

ESTEBAN GIRALDO OSPINA

**TOXICIDADE REPRODUTIVA INDUZIDA PELO HERBICIDA ROUNDUP EM
MORCEGOS MACHOS (*Artibeus lituratus*)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

G516t
2017

Giraldo Ospina, Esteban, 1987-
Toxicidade reprodutiva induzida pelo herbicida Roundup
em morcegos machos (*Artibeus lituratus*) / Esteban Giraldo
Ospina. – VIÇOSA, MG, 2017.
ix, 31f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Mariella Bontempo Duca de Freitas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Morcegos. 2. *Artibeus lituratus*. 3. Herbicidas -
Toxicologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Biologia Animal. Programa de Pós-graduação em Biologia
Animal. II. Título.

CDD 22 ed. 599.4

ESTEBAN GIRALDO OSPINA

**TOXICIDADE REPRODUTIVA INDUZIDA PELO HERBICIDA ROUNDUP EM
MORCEGOS MACHOS (*Artibeus lituratus*)**

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

APROVADA: 28 de agosto de 2017.



Mariaurea Matias Sarandy Souza



Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo



Mariella Bontempo Duca de Freitas
(Orientadora)

“Intelligence is the ability to adapt to change”

-Stephen Hawking-

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, devo expressar minha profunda gratidão aos meus pais, irmão e minha namorada por me fornecerem apoio incessante e constante encorajamento durante meus anos de estudo e através do processo de pesquisa e redação desta dissertação. Esta realização não teria sido possível sem eles. Obrigado, eu amo vocês infinitamente. Aos demais parentes, obrigada pelo apoio, incentivo, conselhos, carinho e por acreditarem em mim.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Mariella Bontempo Duca de Freitas, pela oportunidade e orientação, por ter acreditado no meu trabalho e por ter contribuído na minha formação profissional e pessoal.

À Prof. Dr. Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo, agradeço as dicas e sugestões no meu trabalho. Ao Prof. Dr Sérgio Luis Pinto da Matta pela ajuda incondicional e sugestões ao meu trabalho.

Gostaria de agradecer à Prof. Gisele Lessa e ao programa em Biologia Animal por me permitir, estudante estrangeiro, desenvolver meus estudos de Pós-graduação. Gostaria também de agradecer a meus amigos e diretores Brian Lange, sua esposa Brenda Lange, a sua empresa Lange Research. Eduardo Cartin por sua energia e apoio sempre, a meus amigos e companheiros de International Agricultural Research, Inc. (IAR). Gostaria de agradecer à Profa. Luz Elena Muñoz, na Colômbia, por facilitar o contato inicial com a Universidade Federal de Viçosa. Também agradeço ao Brasil e à CAPES por financiar meus estudos.

Também agradeço à doutoranda Fernanda Dias, agradecimento por todo ensinamento e apoio ao meu trabalho e pela dedicação e empenho dispensados. Agradeço à Mariáurea Matias Sarandy, Pós-doc do laboratório, pela contínua ajuda, ensinamento e apoio. À Dra Jerusa Maria de Oliveira, meu agradecimento pelo apoio, pela ajuda e sugestões no meu trabalho. Agradeço à Isabella pela ajuda na captura das fotos. Agradeço também à toda a equipe do Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros.

Agradeço também ao Prof. Jorge Dergam (Laboratório de Filogenia Molecular) e Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta (Laboratório de Biologia Estrutural) por me instruir nos procedimentos histológicos e por fornecer-me os materiais necessários.

Finalmente, e não porque sejam menos importantes, gostaria de agradecer aos meus amigos Diego Alejandro, Thalia Loyo, Itzel Morales, Estefany Ruiz, David Justinico e Evaristo Villalba pelas longas horas de companhia e momentos bons, as cervejas, a amizade e as noites de capturas de morcegos, muito obrigado!

RESUMO

GIRALDO, Esteban Ospina, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2017. **Toxicidade reprodutiva induzida pelo herbicida roundup em morcegos machos (*Artibeus lituratus*)**. Orientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas.

O presente estudo avaliou o efeito potencial do herbicida Roundup® na reprodução de morcegos frugívoros machos (*Artibeus lituratus*); esses animais atuam na manutenção do ecossistema e na regeneração de ambientes degradados, o efeito dos agrotóxicos sobre eles pode colocar em perigo não somente sua sobrevivência e adaptação, mas também a manutenção de ambientes florestais. O glifosato é um dos compostos ativos do Roundup®, o qual é considerado um dos mais usados em todo o mundo como herbicida. Esta formulação comercial tem sido descrita como um desregulador endócrino, causando efeitos adversos na reprodução de ratos. Neste estudo, foram testadas baixas concentrações do herbicida, níveis considerados ambientais ou agrícolas, de uso recomendado pelos fabricantes. Morcegos (N= 13) foram capturados em fragmentos florestais próximos a Viçosa- MG, Brasil. Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais: controle (n=7) receberam frutas sem adição do agrotóxico por 3 dias, e tratado (n=6) receberam frutas aspergidas com Roundup® na concentração de 4 mL/100 mL por 3 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 (3µm) foram corados e avaliados, em microscópio óptico e no software Image Pro Plus e ImageJ 1.48 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, leydigossomático, estimativa da população celular do epitélio seminífero. Contagem de células do epitélio seminífero no estágio 1, rendimento intrínseco da espermatogênese, reserva espermática testicular. Além disso foram avaliadas as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) e os produtos, malondialdeído (MDA), proteína carbonilada (PC) e quantidade de proteína total. Após submeter os resultados à análise estatística (Shapiro-Wilk), comparando-se as médias pelo teste de Student Newman-Keuls (p=0,05), observou-se que a exposição por 3 dias ao Roundup®, induziu diminuição do peso corporal de morcegos, apesar de ter aumentado de

consumo de alimento fornecido. A exposição também causou aumento do lúmen, aumento do número de células de Leydig e diminuição do número de espermatogônias e espermatíde na fase de preleptóteno/leptóteno e número de célula de Sertoli. Morcegos expostos ao pesticida também apresentaram aumento nos níveis de catalase, superóxido dismutase, proteínas carboniladas e diminuição dos níveis de proteína total. Os resultados demonstram que a formulação comercial do herbicida Roundup® apresentou toxicidade testicular em morcegos frugívoros expostos a baixas concentrações e por um curto período de exposição.

ABSTRACT

GIRALDO, Esteban Ospina, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2017. **Reproductive toxicity induced by herbicide roundup in male bat (*Artibeus lituratus*)**. Adviser: Mariella Bontempo Duca de Freitas.

The present study evaluated the potential effect of the herbicide glyphosate Roundup® on the reproduction of male fruit bats (*Artibeus lituratus*); 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. The Glyphosate is one active compounds of Roundup®, which is considered one of the most widely used herbicides in the world. This commercial formulation has been describe as an endocrine disrupter, causing adverse effects on rat reproduction. In this study, low concentrations of the herbicide, levels considered environmental or agricultural, of use recommended by the manufacturers were tested. Bats (N = 13) were captured in forest fragments near Viçosa- MG, Brazil. The animals were divide in two experimental groups: control (n = 7) received fruit without addition of the pesticide for 3 days, and treated (n = 6) received fruits sprayed with Roundup® in the concentration of 4 mL/100 mL for 3 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 and ImageJ 1.48 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, and cell populations of the seminiferous epithelium. Count of seminiferous epithelial cells at stage I, intrinsic spermatogenesis yield, testicular sperm reserve. In addition, the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and the products malondialdehyde (MDA), carbonylated protein (PC) and total protein were evaluated. After submitting the results to the statistical analysis (Shapiro-Wilk), comparing the means by Newman-Keuls test (p = 0.05), we observed that exposure for 3 day to Roundup®, induced weight decrease body weight of bats, despite having increased food consumption provided. The exposure also caused lumen enlargement, increased number of Leydig cells, and decreased numbers of spermatogonia and spermatocyte in the preleptotene/leptotene phase and Sertoli cell number. Bats

exposed to the pesticide also showed increased levels of catalase, superoxide dismutase, carbonylated proteins and decreased total protein levels. The results demonstrate that the commercial formulation of the Roundup® herbicide showed testicular toxicity in frugivorous bats exposed to low concentrations and for a short period of exposure.

CONTEÚDO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 METODOLOGIA.....	4
2.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO GLIFOSATO.....	4
2.2 CAPTURA E TRATAMENTO DOS ANIMAIS.....	4
2.3 ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS TESTICULARES.....	5
2.3.1 Índice gonadossomático.....	5
2.3.2 Proporção volumétrica (%) e volume (mL) dos componentes do parênquima testicular.....	6
2.3.3 Índice Tubulossomático.....	6
2.3.4 Diâmetro tubular, altura do epitélio e comprimento dos túbulos seminíferos.....	6
2.3.5 Morfometria da Células de Leydig.....	7
2.3.6 Índice Leydigossomático.....	8
2.3.7 Estimativa da população celular do epitélio seminífero. Contagem de células do epitélio seminífero no estágio 1.....	8
2.3.8 Rendimento intrínseco da espermatogênese.....	9
2.3.9 Reserva espermática testicular.....	9
2.4 ANÁLISES DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	9
2.4.1 Enzimas antioxidantes dos tecidos.....	9
2.4.2 Atividade de Superóxido Dismutase (SOD).....	10
2.4.3 Atividade de Catalase (CAT).....	10
2.4.4 Atividade de Glutathione S-transferase (GST).....	10
2.4.5 Determinação do Malondialdeído.....	10
2.4.6 Análise da concentração de proteína Carbonilada (PC).....	11
2.4.7 Proteína total.....	11
3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	12
4 RESULTADOS.....	12
4.1 PESO CORPORAL E PESO DO ALIMENTO.....	12
4.2 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRIAS TESTICULARES.....	12
4.2.1 Parâmetros testiculares e índice gonadossomático.....	12
4.2.2 Morfometria do túbulo seminífero.....	13
4.2.3 Avaliação morfométrica dos elementos do intertúbulo.....	16
4.2.4 Morfometria de células de Leydig.....	17

4.2.5 Número corrigido de células do epitélio seminífero no estágio 1.	18
4.2.6 Rendimento intrínseco da espermatogênese.	19
4.2.7 Reserva espermática testicular.....	19
4.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	20
4.3.1 Enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).....	20
4.3.2 Atividade da enzima Glutathione-S-Transferase (GST).....	20
4.3.3 Atividade do produto Malondialdeído (MDA).....	21
4.3.4 Concentração de proteínas carboniladas (PC).....	22
4.3.5 Proteína total.....	22
5 DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS.....	27

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento atual da agricultura é acompanhado pelo uso de inseticidas, herbicidas, fungicidas, que possuem uma eficácia garantida no seu objetivo, mas que por sua vez tem um amplo espectro de ação, o qual pode afetar outros organismos. O aumento da população humana tem sido utilizado como principal argumento para dar suporte à necessidade de uma maior e mais eficiente produção de alimentos pelos sistemas agrícolas (Driesch et al. 1996). Os agrotóxicos tiveram seu uso intensificado no Brasil nas décadas de 1960-1970, como a solução científica para o controle das pragas que atingiam lavouras e rebanhos (Peres 2003). Dentre os vários grupos de herbicidas, o glifosato apresenta elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas. Desde 1971, quando foi relatado primeiramente como herbicida, três tipos de glifosato vêm sendo comercializados: glifosato-isopropilamônio, glifosato-sesquisódio (ambos patenteados por Monsanto e vendido como Roundup®, e glifosato-trimesium (patenteado por ICI, atual Syngenta). Seja como sal de amônio ou sódio, o glifosato é um organofosforado que não afeta o sistema nervoso da mesma maneira que outros compostos desta mesma família (em geral inseticidas, que atuam como inibidores da enzima colinesterase). Além disso o mesmo trabalho, o glifosato é citado como pouco tóxico, mas há evidências de efeitos deletérios no ambiente, principalmente devido à resistência adquirida por algumas espécies de ervas após o uso prolongado do herbicida (De Amarante e Santos 2002).

