., (Eds). Biology of bats of the New World Family Phyllostomatidae. Part II. **Special Publications Museum Texas Tech University, Lubbock**, 1977. 13: 1-364.

GEORGOPAPADAKOU, N.H. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. **Current Opinion in Microbiology**, 1998. 1: 547-557.

GISI, U.; SIEROTZKI, H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. **European Journal of Plant Pathology**, 2008. 122: 157-167.

GODINHO, C.L. **Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros**. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 1999. 74 p.

GOETZ, A.K.; REN, H.; SCHMID, J.E.; BLYSTONE, C.R.; THILLAINADARAJAH, I.; BEST, D.S.; NICHOLS, H.P.; STRADER, L.F.; WOLF, D.C.; NAROTSKY, M.G.; ROCKETT, J.C.; DIX, D.J. Disruption of testosterone homeostasis as a mode of action for the reproductive toxicity of triazole fungicides in the male rat. **Toxicological Sciences**, 2007. 95(1): 227-239.

GOETZ A.K.; ROCKETT J.C.; REN, H.; THILLAINADARAJAH, I.; DIX, D.J. Inhibition of rat and human steroidogenesis by triazole antifungals. **Systems Biology in Reproduct Medicine**, 2009. 55(5-6): 214-26.

GOODMAN, H.M. **Controle hormonal da reprodução masculina**. In: Johnson, L.R., Fundamentos de Fisiologia Médica, 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 45.

GRISWOLD, M. D.; SKINNER, M.K. **Sertoli cell biology**, editora Academic Press (st), 2004. 1:512p.

HASS, U.; TAXVIG, C.; AXELSTAD, M.; DALGAARD, M.; BOBERG, J.; ANDEASEN, H.R.; VINGGAARD, A.M. Endocrine disruption activities in vivo of fungicides Tebuconazole and Epoxiconazole. **Toxicological Sciences**, 2007. 100(1): 464-473.

HESS, R.A.; COOKE, P.S.; BUNICK, D.; KIRBY, J.D. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli cell and germ cell numbers. **Endocrinology**, 1993. 132: 2607-2613.

HUI, Q.Y.; ARMSTRONG, C.; LAVER, G. Mono oxygenase mediated etabolism and binding of ethylene thiourea to mouse liver microsomal protein. **Toxicology Letters**, 1988. 41: 231-237.

IUCN (World Conservation Union). **World list of Microchiroptera with IUCN red list: categories of threat and distribution**. Suíça, 2008. Disponível em <<http://www.redlist.org>>. Acesso em janeiro de 2012.

JANULIS, L.; BAHR, J.M.; HESS, R.A.; BUNICK, D. P450 aromatase messenger ribonucleic acid expression in male rat germ cells: detection by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. **Journal of Andrology**, 1996. 17: 651-658.

JOSEPH-HORNE, T.; HOLLOMON, D.W. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. **Microbiology Letters**, 1997. 149: 141-149.

- JOSHI, S.C.; GULATI, N. Effects of tebuconazole on reproductive function of male rat. **Journal of Cell and Tissue Research**, 2005. 5(2): 457-460.
- KACKAR, R.; SRIVASTAVA, M.K.; RAIZADA, R.B. Induction of gonadal toxicity to male rats after chronic exposure to mancozeb. **Industrial Health**, 1997. 35(1): 104-411.
- KARL, J.; CAPEL, B. 1998. Sertoli cells of mouse testis originate from the celomic epithelium. **Developmental Biology**, 1998. 203: 323-333.
- KATO, Y.; ODANAKA, Y.; TERAMOTO, S.; MATANO, O. Metabolic fate of ethylenethiourea in pregnant rats. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 1976. 16: 546-555.
- KHAN, P.K.; SINHA, S.P. Impact of higher doses of vitamin C in modulating pesticide genotoxicity. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, 1994. 14: 175-181.
- KOJIMA, M.; MOROZUMI, T.; ONISHI, A.; MITSUHASHI, T. 2000. Structure of the pig sterol 14 α -demethylase (CYP51) gene and its expression in the testis and other tissues. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 2000. 127: 805-811.
- KONWICK, B.J.; GARRISON, A.W.; AVANTS, J.K.; FISK, A.T. 2006. Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, 2006. 80: 372-381.
- KSHEERASAGAR, R.L.; KALI WAL, B.B. Temporal effects of mancozeb on testes, accessory reproductive organs and biochemical constituents in albino mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2003. 15: 9 -17.
- KSHEERASAGAR, R.L.; KALI WAL, B.B. 2010. Effect of mancozeb on thyroid, testis, accessory reproductive organs and biochemical constituents in albino mice. **Recent Research in Science and Technology**, 2010. 2(8): 07-17.
- KUMUD, P.G.A.; GAUTAM, K.; VAGHASIA, Y.V. 1999. Carbon disulphide induced impairments in male reproductive system in rats. **Indian Journal of Physiology and Allied Science**, 1999. 53(1): 22-28.
- KURTTIO, P.; VARTIANEN, T.; SAVOLAIMEN, K. 1990. Environmental and biological monitoring of exposure to ethylenebisdithiocarbamate fungicides and ethylenethiourea. **British Journal of Industrial Medicine**, 1990. 47(3): 203-6.
- LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. Editora Manole: São Paulo, 1999. 230 p.
- LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Annals of the New York Academy Sciences**, 1952. 55: 548-584.

