

MARIO JOSE DE OLIVEIRA NETO

HISTOMORFOMETRIA DO EPIDÍDIMO DE MORCEGOS FRUGÍVOROS (*Artibeus
lituratus* OLFERS, 1818) TRATADOS COM FUNGICIDAS MANCOZEB E
TEBUCONAZOL

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

2015

MARIO JOSE DE OLIVEIRA NETO


HISTOMORFOMETRIA DO EPIDÍDIMO DE MORCEGOS FRUGÍVOROS (*Artibeus lituratus* OLFERS, 1818) TRATADOS COM FUNGICIDAS MANCOZEB E
TEBUCONAZOL

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: 23 de Fevereiro de 2015



Sérgio Luis Pinto Da Matta



Ita de Oliveira e Silva



Mariana Machado Neves
(Orientadora)

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

T

O48h
2015
Oliveira Neto, Mario Jose de, 19-
Histomorfometria do epididimo de morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus* Olfers, 1818) tratados com fungicidas Mancozeb e Tebuconazol / Mario Jose de Oliveira Neto. – Viçosa, MG, 2015.
xi, 37f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Mariana Machado Neves.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Morcegos. 2. *Artibeus lituratus*. 3. Histologia.
4. Produtos químicos agrícolas . I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 599.45

“Aquele que habita no abrigo do Altíssimo e descansa à sombra do Todo-poderoso pode dizer ao Senhor: Tu és o meu refúgio e a minha fortaleza, o meu Deus, em quem confio.

Ele o livrará do laço do caçador e do veneno mortal.

Ele o cobrirá com as suas penas, e sob as suas asas você encontrará refúgio; a fidelidade dele será o seu escudo protetor.

Você não temerá o pavor da noite, nem a flecha que voa de dia, nem a peste que se move sorrateira nas trevas, nem a praga que devasta ao meio-dia.

Mil poderão cair ao seu lado, dez mil à sua direita, mas nada o atingirá.

Você simplesmente olhará, e verá o castigo dos ímpios.

Se você fizer do Altíssimo o seu refúgio, nenhum mal o atingirá, desgraça alguma chegará à sua tenda.

Porque a seus anjos ele dará ordens a seu respeito, para que o protejam em todos os seus caminhos;

com as mãos eles o segurarão, para que você não tropece em alguma pedra.

Você pisará o leão e a cobra; pisoteará o leão forte e a serpente.

"Porque ele me ama, eu o resgatarei; eu o protegerei, pois conhece o meu nome.

Ele clamará a mim, e eu lhe darei resposta, e na adversidade estarei com ele; vou livrá-lo e cobri-lo de honra.

Vida longa eu lhe darei, e lhe mostrarei a minha salvação. "

*Dedico à minha mãe Vera, e minha namorada
Ana Lidia que não mediram forças para eu superar tudo.*

AGRADECIMENTOS

“Tudo posso Naquele que me fortalece...”, por isso eu O agradeço.

À minha mãe Vera, pelo exemplo de amor, de caráter, persistência, por sua amizade, por seus conselhos. Você é uma grande prova do amor de Deus por mim. Eu lhe agradeço pelos ensinamentos de vida, e de vida cristã, por tudo de bom que sou e que possa ser ainda.

À minha namorada Ana Lidia pelo apoio, vivências, amor e sempre me apoiar nesses dois anos de luta, e nesses quase cinco anos de amor.

À minha tia Maria Auxiliadora, pelo exemplo de amor, de trabalho, competência e por acreditar sempre em mim.

Aos meus “tios” e “tias”, primos e primas, um muito obrigado vocês são meus edificadores, muitas vezes meus irmãos, avós, e segundos pais.

À superiora Ir. Olga da congregação das irmãs Marcelinas, pela bolsa de estudos que me deu uma formação íntegra e numa instituição que preza pelos valores cristãos e pelo ensinamento da sabedoria divina acima da sabedoria humana.

À orientadora e amiga conselheira Prof. Mariana Machado Neves.

Ao Prof. Sérgio Pinto Da Matta, pelo exemplo de pessoa e de professor, por ser amigo, por me aconselhar sempre acreditando na minha capacidade.