Apesar da toxicidade relativamente baixa do glifosato reportada em estudos de letalidade em ratos, alguns dos componentes inertes de seus produtos formulados apresentam-se mais elevados que o ingrediente ativo (De Amarante e Santos 2002). O glifosato é um dos compostos ativos do Roundup® o qual é considerado um dos herbicidas mais usados no mundo. A formulação comercial Roundup® é considerada um desregulador endócrino em células humanas e causa efeitos adversos na reprodução de ratos (Benachour e Seralini 2009; Sanin et al. 2009). Em animais silvestres, existem poucos estudos reportando os efeitos relacionados à contaminação de agroquímicos, especialmente em morcegos, o que torna a necessidade de investigar os riscos da exposição direta e indireta de agrotóxicos às suas populações; evidente, bem como o conhecimento dos potenciais danos causados aos indivíduos.

Os morcegos (Mammalia, Chiroptera) apresentam grande relevância na regulação dos ecossistemas (Timm 1994), dentro do Chiroptera destaque-se a família Phyllostomidae, endêmica

do continente americano, indivíduos desta família podem explorar néctar, pólen, folhas, insetos, frutos, sangue entre outros (Passos e Gracioli 2004). A subfamília Stenodermatinae é composta por espécies frugívoras (Eisenberg e Redford 1999) nesta subfamília encontramos a espécie *Artibeus lituratus*, este morcego é bastante abundante, e se distribui desde o México até o norte da Argentina, ocorrendo praticamente em todo o Brasil (Eisenberg e Redford 1999). Os morcegos *Artibeus lituratus* são considerados de grande porte, com antebraço podendo ultrapassar 75 mm e peso corporal acima de 75 g. Formam grupos poligâmicos e abrigam-se nas copas de árvores, sob folhas de palmeiras e outras plantas (Vizotto e Taddei 1973). Diversos estudos demonstram a importância de morcegos frugívoros na regeneração de ecossistemas florestais (Charles-Dominique 1986; Whittaker e Jones 1994; Medellín e Gaona 1999), por incluírem em sua dieta, frutos de espécies de plantas pioneiras. Galindo-González (1998) O período reprodutivo da espécie pode variar de acordo com a distribuição geográfica, sendo que no Brasil podem apresentar um padrão de poliestría bimodal, o qual se caracteriza pela ocorrência de dois picos reprodutivos durante o ano: um pico ocorre de fevereiro a março e o outro de outubro a novembro (Bredt et al. 1996).

O testículo é um órgão com funções exócrina e endócrina (produção de espermatozoide e andrógenos, respectivamente), geralmente localizado no escroto, e envolvido por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea. Funcionalmente o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos, um compartimento intertubular e o compartimento tubular, ou de túbulos seminíferos (Russell et al. 1990; Ross et al. 2003). Os componentes do compartimento intertubular são as células de Leydig, os vasos sanguíneos e espaços linfáticos, além de nervos e uma população celular variável constituída principalmente por fibroblastos e macrófagos, os quais estão diretamente associados às células de Leydig (Russell e Griswold 1993; Setchell 1991; Hales 2002).

O compartimento dos túbulos seminíferos constitui a maior parte do testículo, ocupando, na grande maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (França e Russel 1998; França e Garcia 2005). Eles são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular. A túnica própria reveste o túbulo externamente, sendo composta de células mioídes ou peritubulares e matriz extracelular. Juntamente com as células mioídes, as células de Sertoli formam a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas (Junqueira e Carneiro 2004). As células de Sertoli, através de junções de

oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois ambientes: o ambiente basal, onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (preleptóteno e leptótenos), e o ambiente adluminal, onde se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides. No lúmen tubular se encontram o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozoides recém espermiados (França e Russel, 1998).

O estresse oxidativo ocorre pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como íon superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^-) e oxigênio singlete (O_2) (Avilez et al. 2008; Singh et al. 2008), que podem causar sérios danos celulares, de forma estrutural e funcional. Entretanto, a intensidade desses efeitos pode ser minimizada por meio da atuação de mecanismos antioxidantes ou biomarcadores de estresse oxidativo, como proteínas carboniladas (PC), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e mecanismos não enzimáticos, como a glutatona (Singh et al. 2008).

As EROs podem afetar diferentes órgãos e organelas celulares onde são geradas, podendo acarretar variadas patologias (Rocha et al. 2003). As células germinativas masculinas são suscetíveis ao estresse oxidativo devido à alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados em suas membranas e à baixa capacidade antioxidante destes tipos celulares (Vernet et al. 2004). A investigação em células de Sertoli de ratos expostos a concentrações de 36 ppm de Roundup durante 30 minutos, aumento do influxo da enzima lactato desidrogenase (LDH) e liberação de $^{45}Ca^{2+}$. Os autores relatam que o Ca^{2+} provocou sobrecarga, desequilíbrio redox, perturbações das vias de sinalização celular e a morte celular por necrose nos testículos de ratos expostos (Cavalli et al. 2013)

Em função da escassez de estudos dos efeitos deste herbicida em morcegos silvestres expostos na natureza, o nosso objetivo foi avaliar a toxicidade reprodutiva de uma exposição de curto-prazo, a concentrações ambientalmente relevantes da formulação comercial à base de glifosato Roundup® em *Artibeus lituratus* machos adultos. Pela importância como dispersores de sementes e seu papel na manutenção dos ecossistemas florestais, a investigação dos efeitos do glifosato na morfologia do aparelho reprodutivo masculino e de possíveis danos oxidativos testiculares em *Artibeus lituratus* pode ajudar a entender melhor os efeitos da exposição direta de animais silvestres aos agrotóxicos.

2 METODOLOGIA

2.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO GLIFOSATO.

O glifosato tem fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (m.m. = 169,1 g/mol) e, na forma de sal de isopropilamônio, apresenta-se acrescido do grupo $(CH_3)_2 CHNH_3^+$ (m.m. = 228,2 g/mol). Em condições ambientais, tanto o glifosato quanto seus sais são sólidos cristalinos, muito solúveis em água (12 g/L a 25 °C) e quase insolúveis em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e etanol, entre outros. O glifosato se funde a 200 °C e possui densidade aparente de 0,5 g/cm³ e se apresenta bastante estável em presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60 °C (De Amarante e Santos 2002).

2.2 CAPTURA E TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Morcegos machos adultos (n= 13) da espécie *Artibeus lituratus* foram capturados com auxílio de redes de neblina, que ficaram abertas à noite (19:00 às 00:00 horas), em locais de mata próximos à Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais (20° 45'S e 42° 52' W). Esses animais foram identificados com a Chave de Identificação de Morcegos Brasileiros (Vizzotto e Taddei 1973). Os machos da espécie *Artibeus lituratus* adultos sexualmente maduros, com ossificação epifisial completa e em atividade reprodutiva, foram coletados e armazenados em sacos de pano, que posteriormente foram levados e separados aleatoriamente, pesados com pesola e mantidos em morcegário localizado na área externa do Museu de Zoologia João Moojen da UFV. Os animais foram alocados em gaiolas individuais, mantidos por um período de aclimação de 3 dias posteriormente os animais foram divididos em dois grupos experimentais: grupo controle (Controle; n=7), alimentados com frutos sem glifosato; e um grupo tratado com a formulação comercial de glifosato (Tratado; n=6), alimentados com frutos aspergidos com calda contendo glifosato em uma concentração de 4 mL/100 mL de água, concentração comercial recomendada pelo fabricante. A calda preparada com o herbicida foi aspergida de forma homogênea, com o auxílio de um borrifador, garantindo total aplicabilidade na superfície externa das frutas. As frutas tratadas e não tratadas foram partidas e pesadas (aproximadamente 200 g cada porção) e foram oferecidas aos animais durante 3 dias, por volta das 18:00 h, sendo oferecida também água *ad*

libitum. Ao final do dia de tratamento, as sobras foram pesadas. Após 3 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical seguido de decapitação, e foram retirados os testículos, epidídimos e glândulas vesiculares. Os órgãos foram pesados e o testículo direito foi congelado a -80 C para análise posterior do estresse oxidativo e o testículo esquerdo foi fixado em karnovsky (4% paraformaldeído, 4% glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 molL⁻¹, pH 7,4) durante 24 horas em temperatura ambiente, para análises histomorfométricas.

2.3 ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS TESTICULARES

Um fragmento do testículo esquerdo foi destinado ao estudo em microscopia de luz. Os tecidos foram fixados em karnovsky (4% paraformaldeído, 4% glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 molL⁻¹, pH 7,4) durante 24 horas em temperatura ambiente. Após a fixação do tecido de testículo, a albugínea testicular foi retirada e pesada para o cálculo do peso do parênquima testicular. Fragmentos dos testículos foi desidratado em concentrações crescentes de etanol, incluídos em resina à base de 2-hidroxietil metacrilato, seccionados na espessura de 3µm (com intervalos de 40 µm) e corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%.

As análises histomorfométricas foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros, Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Imagens do parênquima testicular foram obtidas em microscópio (Olympus BX-60®, Tokyo, Japan) integrado com uma câmera (Olympus QColor-3®, Tokyo, Japan) e analisadas utilizando-se o programa Image-Pro Plus 4 (Media Cybernetics) e ImageJ 1.48.