LENTZA, R.C. Ethylenethiourea (ETU) in relation to use of ethylenebisdithiocarbamate (EBDC) fungicides. **Reviews of Environmental Contamination & Toxicology**, 1990. (115): 1-37.

LEVALLET, J.; BILINSKA, B.; MITTRE, H.; GENISSEL, C.; FRESNEL, J.; CARREAU, S. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. **Biology of Reproduction**, 1998. 58: 919–926.

LIPING, Y.; SHUZHENG, L.; YUCHANG, L.; RUYU, G. Bioactivity investigation of triazole fungicide enantiomers. **Chinese Journal of Pesticide Science**, 2002. 4: 67-70.

LYU, P.Y., HANDELSMAN, D.J. The present and future state of hormonal treatment for male infertility. **Human Reproduction Update**, 2003. 9: 9-23.

MACHADO, R.A.C. **Alterações morfológicas, hepáticas e renais induzidas pela exposição aos fungicidas tebuconazol e mancozeb em *Artibeus lituratus***. Monografia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2010. 31 p.

MATUO, T. **Fundamentos da tecnologia de aplicações de agrotóxicos**. In: Guedes, J.V.C., Dornelles, S.H.B. Tecnologia e segurança na aplicação de agrotóxicos: novas tecnologias. Campinas: Livraria Rural, 1998. 95-103.

MCKLINLAY, R.; PLANT, J.A.; BELL, J.N.B.; VOULVOULIS, N. Endocrine disrupting pesticides: Implication for risk assesment. **Environ International**, 2007 40:168-183.

MENEGOLA, E. ; BROCCIA, M.L. ; DI RENZO, F. ; GIANINI, E. Postulated pathogenic pathway in triazole fungicides induced morphogenic effects. **Reproductive Toxicology**, 2008. 22(2): 186-195.

MONTELLANO, O.P.R., 1988. Suicide substrates for drug metabolizing enzymes: Mechanisms and biological consequences. **Drug Metabolism**, 1988. 2: 99-148.

MORAIS, D.B. **Morfologia e morfometria testicular em morcego insetívoro (*Molossus molossus*, Pallas, 1776, Chiroptera, Molossidae)**. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2008. 74 p.

NITAHARA Y.; AOYAMA, Y.; HORIUCHI, T.; NOSHIRO, M.; YOSHIDA, Y. Purification and characterization of rat sterol 14-demethylase P450 (CYP51) expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 1999. 126: 927-933.

NITTA, H.; BUNICK, D.; HESS, R.A.; JANULIS, L.; NEWTON, S.C.; MILLETTE, C.F.; OSAWA, Y.; SHIZUTA, Y.; TODA, K.; BAHR, J.M. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. **Endocrinology**, 1993. 132: 1396-1401.

O'NEIL.; W.M.; MARSHAL, W.D. Goitrogenic effect of the etuylene thiourea on rat thyroid. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 1984. 21: 92-101.

ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T. **Spermatogenesis in domestic mammals**. In: Cole, H.H.; Cupps, P.T. (Eds). *Reproduction in domestic animals*. 3rd Ed. New York: Academic Press, 1977. 203-227.

ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **Anatomical Record**, 1982. 203: 485-492.

ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, 1988. 122: 787-794.

PASSOS, F.C.; SILVA, W.R.; PEDRO, W.A.; BONIN, M.R. Frugivoria em morcegos (Chiroptera, Phyllostomidae) no Parque Estadual Intervales, sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 2003. 20(3): 511-517.

PELLINIEMI, L.J.; KUOPIO, T.; FRÖJDMAN, K. **The cell biology and function of the fetal Leydig cell**. In: Payne, A.H.; Hardy, M.P.; Russell, L.D. *The Leydig cell*. Vienna: Ed. Cache River Press, 1996. p.143-157.

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

PICANÇO, M.C.; MORAIS, E.G.F.; SILVA, G.A.; XAVIER, V.M.; QUEIRO, R.B.; SILVA, N.R. **Inseticidas, acaricidas e moluscidas no manejo integrado de pragas**. 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, 2008. p.541-576.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Morcegos do Brasil**. Londrina, 2007. 253p.

ROBERTS, T.; HUTSON, D. **Metabolic Pathways of Agrochemicals**. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 1999.

ROBERTSON, K.M.; O'DONNELL, L.; JONES, M.E.E.; MEACHEM, S.J.; BOON, W.C.; FISHER, C.R.; GRAVES, K.H.; MCLACHLAN, R.I.; SIMPSON, R.E. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (*cyp 19*) gene. **Proceedings of the National Academy Science**. USA, 1999. 96p.

ROSE, D.; PEARSON, C.M.; ZUKER, M.; ROBERTS, J.R. Ethylenethiourea: criteria for the assessment of its effects on man. **Ottawa: National Research Council Canada**, 1980. NRCC publication n 18469.

ROWLEY, M.J.; HELLER, C.G. Quantitation of the cells of the human testis employing the Sertoli cells as a constant. **Zeitschrift Fuer Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie Cell and Tissue Research**, 1971. 115: 461-472.

- RUSSELL, L.D. **Mammalian Leydig cell structure**. In: PAYNE, A. H.; HARDY, M. P. & RUSSELL, L.D., The Leydig cell. Vienna: Cache River Press, Cap. 10, 1996. p.218-222.
- RUSSELL, L.D.; CLERMONT, Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. **Anatomical Record**, 1977. 187: 347-366.
- RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA-HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater: Cache River Press, 1990. 286p.
- RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. **The Sertoli Cell**. Clearwater: Cache River Press, 1993. 801p.
- SAKR, S.A.; OKDAH, Y.A.; EL-ADLY, E.K. Effect of ginger (*Zingiber officinale*) on Mancozeb fungicide induced testicular damage in albino rats. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, 2009. 3(2): 1328-1333.
- SETCHELL, B.P. **Male reproductive organs and semen**. In: Cupps, P.T. Reproduction in Domestic Animals. 4th Ed. San Diego: Academic Press, 1991. 670p.
- SHAKKEBAK, N.E.; HELLER, C.G. Quantification of human seminiferous epithelium. **Journal of Reproduction and Fertility**, 1973. 32: 379-389.
- SHARPE, R.M. **Regulation of spermatogenesis**. In: Knobil, E, Neill, J.D. (Eds.). The physiology of reproduction, 2 Ed., New York: Raven Press, 1994. 1: 1363-1434.
- SHEN, Z.; ZHU, W.; LIU, D.; XU, X.; ZHANG, P.; ZHOU, Z. 2012. Stereoselective Degradation of Tebuconazole in Rat Liver Microsomes. **Chirality**, 2012. 24: 67-71.
- SIMMONS, N.B. **Order Chiroptera in: Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference**, Third Edition, (D.E. Wilson and D.M Reeder, eds.). Johns Hopkins University Press, 2005. 1: 312-529.
- SINHA-HIKIM, A.P.; CHAKRABORTY, J.; JHUNJHUNWALA, J.S. 1985. Germ cell quantitation in human testicular biopsy. **Urological Research**, 1985. 13: 111-115.
- STABENFELDT, GH.; EDQVIST, L. **Processos reprodutivos do macho**. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. DUKES Fisiologia dos animais domésticos. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan S.A., 2006. Cap 35, p. 603-614.
- STEINBERGER, A.; STEINBERGER, E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. **Biology of Reproduction**, 1971. 4: 84-87.
- STROMSTEDT, M.; ROZMAN, D.; WATERMAN, M.R. The ubiquitously expressed human CYP51 encodes lanosterol 14 alphasdemethylase, a cytochrome P450 whose expression is regulated by oxysterols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1996. 329: 73-81.