2.3.1 Índice gonadossomático

Com base nos dados de peso corporal e testicular, foi obtido o índice gonadossomático (IGS), que representa o percentual de peso corporal alocado em gônadas e é calculado a partir da fórmula: $IGS = PC / PG \times 100$ (PC = peso corporal; PG = peso total das gônadas).

2.3.2 Proporção volumétrica (%) e volume (mL) dos componentes do parênquima testicular

As proporções volumétricas entre os elementos que compõem os compartimentos tubular e intertubular foram estimadas a partir da contagem de 2.660 pontos por animal, utilizando-se retículo com 266 intersecções (pontos), em aumento de 100X, realizando-se a contagem de 10 campos aleatoriamente distribuídos, nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal. Foram quantificados pontos sobre o túbulo seminífero, especificando-se aqueles sobre a túnica própria, o epitélio seminífero e lúmen, e os pontos sobre o espaço intertubular. Do compartimento intertubular, foram investigadas as células de Leydig, vasos sanguíneos, macrófagos, espaço linfático, e tecido conjuntivo, obtendo-se as proporções volumétricas e volume destes elementos, a partir de 1.000 pontos contados por animal, utilizando-se retículo com 400 intersecções, em aumento de 200X.

O volume de cada componente do parênquima testicular, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume líquido do parênquima testicular. O valor deste último foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo o peso da túnica albugínea testicular. Segundo França (1991), como a densidade do testículo é em torno de 1 (1,03 a 1,04), o peso testicular foi considerado igual ao seu volume.

2.3.3 Índice Tubulossomático

O índice tubulossomático (ITS) refere-se ao percentual de massa corporal alocado em túbulos seminíferos, visando quantificar o investimento em produção espermática com relação à massa corporal. A seguinte fórmula foi empregada: $ITS = (VTS/PC) \times 100$ (VTS = volume total de túbulos seminíferos; PC = peso corporal).

2.3.4 Diâmetro tubular, altura do epitélio e comprimento dos túbulos seminíferos

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 30 secções transversais de túbulos seminíferos, que apresentarem contorno o mais circular possível, não levando em conta o estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada

da túnica própria até o lúmen tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, representará a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas.

O comprimento total (CT) dos túbulos seminíferos por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada: $CT = VTTS / \pi R^2$ (VTS = volume total de túbulos seminíferos; πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos, sendo $R = \text{diâmetro tubular} / 2$). A fim de permitir a comparação entre diferentes espécies, o valor do CT, em metros, foi dividido pelo peso testicular, obtendo-se deste modo o comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo.

2.3.5 Morfometria da Células de Leydig

O cálculo do volume individual das células de Leydig foi realizado utilizando-se grade com 121 intercessões (pontos) em aumento de 400x. Foram contados 1000 pontos sobre o citoplasma e o núcleo das células de Leydig por animal, com a finalidade de se determinar a proporção (%) entre núcleo e citoplasma deste tipo celular. Em outra etapa, foi medido o diâmetro nuclear médio (DM) destas células em aumento de 400x. Trinta núcleos de células de Leydig foram medidos em cada animal. Os núcleos medidos foram aqueles que se apresentaram o mais esférico possível e com cromatina perinuclear e nucléolos bastante evidentes. A partir dos dados acima obtidos e aplicando-se as fórmulas abaixo, foi calculado o volume nuclear, o volume do citoplasma e o volume da célula de Leydig, por animal. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos (μm^3).

- Volume nuclear = $4/3\pi R^3$ (R = raio nuclear)
- Volume citoplasmático = (% citoplasma x volume nuclear) / % núcleo
- Volume celular = volume nuclear + volume citoplasmático.

De posse do volume individual da célula de Leydig, foram calculados o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo, em cada animal.

2.3.6 Índice Leydigossomático

Este índice representa o percentual de massa corporal alocado em células de Leydig. A seguinte fórmula foi empregada: $ILS = (VCL/PC) \times 100$ (VCL=volume da célula de Leydig; PC=peso corporal).

2.3.7 Estimativa da população celular do epitélio seminífero. Contagem de células do epitélio seminífero no estágio 1

A estimativa dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero no estágio 1 do ciclo foi feita a partir de contagens dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli. Nestas contagens, foram utilizadas 10 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal. Os núcleos dos seguintes tipos celulares foram contados:

- Espermatogônias do tipo A;
- Espermatócitos primários na transição de preleptóteno para leptóteno;
- Espermatócitos primários em paquíteno;
- Espermátides arredondadas.

Com exceção dos nucléolos das células de Sertoli, as contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear médio e espessura do corte histológico. A seguinte fórmula proposta por Amann e Almquist (1962) foi empregada: $N^{\circ} \text{ corrigido} = \text{contagem obtida} \times (\text{espessura do corte} / \text{espessura do corte} + \sqrt{(DM/2)^2 - (DM/4)^2})$ (DM=diâmetro nuclear médio).

O diâmetro nuclear médio representará a média dos diâmetros de 30 núcleos do tipo celular estudado por animal. Para a espermatogônia do tipo A, que apresenta núcleo ovoide, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre o maior e o menor diâmetro nuclear. Uma vez que as células de Sertoli possuem núcleo irregular, a correção de seu número foi feita a partir do diâmetro nucleolar médio e a espessura do corte histológico. Deste modo foram contabilizadas exclusivamente células de Sertoli com nucléolo visível.

Uma vez conhecido o número médio corrigido de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero e o comprimento total destes túbulos, foi estimada a população total destas células por testículo e por grama de testículo.

2.3.8 Rendimento intrínseco da espermatogênese

Esta análise permite avaliar a eficiência do processo espermatogênico, possibilitando quantificar as perdas ocorridas durante os processos de divisão e diferenciação celular. Para tal, as seguintes razões foram obtidas:

- Espermatócitos primários em preleptóteno-leptóteno / espermatogônias do tipo A, obtendo-se o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais, ou índice mitótico;
- Espermátides arredondadas / espermatócitos primários em paquíteno, obtendo-se o índice meiótico;
- Espermátides arredondadas / espermatogônias do tipo A, obtendo-se o rendimento geral da espermatogênese.
- Número total corrigido de células germinativas / número de células de Sertoli, obtendo-se o índice da célula de Sertoli.

2.3.9 Reserva espermática testicular

Assumindo que perdas durante a espermiogênese não são significativas (Johnson et al. 2000), a reserva espermática testicular (RET) foi calculada com base na população de espermátides arredondadas. A seguinte fórmula foi empregada: $RET = (CT/espessura\ do\ corte) \times número\ corrigido\ de\ espermátides\ arredondadas\ por\ secção\ de\ túbulo\ seminífero$ (CT=comprimento total de túbulo seminífero) (adaptação da fórmula descrita por (Amann 1970; Berndtson 1977).

2.4 ANÁLISES DO ESTRESSE OXIDATIVO

2.4.1 Enzimas antioxidantes dos tecidos

Cerca de 450 mg do testículo direito de *A. lituratus* foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (pH 7.4) 0.2 M com EDTA (1M) e a suspensão centrifugada a 12.000 rpm por 10 min. há 4°C. O sobrenadante resultante foi utilizado para as análises das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), e concentração de malondialdeído (MDA), concentração de proteína carbonilada (PC), e proteína total.

2.4.2 Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi mensurada nos tecidos em leitor de microplacas ($\lambda = 570\text{nm}$) (Dieterich et al. 2007), baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido O_2^- gerando então, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) o qual transforma-se em ($\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) e, assim, diminuir a razão de auto oxidação do pirogalol. Os resultados foram expressos U/mg de proteína.

2.4.3 Atividade de Catalase (CAT).

A atividade da CAT foi mensurada segundo Aebi (1984). A enzima foi determinada pela taxa de queda da absorbância em 60 segundos do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (10 mM) em tampão fosfato de potássio 0.2 M (pH 7.0) e homogenato de tecido em espectrofotômetro ($\lambda = 240\text{nm}$). Foi utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio $\epsilon_{340} = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e os resultados expressos em U/mg de proteína.

2.4.4 Atividade de Glutathione S-transferase (GST).

A atividade da enzima GST foi mensurada de acordo com Habig et al. (1976), através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno. A atividade da enzima foi estimada em uma mistura contendo CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) 1 mM em etanol, GSH (Glutathione Redutase) 1 mM, fosfato de potássio (pH 7.0) 100 mM e homogenato de tecido pelo aumento da absorbância ($\lambda = 340 \text{ nm}$) por 60 s. O coeficiente de extinção molar do CDNB é $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para os cálculos e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

2.4.5 Determinação do Malondialdeído (MDA)

A concentração de malondialdeído (MDA) foi estimada conforme descrito por Wallin et al. (1993). 200 μL do sobrenadante dos tecidos foram homogeneizados a 400 μL de uma solução de ácido tricloroacético (15%) / ácido tiobarbitúrico (0,375%) / ácido clorídrico (0,25 M), aquecido por 40 minutos em água fervente (90°C) e resfriado. Após resfriar, foi acrescentado álcool butílico, agitado em vortex por 2 min. e em seguida centrifugado (10 min a 3000 rpm). A fase superior foi

utilizada para quantificar a concentração de MDA em leitor de microplacas ($\lambda = 535\text{nm}$). A concentração de MDA foi determinada por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMPO). Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína.

2.4.6 Análise da concentração de proteína Carbonilada (PC).

Grupos carbonil nas proteínas (PC) foram mensuradas segundo Levine et al. (1990). Foram utilizados os pellets resultantes dos homogenatos dos tecidos preparado como descrito acima para as enzimas. Foram adicionados aos pellets 0,5 mL de solução de dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM em ácido clorídrico 2 M, misturados em vortex e mantidos em temperatura ambiente no escuro e misturando a cada 15 minutos durante meia hora. Em seguida, 0,5mL de TCA 10 % gelado foi adicionado em cada tubo, agitado com vortex, centrifugada (5.000 rpm por 10 min. a 4 °C) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado três vezes com 1 mL de acetato de etila e etanol (1:1), agitado em vortex, centrifugado e o sobrenadante descartado. Ao final, 1 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 6 % foi adicionado nos tubos, agitados em vortex para dissolver o pellet e centrifugados para precipitar resíduos. Os danos às proteínas foram determinados no sobrenadante final, baseado nos grupos carbonil da reação com DNPH e mensurado em espectrofotômetro ($\lambda = 370\text{nm}$). O total de proteínas carboniladas foi calculado baseado no coeficiente de extinção molar de $\epsilon_{340} = 22,000 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expresso em nmol/mL.

2.4.7 Proteína total

A concentração de proteína total dos tecidos foi mensurada de acordo com Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como curva padrão.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão. As médias obtidas entre os grupos foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro–Wilk, 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 E PESO DO ALIMENTO tratamento em animais tratados por 3 dias com Roundup® induziu diminuição do peso corporal do grupo tratado em relação ao controle, apesar de ter havido maior consumo de alimento por este grupo, conforme mostra a (tabela 1).

TABELA 1. PESO CORPORAL E PESO DO ALIMENTO OFERECIDO AOS GRUPOS DE *A. LITURATUS* EXPOSTO AO ROUNDUP®.

GRUPOS	Diferença Peso corporal (g)	Peso do alimento Fornecido (g)	Alimento consumido (g)
Controle	0,84 \pm 0,17 ^a	189,60 \pm 6,02 ^a	94,73 \pm 14,18 ^a
Tratado	4,12 \pm 1,51 ^b	194,77 \pm 15,28 ^a	124,25 \pm 9,49 ^b

Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais na coluna indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

4.2 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRIAS TESTICULARES.

4.2.1 Parâmetros testiculares e índice gonadossomático

Os resultados para peso do testículo, peso da albugínea, peso do parênquima e índice gonadossomático encontram-se na (tabela 2). Nos animais expostos ao Roundup® por 3 dias, não se observou diferença no peso do testículo e no índice gonadossomático entre os tratamentos, demonstrando que o percentual de massa corporal alocado nos testículos foi similar para os dois grupos.

TABELA 2. PARÂMETROS TESTICULARES E ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO (IGS) DE *A. LITURATUS* EXPOSTO AO ROUNDUP®.

GRUPOS	PT (g)	PA (g)	PP (g)	IGS (%)
Controle	0,48 ± 0,10 ^a	0,15 ± 0,05 ^a	0,33 ± 0,19 ^a	0,74 ± 0,16 ^a
Tratado	0,41 ± 0,15 ^a	0,05 ± 0,02 ^a	0,36 ± 0,13 ^a	0,56 ± 0,17 ^a

PT: peso testículos (g); **PA:** peso da albugínea testicular (g); **PP:** peso do parênquima (g); **IGS:** índice gonadossomático (%). Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais na coluna indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

4.2.2 Morfometria do túbulo seminífero.

Os resultados das médias obtidas para a proporção volumétrica e o volume dos componentes do parênquima testicular estão mostradas na (tabela 3). Os animais expostos ao Roundup® por 3 dias, não apresentaram diferenças entre as médias dos grupos para o índice tubulossomático e os volumes dos túbulos seminíferos do intertúbulo, epitélio, túnica própria, e do lúmen; mesmos assim na porcentagem de túbulo e intertúbulo no parênquima testicular ($p > 0,05$).

Considerando os componentes presentes no compartimento tubular (tabela. 4), verifico u-se que os animais expostos ao Roundup® por 3 dias apresentaram menor valor médio para a porcentagem de lúmen e túnica própria em relação aos animais do grupo controle ($p < 0,05$). Já o percentual de epitélio seminífero não apresentou diferenças entre os grupos ($p > 0,05$).

TABELA 3. 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 *A. LITURATUS* EXPOSTO AO ROUNDUP®.

PARÂMETROS	CONTROLE	TRATADO
ITS (%)	0,47 ± 0,27 ^a	0,43 ± 0,12 ^a
TS (%)	91,02 ± 2,36 ^a	88,73 ± 2,09 ^a
INT (%)	8,98 ± 2,36 ^a	11,27 ± 2,09 ^a
VTTS (mL)	0,31 ± 0,18 ^a	0,32 ± 0,11 ^a
VIT (mL)	0,028 ± 0,017 ^a	0,041 ± 0,021 ^a
VEP (mL)	0,27 ± 0,16 ^a	0,28 ± 0,10 ^a
VTP (mL)	0,03 ± 0,02 ^a	0,02 ± 0,01 ^a
VLu (mL)	0,028 ± 0,017 ^a	0,041 ± 0,021 ^a

ITS: Índice tubulossomático (%); **TS:** Túbulo seminífero (%); **INT:** Intertúbulo (%); **VTTS=** Volume total dos túbulos (mL); **VIT:** Volume do intertúbulo (mL); **VEP:** Volume do epitélio (mL); **VTP:** Volume da túnica própria (mL); **VLu:** Volume do Lúmen (mL). Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais nas linhas indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

TABELA 4. PERCENTUAL DOS COMPONENTES DO COMPARTIMENTO TUBULAR DOS TESTÍCULOS DE *A. LITURATUS* EXPOSTO AO ROUNDUP®.

GRUPOS	EP (%)	Lu (%)	TP (%)
Controle	79,11 ± 1,93 ^a	3,71 ± 2,19 ^a	8,19 ± 1,27 ^a
Tratado	77,59 ± 1,97 ^a	6,59 ± 0,88 ^b	4,56 ± 0,56 ^b

EP: epitélio seminífero (%); **Lu:** lúmen (%); **TP:** túnica própria (%). Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais na coluna indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Na (tabela 5) encontram-se as médias das áreas dos componentes do parênquima testicular, bem como os índices parênquimossomático (IPS); índice epitéliossomático (IES) e relação túbulo/epitélio (RT/E). Os valores médios para a área do lúmen (ArLu) e relação túbulo/epitélio (RT/E) foram maiores nos animais tratados com Roundup® por 3 dias, quando comparado ao valor médio obtido para os animais do grupo controle ($p < 0,05$).

TABELA 5. AREA DOS COMPONENTES DO PARÊNQUIMA TESTICULAR, ÍNDICE PARENQUIMOSSOMÁTICO (IPS); ÍNDICE EPITELIOSSOMÁTICO (IES) E RELAÇÃO TUBULO/EPITELIO (RT/E) DOS TESTÍCULOS DE *A. LITURATUS* EXPOSTO AO ROUNDUP®.

PARÂMETROS	CONTROLE	TRATADO
ArTS (µm)	76648,83 ± 16020,30 ^a	89458,21 ± 11674,74 ^a
ArLu (µm)	2822,11 ± 1140,16 ^a	7801,49 ± 1769,28 ^b
ArEp (µm)	73826,72 ± 15749,04 ^a	81656,72 ± 11283,50 ^a
IPS (%)	0,51 ± 0,29 ^a	0,49 ± 0,15 ^a
IES (x 10 ⁶ %)	41,0 ± 24,0 ^a	38,0 ± 11,0 ^a
RT/E	1,24 ± 0,05 ^a	1,42 ± 0,07 ^b

ArTS: área dos túbulos seminíferos (µm); **ArLu:** área do lúmen (µm); **ArEp:** área do epitélio (µm); **IPS:** índice parênquimossomático (%); **IES X 10⁶:** índice epitéliossomático (%); **RT/E:** relação túbulo/epitélio. Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais nas linhas indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Na (tabela 6) encontram-se as médias dos grupos, quanto ao diâmetro dos túbulos seminíferos (DT), diâmetro lúmen (Lu), altura do epitélio seminífero (AE), comprimento dos túbulos seminíferos por testículo (CT) e por grama de testículo (CT/gT). Enquanto os valores médios para diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero, comprimento dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo, não variaram entre os grupos ($p > 0,05$), o diâmetro do lúmen foi maior nos animais tratados com Roundup® por 3 dias, quando comparado ao valor médio obtido para os animais do grupo controle ($p < 0,05$).

TABELA 6. DIÂMETRO DOS TUBULOS SEMINÍFEROS (DT), ALTURA DO EPITÉLIO SEMINÍFERO (AE), DIÂMETRO DO LÚMEN (Lu), COMPRIMENTOS DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS (CT) E POR GRAMA DE TESTÍCULO (CT/gT) 'DE A. *LITURATUS* EXPOSTO AO ROUNDUP®.

GRUPOS	DT (µm)	AE (µm)	Lu (µm)	CT (m)	CT/gT (m)
Controle	311,05 ± 33,38 ^a	125,96 ± 16,25 ^a	59,13 ± 11,09 ^a	3,79 ± 2,02 ^a	7,82 ± 4,08 ^a
Tratado	337,05 ± 21,79 ^a	118,94 ± 10,43 ^a	99,17 ± 11,73 ^b	3,51 ± 0,95 ^a	8,79 ± 1,07 ^a

DT: diâmetro dos túbulos seminíferos (µm), **AE:** altura do epitélio seminífero (µm), **Lu:** diâmetro do lúmen (µm), **CT:** comprimentos dos túbulos seminíferos (m) **CT/gT:** comprimentos dos túbulos seminíferos por grama de testículo (m). Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais na coluna indicam semelhança estatística entre os grupos (p > 0,05).

A análise histológica dos testículos dos morcegos mostrou que todos os animais, independente do grupo, apresentaram túbulos seminíferos íntegros. Os animais tratados com Roundup® por 3 dias, apresentaram morfologia anormal no diâmetro do lúmen. Células germinativas em diferentes estágios da espermatogênese (Fig. 1). Embora quantificados, todos os animais do grupo tratado exibiram vacuolização em células do epitélio seminífero.

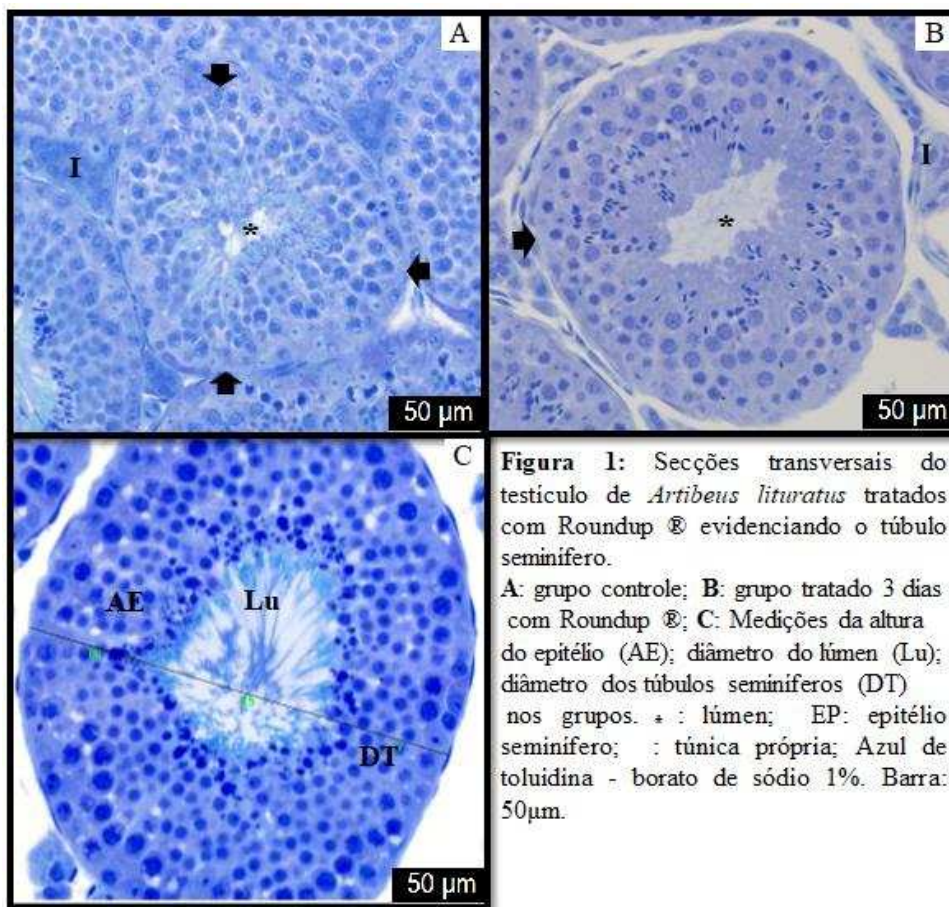


Figura 1: Secções transversais do testículo de *Artibeus lituratus* tratados com Roundup® evidenciando o túbulo seminífero. A: grupo controle; B: grupo tratado 3 dias com Roundup®; C: Medições da altura do epitélio (AE); diâmetro do lúmen (Lu); diâmetro dos túbulos seminíferos (DT) nos grupos. * : lúmen; EP: epitélio seminífero; : túnica própria; Azul de toluidina - borato de sódio 1%. Barra: 50µm.