SUM, C.Y.; KASPER, C.B. Mixed-function amine oxidase of the rat hepatocyte nuclear envelope. Demonstration and effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene. **Biochemical Pharmacology**, 1982. 31: 69-73.

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

TAXVIG, C.; HASS, U.; AXELSTAD, M.; DALGAARD, M.; BOBERG, J.; ANDEASEN, H.R.; VINGGAARD, A.M. Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides Tebuconazole and Epoxiconazole. **Toxicological Sciences**, 2007. 100(2): 464–473.

TAYLOR, M.; KLAINE, S.; CARVALHO, F.P.; BARCELO, D.; EVERAARTS, J. **Pesticide residues in coastal tropical ecosystems. Distribution, fate and effects.** Taylor and Francis, London, 2003. 576p.

TRIVERDI, N.; KAKKAR, R.; SRIVASTAVA, M.K.; MITHAL, A.; RAUZADAM, R.B. Effect of oral administration of fungicide mancozeb on thyroid gland of rat. **Indian Journal of Experimental Biology**, 1993. 31: 564-566.

TSAI-MORRIS, C.H.; AQUILANO, D.R.; DAFAU, M.L. Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. **Endocrinology**, 1985. 116: 38-46.

VINGGAARD, A.M.; HNIDA, C.; BREINHOLT, V.; LARSEN, J.C. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. **Toxicology in Vitro**, 2000. 14: 227-234.

VIZOTTO, L.D.; TADDEI, V.A. Chave para determinação de quirópteros brasileiros. **Revista da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras São José do Rio Preto.** Boletim de Ciências, São José do Rio Preto, SP, 1973. (1): 1-72.

VOGEL, S. Chiropterophilie in der neotropischen Flora. Neue Mitteilungen III, II. Spezieller Teil (Fortsetzung). **Flora, Abstract (Jena)**, 1969. 158: 289-323.

WARD, O.; DELKER, D.A.; HESTER, S.D.; N THAI, S.F.; WOLD, D.C.; ALLEN, J.W.; NESNOW, S. Transcriptional profiles in liver from mice treated with hepatotumorigenic triazole conazole fungicides: Propiconazole, triadimefon and myclobutanil. **Toxicologic Pathology**, 2006. 34(1):863.

WALKER, U.J.; NOGUES V. Changes induced by treatment with aromatase inhibitors in testicular Leydig cells of rats and dogs. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 1994. 46: 211-213.

WHO (World Health Organization). **Dithiocarbamates pesticides ethylenethiourea, and propylenethiourea: a general introduction. Environmental health criteria 78.** Geneva:World Health Organization, 1998.. p.17-102.

WHO (World Health Organization), **Pesticide residues in food–evaluations 1994: Part II–Toxicology.** Geneva, Switzerlan, 1995.

WILSON, D.E.; REEDER, D.M. **Mammal species of the world: taxonomic and geographic reference**. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2005. 2181 p.

YOSHIDA, A.; HARADA, T.; MAITA, K. Tumor induction by concurrent oral administration of ethylenethiourea and sodium nitrite in mice. **Toxicologic Pathology**, 1993.21:303-311.

ZARN, J.A.; RÜSCHWEILER, B.J.; SCHLATTER, J.R. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 α -demethylase and aromatase. **Environmental Health Perspectives**, 2003. 111(3): 255-261.

ZHU, W.; QIU, J.; DANG, Z.; LV, C.; JIA, G.; LI, L.; ZHOU, Z. Stereoselective degradation kinetics of tebuconazole in rabbits. **Chirality**, 2007. 19: 141–147.

ZIRKIN, B.R.; AWONIYI, C.; GRISWOLD, M.D.; RUSSELL, L.D.; SHARPE, R. Is FSH required for adult spermatogenesis? **Journal of Andrology**, 1994. 5: 273-276.