4.2.3 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). Entretanto, ao se analisar, observou-se aumento significativo comparado com o grupo controle das seguintes proporções nos animais tratados com Roundup® por 3 dias, o percentual de célula de Leydig e do núcleo dessas células no intertúbulo, proporção de citoplasma de célula de Leydig no intertúbulo e percentual de espaço linfático no intertúbulo ($p > 0,05$).

TABELA 7. PERCENTUAIS DE CÉLULA DE LEYDIG (L) E DE COMPONENTES DO COMPARTIMENTO INTERTUBULAR DOS TESTÍCULOS DE *A. LITURATUS* EXPOSTOS AO ROUNDUP®.

GRUPOS	L (%)	NL (%)	CL (%)	VS (%)	EL (%)	TC (%)	MAC (%)
Controle	0,58 ± 0,27 ^a	0,15 ± 0,05 ^a	0,44 ± 0,23 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,14 ^a	0,009 ± 0,003 ^a	0,004 ± 0,001 ^a
Tratados	1,28 ± 0,23 ^b	0,37 ± 0,09 ^b	0,91 ± 0,15 ^b	0,03 ± 0,008 ^a	0,50 ± 0,12 ^b	0,012 ± 0,006 ^a	0,005 ± 0,003 ^a

L: célula de Leydig (%); NL: núcleo de célula de Leydig (%); CL: citoplasma de célula de Leydig; VS: vaso sanguíneo (%); EL: espaço linfático (%); TC: tecido conjuntivo (%); MAC: macrófagos (%). Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais na coluna indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Considerando-se o volume médio total de cada elemento do intertúbulo no parênquima testicular, mostrados na (tabela 8), nos animais tratados com Roundup® por 3 dias, apresentaram diferenças entre as médias, volume do núcleo de célula de Leydig (VNL) e volume do espaço linfático (VEL); ($p > 0,05$).

TABELA 8. VOLUME TOTAL (ML) DE CÉLULA DE LEYDIG (L), NÚCLEO DE CÉLULA DE LEYDIG (VNL), CITOPLASMA DE CÉLULA DE LEYDIG (VCL), VASO SANGUÍNEO (VVS), ESPAÇO LINFÁTICO (VEL), TECIDO CONJUNTIVO (VTC), E MACROFAGOS (VMAC) NO PARÊNQUIMA TESTICULAR DE *A. LITURATUS* EXPOSTOS AO ROUNDUP®.

PARÂMETROS	CONTROLE	TRATADOS
VL (mL)	0,0019 ± 0,0014 ^a	0,0048 ± 0,0023 ^a
VNL (mL)	0,0004 ± 0,0003 ^a	0,0014 ± 0,0007 ^b
VCL (mL)	0,0015 ± 0,0011 ^a	0,0033 ± 0,0016 ^a
VVS (mL)	0,028 ± 0,017 ^a	0,041 ± 0,021 ^a
VEL (mL)	0,0005 ± 0,0003 ^a	0,0018 ± 0,0008 ^b
VTC (x 10 ⁶ mL)	25,0 ± 14,0 ^a	39,0 ± 15,0 ^a
VMAC (x 10 ⁶ mL)	16,0 ± 10,0 ^a	16,0 ± 8,0 ^a

Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais nas linhas indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

A análise histológica da região do intertúbulo do testículo dos morcegos mostrou que todos os animais, do grupo tratado com Roundup® por 3 dias, apresentaram alterações, em relação ao formato das células de Leydig, aumento do número de células de Leydig, percentual de núcleo de Leydig e do citoplasma de Leydig. Pode-se observar todos os seus componentes e as diferenças comparado com o grupo controle ($p > 0,05$). (Fig. 2).

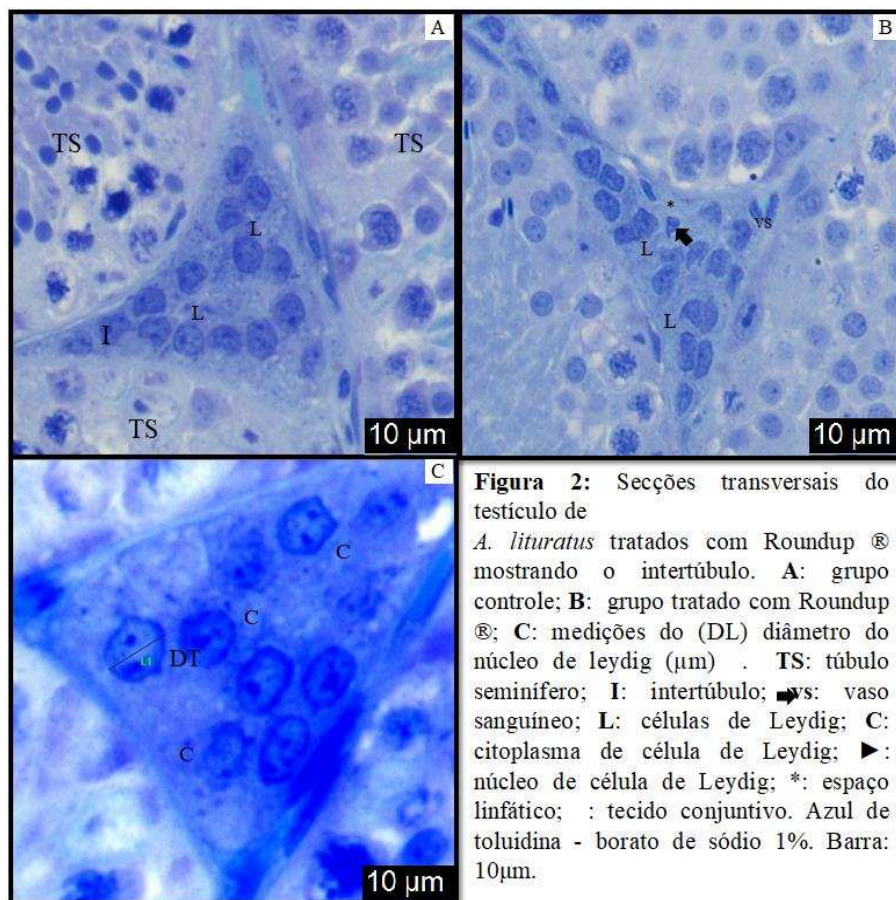


Figura 2: Secções transversais do testículo de *A. lituratus* tratados com Roundup® mostrando o intertúbulo. **A:** grupo controle; **B:** grupo tratado com Roundup®; **C:** medições do (DL) diâmetro do núcleo de leydig (μm). TS: túbulo seminífero; I: intertúbulo; vs: vaso sanguíneo; L: células de Leydig; C: citoplasma de célula de Leydig; ►: núcleo de célula de Leydig; *: espaço linfático; : tecido conjuntivo. Azul de toluidina - borato de sódio 1%. Barra: 10 μm .

4.2.4 Morfometria de células de Leydig

Os resultados 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 9). Animais tratados com Roundup® por 3 dias apresentaram valores médios para diâmetro nuclear e volumes (nuclear, citoplasmático e celular) das células de Leydig sem diferença entres os grupos ($p < 0,05$). O valor médio referente

ao número de células de Leydig (N° L) e por grama de testículo (N° L/gT) foi maior nos animais tratados com Roundup® por 3 dias (Tab. 10) quando comparado ao controle (p<0,05). Não foram observadas diferenças entre as médias dos grupos em relação ao índice leydigossomático (p>0,05; Tab. 10).

TABELA 9. DIÂMETRO NUCLEAR (DL) E VOLUMES NUCLEAR (VN), CITOPLASMÁTICO (VCI) E CELULAR (VCL) DAS CÉLULAS DE LEYDIG, DE *A. LITURATUS* EXPOSTOS AO ROUNDUP®.

GRUPOS	DL (µm)	VN (µm ³)	VCI (µm ³)	VCL (µm ³)
Controle	6,43 ± 0,60 ^a	142,01 ± 43,36 ^a	441,99 ± 292,82 ^a	584,00 ± 335,96 ^a
Tratados	6,31 ± 0,24 ^a	131,97 ± 15,15 ^a	327,63 ± 44,48 ^a	459,60 ± 46,97 ^a

Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais na coluna indicam semelhança estatística entre os grupos (p > 0,05).

TABELA 10. NÚMERO DE CÉLULAS DE LEYDIG (N° L), NÚMERO DE CÉLULAS DE LEYDIG POR GRAMA DE TESTÍCULO (N° L/gT) E DO ÍNDICE LEYDIGOSSOMÁTICO (ILS) EM *A. LITURATUS* EXPOSTOS AO ROUNDUP®.

GRUPOS	N° L	N° L/gT	ILS (%)
Controle	3,42 ± 2,59 ^a	6,94 ± 4,93 ^a	0,003 ± 0,002 ^a
Tratados	10,72 ± 6,16 ^b	24,71 ± 5,63 ^b	0,006 ± 0,003 ^a

Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais na coluna indicam semelhança estatística entre os grupos (p > 0,05).

4.2.5 Número corrigido de células do epitélio seminífero no estágio 1.

Os resultados das médias dos grupos, referentes aos números corrigidos de espermatogônia tipo A (EG), Preleptoteno/Leptótano (P/L), Paquíteno (PQ), espermátide arredondada (EA), de Sertoli, e de germinativas (G), podem ser observados na (tabela 11). Animais tratados com Roundup® por 3 dias apresentaram valores médios com diferença significativa, quando comparado ao controle, com diminuições nos números corrigidos de espermatogônia tipo A (EG), preleptótano/leptótano (P/L) e de Sertoli (p<0,05).

O valor médio referente ao número de células de Sertoli (N° S) e por grama de testículo (N° S/gT) não foram observadas diferenças nas médias do grupo dos animais tratados com Roundup® por 3 dias (Tab. 12) quando comparado ao controle (p<0,05).

TABELA 11. NÚMERO CORRIGIDO DE CÉLULAS DO EPITÉLIO SEMINÍFERO NO ESTÁDIO 1 DE *A. LITURATUS* EXPOSTOS AO ROUNDUP®.

GRUPOS	EG	PL	PQ	EA	Sertoli	G
Controle	3,33 ± 0,69 ^a	2,97 ± 0,66 ^a	11,35 ± 2,54 ^a	18,27 ± 3,06 ^a	58,40 ± 5,72 ^a	35,93 ± 5,72 ^a
Tratados	1,79 ± 0,23 ^b	1,73 ± 0,49 ^b	9,85 ± 2,03 ^a	15,03 ± 5,33 ^a	42,01 ± 6,31 ^b	28,43 ± 6,84 ^a

Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais na coluna indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

TABELA 12. NÚMERO DE CÉLULAS DE SERTOLI (N° S), NÚMERO DE CÉLULAS DE SERTOLI POR GRAMA DE TESTÍCULO (N° S/gT) DE *A. LITURATUS* EXPOSTOS AO ROUNDUP®.

GRUPOS	N° ST X 10 ⁶	N° S/gT
Controle	76,0 ± 45,0 ^a	0,00021 ± 0,00020 ^a
Tratados	49,0 ± 17,0 ^a	0,00012 ± 0,00002 ^a

Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais na coluna indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

4.2.6 Rendimento intrínseco da espermatogênese.

Os resultados referentes às medias dos índices mitótico (Mit), meiótico (Mei), Sertoli (IS), rendimento geral da espermatogênese (RG), e capacidade total da célula de Sertoli (CSS), podem ser observados na (tabela 13). Animais tratados com Roundup® por 3 dias não apresentaram diferenças quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

TABELA 13. RESERVA ESPERMÁTICA TESTICULAR (RET), E POR GRAMA DE TESTÍCULO (RET/gT) EM *A. LITURATUS* EXPOSTOS AO ROUNDUP®

GRUPOS	Mit	Mei	IS	RG	CSS
Controle	0,90 ± 0,22 ^a	1,64 ± 0,29 ^a	0,31 ± 0,04 ^a	5,64 ± 1,47 ^a	0,61 ± 0,04 ^a
Tratados	0,95 ± 0,20 ^a	1,49 ± 0,20 ^a	0,36 ± 0,12 ^a	8,63 ± 3,88 ^a	0,68 ± 0,17 ^a

Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais na coluna indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

4.2.7 Reserva espermática testicular

Os resultados referentes às medias da reserva testicular (RET), e por grama de testículo, podem ser observadas na (tabela 14). Animais tratados com Roundup® por 3 dias, não apresentaram diferenças quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

TABELA 14. RESERVA ESPERMÁTICA TESTICULAR (RET), E POR GRAMA DE TESTÍCULO (RET/gT) EM *A. LITURATUS* EXPOSTOS AO ROUNDUP®

GRUPOS	RET	RET/gT
Controle	23,0 ± 15,0 ^a	67,0 ± 9,0 ^a
Tratados	18,0 ± 11,0 ^a	43,0 ± 10,0 ^a

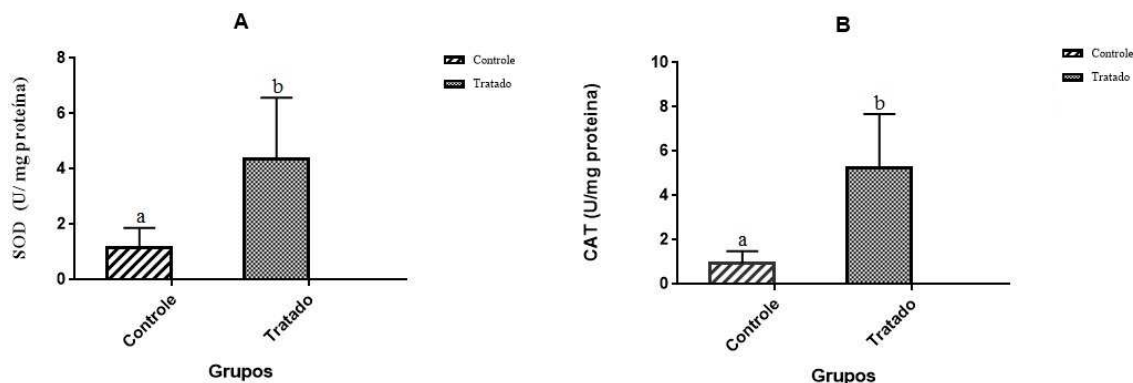
Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais na coluna indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

4.3 ESTRESSE OXIDATIVO

4.3.1 Enzimas SOD e CAT

Os resultados referentes às médias da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD; Fig. 3 A) e catalase (CAT; Fig. 3 B) (U/ mg proteína). Animais tratados com Roundup® por 3 dias, mostraram aumento nas enzimas (SOD) e (CAT) quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

FIGURA 3. ATIVIDADE DAS ENZIMAS SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD; A) E CATALASE (CAT; B) (U/ MG PROTEÍNA) NOS TESTÍCULO DE *A. LITURATUS* EXPOSTOS AO ROUNDUP®.

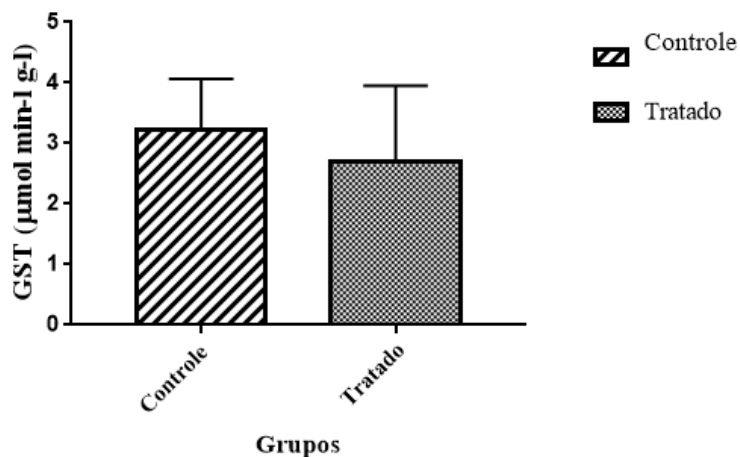


Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

4.3.2 Atividade da enzima Glutationa-S-Transferase (GST).

Os resultados referentes às médias da atividade da enzima glutationa-s-transferase (GST) podem ser observados na (figura 4). Animais tratados com Roundup® por 3 dias, não mostraram aumento na atividade da enzima (GST) quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

FIGURA 4. ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA- S- TRANSFERASE (GST). NOS TESTÍCULO DE *A. LITURATUS* EXPOSTOS AO ROUNDUP®.

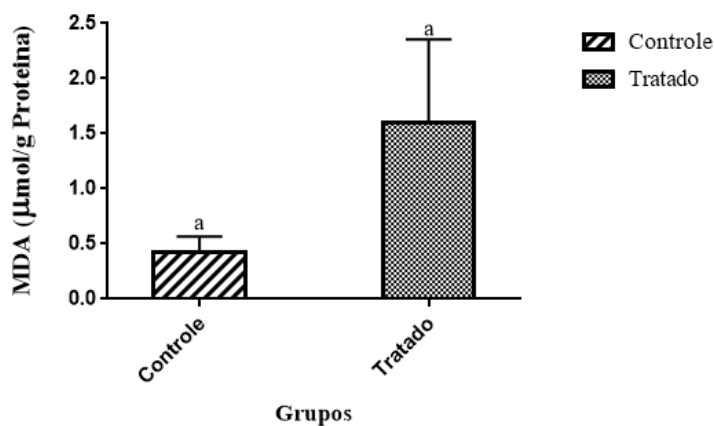


Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

4.3.3 Atividade do produto Malondialdeído (MDA).

Os resultados referentes às medias da atividade do produto da peroxidação lipídica (MDA) podem ser observados na (figura 5). Animais tratados com Roundup® por 3 dias, não mostraram aumento na atividade do produto malondialdeído (MDA) quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

FIGURA 5. ATIVIDADE DO PRODUTO MALONDIALDEIDO (MDA). NOS TESTÍCULO DE *A. LITURATUS* EXPOSTOS AO ROUNDUP®.

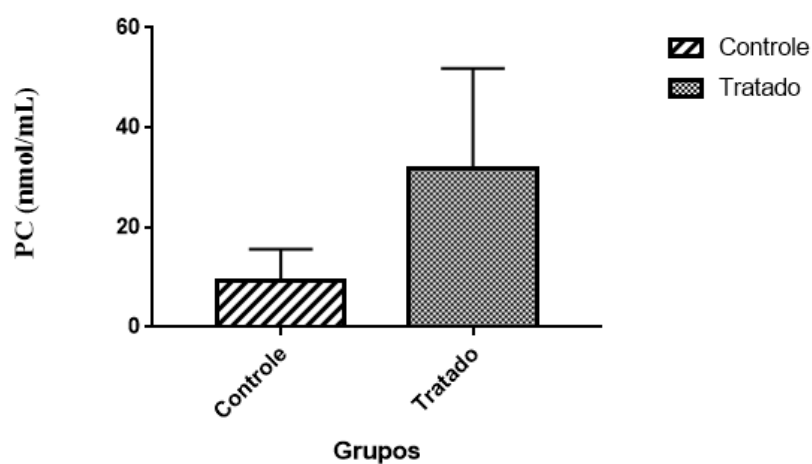


Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

4.3.4 Concentração de proteínas carboniladas (PC)

Em relação às médias da atividade da oxidação de proteínas carboniladas (PC), que pode se observar na (figura 6). Houve um aumento significativo em animais tratados com Roundup® por 3 dias, quando comparados ao controle ($p < 0,05$).

FIGURA 6. ATIVIDADE DE PROTEÍNA CARBONILADA (PC) NOS TESTÍCULO DE *A. LITURATUS* EXPOSTOS AO ROUNDUP®.

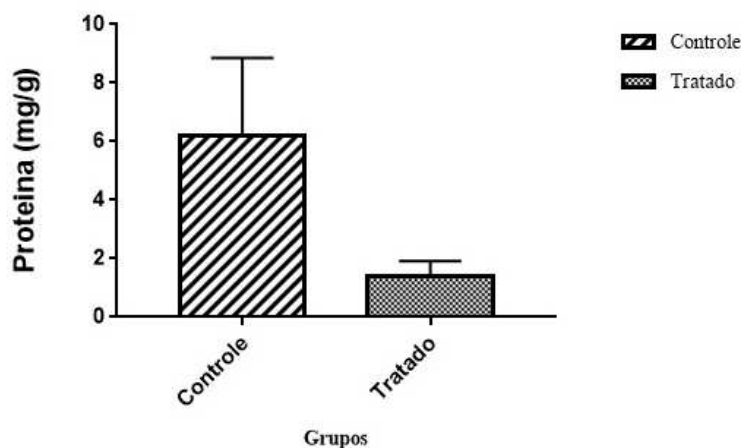


Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

4.3.5 Proteína total

Em relação às médias da concentração de proteínas total, que pode se observar na (figura 7). Houve uma diminuição significativa da quantidade de proteína total nos animais tratados com Roundup® por 3 dias, em relação ao controle ($p < 0,05$).

FIGURA 7. QUANTIDADE DE PROTEÍNA TOTAL NOS TESTÍCULO DE *A. LITURATUS* EXPOSTOS AO ROUNDUP®.



Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Letras iguais indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram investigados os efeitos de uma exposição de curto-prazo a baixas concentrações de uma formulação comercial, herbicida base glifosato (Roundup®) sobre a toxicidade reprodutiva de morcegos frugívoros. Foi testada a concentração recomendada pelo fabricante, para utilização em determinadas culturas, com o objetivo de simular as condições que os animais encontram na natureza.

Segundo Doliner (1991), o glifosato não gera bioacumulação no corpo de animais, e a molécula ativa do glifosato é rapidamente excretada nas fezes (68-80%) e o restante é excretado em proporções menores, eliminadas na urina (7-31%). Ainda neste estudo, a meia-vida do glifosato no organismo de ratos é curta, sendo que 95% do composto ativo eliminado 48 horas após a administração. As administrações de doses repetidas de glifosato também não apresentam manifestação de bioacúmulo (Williams et. al. 2000).

No presente estudo, observamos que morcegos expostos ao herbicida glifosato apresentaram uma diminuição do peso corporal ao final do tratamento. Estudos em ratos tratados com o mesmo agrotóxico, em baixas e altas doses (5, 50, 500 mg/kg/dia) por 5 semanas, também reportaram perda de peso em animais expostos (Pengyuan et al. 2016).

Em relação à toxicidade reprodutiva, mais especificamente aos parâmetros tubulares, observou-se um aumento significativo do diâmetro, da área e da porcentagem do lúmen no grupo tratado. Este aumento pode estar refletindo um acúmulo dos líquidos segregados, devido a lesões na célula de Sertoli, causadas por possíveis danos sofridos, resultando em um aumento dos fluidos, já que as células de Sertoli participam da instauração das junções de oclusão que formam a barreira hematotesticular e formação do lúmen tubular devido à secreção de fluidos (Kerr et al. 2006).

O percentual de túnica própria, por sua vez, apresentou uma diminuição em relação ao controle, resultado que está de acordo com o esperado, já que há uma relação inversamente proporcional do percentual de túnica própria e lúmen.

Em relação aos parâmetros diâmetro do túbulo e altura do epitélio, não houve diferença entre os grupos controle tratados. Entretanto, a relação túnica-epitélio (RT/E) apresentou um aumento significativo em animais tratados, indicando que, quando avaliados conjuntamente, houve aumento do túbulo e diminuição do epitélio germinativo após o tratamento com glifosato, sugerindo dano ao epitélio. Estes resultados concordam com efeitos encontrados por Romano et al. (2010) em ratos que receberam as doses de 5, 50 e 250mg/kg de glifosato durante o período pré-púbere. Os animais expostos apresentaram aumento do diâmetro luminal e diminuição do epitélio germinativo devido ao efeito anti-androgênico deste herbicida. Assim como no presente estudo, os resultados sugerem que as principais alterações encontradas ocorreram no epitélio germinativo.

Em relação aos parâmetros intertubulares, observou-se um aumento no volume e percentual de núcleo da célula de Leydig, bem como na porcentagem de citoplasma da célula de Leydig e na porcentagem de células de Leydig, assim como número de Leydig e número de Leydig por grama de testículo em animais tratados, apesar do diâmetro das células de Leydig não ter apresentado alterações entre os grupos. Neste estudo não foi medida a testosterona em soro, mas uma hipótese que explicaria este efeito seria um mecanismo compensatório do organismo, pela possível redução na secreção de testosterona induzida pela exposição ao glifosato, já que isto poderia aumentar a porcentagem e número de células de Leydig via aumento na secreção de hormônio luteinizante (LH). Tem sido reportado que animais expostos ao glifosato apresentam queda nas concentrações plasmáticas de testosterona, devido à sua ação como um desregulador endócrino (Benachour; Séralini 2009; Romano et al. 2008; 2010). Este pesticida é capaz de mimetizar a função de um hormônio natural nos seres vivos ou inibir a atividade normal do próprio hormônio. Segundo Romano et al. (2010) o glifosato provocou queda da produção de testosterona,

altura do epitélio e diâmetro do lúmen. De acordo com Clair et al. (2012), a exposição de células do testículo de ratos ao glifosato, em doses baixas, leva a uma diminuição de 35% da concentração de testosterona *in vitro*. Baixos níveis de testosterona, também afetam diretamente a espermatogênese, epidídimo, vesícula seminal e a manutenção da nutrição do esperma, devido a diminuição das secreções dos líquidos necessários para sua boa função; em consequência, isto pode gerar efeitos sobre o sistema reprodutor incluindo malformações e alterações epigenéticas nas futuras descendências (Meistrich et al. 1975; Romano et al. 2012).

Em relação às contagens de células do estágio 1, houve diminuição no número corrigido de célula de Sertoli, espermatogônia e espermatócito na fase de preleptóteno/leptóteno nos animais tratados em relação ao controle.

As células de Sertoli, quando maduras, passam a participar da proliferação de espermatócitos primários e formação das junções de oclusão que formam a barreira hematotesticular. As espermatogônias e espermatócito na fase de preleptóteno/leptóteno foram alvos de lesões causadas por exposição ao glifosato (França e Garcia, 2005).

Além disso, o surfactante nonilfenol, um importante contaminante presente na formulação comercial contendo glifosato, alterou drasticamente a morfologia das células de Sertoli, a homeostase de Ca^{2+} , e levou à apoptose da célula de Sertoli em ratos após a exposição (Gong et al. 2009). De fato, as células de Sertoli parecem ser afetadas por agentes tóxicos, mesmo do que as células germinativas mais avançadas, provavelmente porque estas substâncias passam necessariamente pelas células de Sertoli antes de atingirem as células espermatogênicas, além disso as células que ficaram no ambiente basal. Em nosso estudo, o tempo de tratamento não foi suficiente para observar mudanças nas linhagens celulares mais avançadas da espermatogênese.

Em relação aos marcadores de estresse oxidativo, utilizamos diversas enzimas e produtos em virtude de se obter uma avaliação mais ampla e completa dos danos causados pelo glifosato na reprodução do morcego *Artibeus lituratus* gerados por estresse oxidativo celular. As formulações de glifosato contêm tenso ativos, que podem aumentar sua cinética de passagem intracelular provavelmente pelo mecanismo resultante das interações entre membrana celular e surfactante, causando rápida penetração (Gehin et al. 2006). Os íons Ca^{2+} são considerados uns dos maiores estimulantes de espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondriais (Cavalli et al. 2013). Estes autores observaram que, em células de Sertoli expostas a 36 ppm de Roundup® durante 30 minutos, tanto o influxo da enzima lactato desidrogenase (LDH) quanto a liberação de Ca^{2+} foram

aumentados. O Ca^{2+} provocou sobrecarga, desequilíbrio redox, perturbações das vias de sinalização celular e morte celular nos testículos de ratos.

Neste estudo, foram observadas alterações nas enzimas antioxidantes, com aumento das atividades de SOD e CAT em morcegos tratados em relação ao controle. O aumento da atividade destas enzimas pode ter ocorrido devido ao aumento das EROs geradas por metabólitos do Roundup® na corrente sanguínea, atingindo as células dos testículos. Nesta hipótese, contesta a uma possível injúria celular, a SOD e CAT, como mecanismo de defesa, aumentam sua atividade para reestabelecer as condições homeostáticas ideais para as células. A SOD ataca o radical superóxido (O_2^-) gerando então, peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em seguida, a CAT atua sobre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que reduz a moléculas de $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ que já podem ser eliminadas sem causar danos (Turner e Lyslak 2008).

Corroborando os achados da literatura sobre os efeitos da exposição ao glifosato no sistema de defesa antioxidante (Shivakumar et al. 1991), os nossos resultados mostraram que a atividade da CAT e SOD foram aumentadas em animais tratados, indicando possível dano oxidativo celular.

Além disso, quando a primeira linha de defesa do corpo é insuficiente, então as EROs podem ainda causar lesões, ao atingir as proteínas e outras classe de moléculas, em função da oxidação. Esta adição gera uma disfunção na proteína, e como elas não podem reparar-se, permanecem inativas e o corpo as degrada ou as acumula (Pryor et al. 2006). Em nosso trabalho, observamos um aumento da proteína carbonilada em relação ao controle, indicando esta ineficiência das enzimas antioxidantes no combate às EROS. Adicionalmente, observamos também uma queda na quantidade de proteína total contida no testículo de animais tratados com glifosato, em comparação ao grupo controle. Outros autores observaram diminuição da proteína total em testículo, por dano causado por berílio. Os autores reportaram que a diminuição do conteúdo de glicogênio e proteínas totais corresponde à inibição da espermatogênese e supressão da função das células de Leydig. A maturação do esperma e as funções da célula de Leydig são suprimidos por falta de carboidratos. A diminuição de proteínas é conhecida por causar uma diminuição da produção de andrógenos nos testículos de ratos adultos e pode ser um dos fatores na inibição da esteroidegênese (Mathur et al. 1998). A diminuição nas proteínas totais em nosso estudo, podem acontecer por um desequilíbrio referido antes, ocasionado pela circulação do Roundup® na

corrente sanguínea. As EROs são moléculas altamente reativas e podem causar danos tanto às proteínas quanto ao DNA (Zhu et al. 2012).

6 CONCLUSÃO

Após da avaliação dos efeitos da exposição a doses recomendadas pelo fabricante da formulação comercial de glifosato Roundup® em morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* por 3 dias, verificou-se presença de alterações nas medições morfológicas e morfométricas do testículo, como aumento do lúmen, o aumento da porcentagem de célula de Leydig, a diminuição do número de espermatogônia, espermatócito em fase de preleptóteno/leptóteno e célula de Sertoli. Os indicadores de estresse oxidativo também sofreram alterações em resposta ao Roundup®, como o aumento das atividades das enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), também da concentração de proteínas carboniladas e quantidade da proteína total. Desta forma, concluímos que mesmo uma exposição de curto-prazo a este herbicida Roundup® à base de glifosato foi suficiente para induzir diversas alterações celulares nos testículos de morcegos frugívoros, que, a longo prazo, poderiam prejudicar a reprodução e, portanto, a manutenção das populações silvestres desta espécie de importante valor ecológico. Estudos mais abrangentes, incluindo a exposição crônica ao pesticida, mais fiéis à realidade enfrentada pelos animais na natureza (exposição contínua por todo o período de vida do animal) são necessários para uma melhor avaliação dos efeitos deste herbicida em espécies silvestres não-alvo.

REFERÊNCIAS

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymology*. 105: 121.

Amann R.P.; Almquist J.O. 1970. Reproductive capacity of dairy bulls.VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J. Dairy Sci.* 45: 774–781. 1962. Amann RP. Sperm production rates. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandermark NL, editors. *The testis*. New York: Academic Press. 433-482.

Avilez I.M; Hori T.S.F.; Almeida L.C.; Hackbarth A.; Bastos N.J.C.; Bastos V.L.F.C.; Moraes G. 2008. Effects of phenol in antioxidant metabolism in 23 matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 148: 136 - 142.

Benachour, N.; Séralini, G.E.A. 2009. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chemical research in toxicology*. 22:97–105.

Berndtson W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Anim. Sci.* 44: 818–883.

Bredt 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.; Büerer S.P.; Porto V.A.R.; Uieda W. 1996. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. Brasília: Fundação Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde. 117.

Cavalli V. L. O.; Cattani D.; Elise C.; Pierozan P.; Zanatta L.; Benedetti E.; Wilhwlm D.; Mena F. R.; Pessoa-Pureur R. Zamoner A. 2013. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radical Biology and Medicine* 65: 335 – 346.

Charles-Dominique P. 1986. Inter-relations between frugivorous vertebrates and pioneer plants: *Cecropia*, birds and bats in French Guiana. In: Estrada A. e Fleming T.H. (Eds.), *Frugivores and seed dispersal*. W. Junk Publishers, Dordrecht. 119-136.

Clair, E.; Mesnage, R.; Travert, C.; Séralini G.E.A. 2012. Glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis immature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicol. In Vitro* 26: 269–279.

De Amarante J.O.P.; Santos T. C. 2002. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Rua Prof. Francisco Degni, s/n, 14800-900 Araraquara – SP. *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 4: 589-593.

Dieterich S.; Bieligk U.; Beulich K.; Hasenfuss G.; Prestle J. 2007. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*. 101: 33-9.

Doliner LH. 1991. Emploi avant récolte du glyphosate (RoundupMD), Document de travail, Agriculture Canada, Direction des pesticides. 107.

Driesch V.; Roy G. Bellows J.R. Thomas S. 1996. *Biological Control*. New York, Ed. Champman e Hall. 539.

Eisenberg J.F.; Redford K.H. 1999. *Mammals of the Neotropics: The Central Neotropics*. Chicago: The University of Chicago Press. Vol 3.

França L.R. 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Belo Horizonte: UFMG, ICB. 180. (Tese, Doutorado).

França, L.R.; Garcia, H.C. 2005. Célula de Sertoli. Em: Carvalho, H. F.; Buzato, B. C. *Células*. Editora Manole, Barueri-SP. cap. 24: 302-325.

- França L.R. Russel L.D. 1998. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia F. Regadera J. (Eds.), *Male Reproduction: A Multi-disciplinary Overview*. Churchill Livingstone, Madrid. 197–219.
- Galindo-González J. 1998. Dispersión de semillas por murciélagos: su importancia en la conservación y regeneración del bosque tropical. *Acta Zoológica Mexicana*. 73:57-74.
- Gehin, A.; Guyon, C.; Nicod, L. 2006. Glyphosate-induced antioxidant balance in Ha CaT: the protective effect of vitamins C and E. *Environ.Toxicol.Pharmacol*. 22:27–34.
- Gong Y.; Wu J.; Huang Y.; Shen S.; Han X. 2009. Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress. *Toxicol. Lett*. 186:84–95.
- Habig W. H.; Pabst M. J.; Jakoby W.B. 1974. Glutathione S- Transferases: The First Enzymatic Step In: Mercapturic Acid Formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 249. 22: 7130-7139.
- Hales D. B. 2002. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J. Reprod. Immunol*. 57: 3–18.
- Johnson L.; Varner D.D.; Roberts M.E.; Smith T.L.; Keillor G.E.; Scrutch-field W.L. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim. Reprod. Sci*. 60–61: 471–480.
- Junqueira L.; Carneiro J. 2004. *Histología básica*. Editora Guanabara Koogan S.A. (10° Ed).
- Kerr, J. B.; Loveland K.L.; O'Bryan M.K.; de Kretser D.M. 2006. Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. In: NEILL, J. D. et al. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3. Ed. New York: Elsevier.
- Levine R. L.; Garland D.; Oliver C. N.; Amici A.; Climent I.; Lenz A. G.; Ahn B.W.; Shaltiel S.; Stadtman E. R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 186:464–478.
- Lowry O.H.; Rosenbrough A.; Farr L.; Randall R.J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193:265–267.
- Mathur, P.; Shrivastava, S.; Mathur, A.; Mathur, S. 1998. BERYLLIUM INDUCED ALTERATIONS IN MALE REPRODUCTIVE ORGANS OF MICE. *Heavy Metal Pollution, Toxication and Chelation*.Cap. 10. 239.
- Medellin R. A.; Gaona O. 1999. Seed dispersal bats and birds in forests and disturbed habitats of Chiapas, Mexico. *Biotropical*. 31:478-485.
- Meistrich, M.; Hughes, T.; Bruce, W. 1975. Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by estrogen and testosterone. *Nature*.258: 145–147.

- Passos F.C.; Graciolli G. 2004. Observação da dieta de *Artibeus lituratus* (Olfers) (Chiroptera, Phyllostomidae) em duas áreas do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 21: 487 - 489.
- Pengyuan Dail; Ping Hul; Juan Tang; Yansen Li; Chunmei Li. 2016. Effect of Glyphosate on Reproductive Organs in Male Rat. *Acta Histochem* 118, 5: 519-526.
- Peres F. 2003. Os desafios da construção de uma abordagem metodológica de diagnóstico rápido da percepção de risco no trabalho. 251-282. In F Peres e JC Moreira (orgs.). *É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Pryor W.A.; Houk K.N.; Foote C.S.; Fukuto J.M.; Ignarro L.J.; Squadrito G.L.; Davies K.J.A. 2006. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 291: 491–511.
- Rocha M.E.M.; Dutra F.; Bandy B.; Baldini R.L.; Gomes S.L.; Faljoni-Alario A. 2003. Oxidative damage to ferritin by 5-aminolevulinic acid. *Archive Biochemistry and Biophysics*. 409:349–65.
- Romano R.M.; Romano M.A.; Bernardi M.M.; Oliveira C.A.; Furtado P.V. 2010. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Arch.Toxicol*. 84:309–317.
- Romano R.M.; Romano M.A; Moura M. O.; Oliveira C. A. A. 2008. Exposição ao glifosato-Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 45: 481-487.
- Romano M.; Romano R.; Santos L.; Wisniewski P.; Campos D.; de Souza P.; Viau P.; Bernardi M.; Nunes M.; de Oliveira C. 2012. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Arch Toxicol*. 86: 663-673.
- Ross M.H.; Kaye G.I.; Pawlina W. 2003. *Histology: A text and atlas*. 4Ed. 21: 682-724.
- Russell L.D.; Ettlín R.A.; Sinha-Hikim A.P.; Clegg E.D. 1990. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press, Clearwater.
- Russell L.D.; Griswold, M. D. 1993. The Sertoli cell. Ed 1. 801.
- Sanin L.H.; Carrasquilla G.; Solomon K.R.; Cole D.C.; Marshall E.J. 2009. Regional differences in time to pregnancy among fertile women from five Colombian regions with different use of glyphosate. *J Toxicol. Environ Health A*. 72: 949-960.
- Setchell BP. 1991. Male reproductive organs and semen. In: Cupps PT. *Reproduction in Domestic Animals*. 4 th Ed. San Diego: Academic Press, Inc., cap. 6: 221-250.
- Shivakumar B. R.; Anandatheerthavarada H. K.; Ravindranath V. 1990. Free radical scavenging systems in developing rat brain. *Int J Dev Neuroscience*, 9. 2: 181.
- Singh P.B.; Singh V.; Nayak P.K. 2008. Pesticide residues and reproductive dysfunction in different vertebrates from north India. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 2533-2539.

- Timm R.M. 1994. Ecology and natural history of a Neotropical rain forest. Chicago, University of Chicago Press. The Mammal Fauna. 229 - 237.
- Turner T.; Lysiak J. 2008. Oxidative Stress: A Common Factor in Testicular Dysfunction. Journal of Andrology, Vol. 29, No. 5.
- Vernet P.; Aitken R.J.; Drevet J.R. 2004. Antioxidant strategies in the epididymis. Mol. Cell. Endocrinol. 216: 31–39.
- Vizotto L.D.; Taddei V.A. 1973. 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. 1: 1-72.
- Wallin B.; Rosengren B.; Shertzer H.G.; Cameyo G. 1993. Lipoprotein oxidation and measurement of TBARS formation in a single microlitre peate; its use for evaluation of antioxidants. Anal. Biochem. 208: 10 – 15.
- Whittaker R.J.; Jones S.H. 1994. The role of frugivorous bats and birds in the rebuilding of a tropical forest ecosystem. Krakatau, Indonesia. Journal of Biogeography. 21:245-258.
- Williams G.M.; Kroes R.; Munco C. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate for humans, Regulatory Toxicology and Pharmacology. 31:17-65.
- Zhu R.; Wang Y.; Zhang L.; Guo Q. 2012. Oxidative stress and liver disease. Hepatology Research 42: 741-749.