Ao Prof. Lino, pelo exemplo de pessoa e de professor, por ser amigo, por me aconselhar sempre e me ensinar algumas coisas de fotografia e adobe.

À Profa. Mariella que confiou, acreditou se dedicou e apostou em mim.

Ao Professor Jorge Dergan pelas risadas e apoio técnico em seu grandioso Beagle.

Às minha queridas amigas Diane, Mariana Morais e Jerusa, um agradecimento muito especial pelo auxílio na condução do experimento e gentileza em sempre estarem dispostas a ajudar.

Às colegas de orientação Graziela, Tatiana, e Ana Cláudia, Stephanie, Susana e Marcela pela ajuda com conhecimentos e com a amizade. Obrigada pela paciência e dedicação. Vocês foram importantes para que esse trabalho se concretizasse.

À todos os colegas do mestrado em Biologia Celular, por compartilharmos conhecimentos e apuros, por ajudar a vencer as disciplinas, e os campos de grama sintética agradeço a todos, Marcelo, Kenner, Wágner Gonzaga, Marcos, André, Esteferson, as colegas de disciplina e cafezinho Déia, Jamile, Carol, Raquel, Nadja, Priscila, André, Ana Flávia, Eduardo, Edson, Daniel, Wendell, Camila, Fernanda, Felipe, Davilson, Judson, Roberta, Thaís um obrigado pela paciência e compreensão.

Aos professores do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, Sérgio, Izabel, Adilson, Mariana e Juliana pela colaboração na análise do material histológico, no entendimento do material analisado, no uso de equipamentos e materiais e pelo exemplo.

Aos professores do Departamento de Biologia celular e estrutural da UFV, pelos ensinamentos e lições durante o curso, aos professores Gustavo, Serrão, Mara, Lino, Demilse, Clóvis, Rita Márcia, Izabel e Sérgio Da Matta, obrigado pelas maravilhosas disciplinas.

Aos amigos das secretarias do Departamento de Biologia Celular, Beth e Gustavo, pelo sempre pronto atendimento e disponibilização em resolver os problemas. Obrigada por me ajudarem sempre que precisei.

Aos amigos da companhia de teatro Fran, Victor Hugo, Elmo, Teresa, Wendell, Rodney, Ana Clara, Amanda, em especial ao grande amigo e diretor Wagner Rober.

À Universidade Federal de Viçosa por ser minha “casa”, meu refúgio e fonte de muitos dos meus conhecimentos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de pesquisa para a realização deste mestrado.

À FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo aporte financeiro na aquisição de drogas e reagentes e pelo financiamento aos congressos.

Aos animais utilizados neste estudo. Agradeço ainda, a todos que convivi nestes últimos dois anos e que contribuíram para minha formação. Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Tebuconazol.....	3
2.2. Mancozeb.....	4
2.3. Morcegos	5
2.4. Epidídimo.....	7
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
ARTIGO	18
Histomorfometria epididimária de morcegos da fruta <i>Artibeus lituratus</i> expostos aos fungicidas mancozeb e tebuconazol.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1. Fungicidas	19
2.2. Animais e tratamentos	19
2.3. Fixação e eutanásia	20
2.4. Processamento Histológico do Epidídimo.....	21
2.5. Morfologia das regiões epididimárias.....	21
2.6. Morfometria e volumetria do epidídimo.....	21
2.7. Análise Estatística.....	22
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
3.1 Alterações Histológicas.....	22
3.2 Alterações Histomorfométricas.....	28
3.2.1 Cabeça.....	27
3.2.2 Corpo.....	29
3.2.3 Cauda.....	30
4. CONCLUSÕES.....	32
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37

RESUMO

OLIVEIRA NETO, Mario Jose de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Histomorfometria do epidídimo de morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus* Olfers, 1818) tratados com fungicidas mancozeb e tebuconazol.** Orientador: Mariana Machado Neves.

Mancozeb e o Tebuconazol são fungicidas utilizados em lavouras brasileiras, principalmente em fruticulturas e culturas de cereais. Sabe-se que morcegos que se alimentaram de frutos contaminados com estes fungicidas apresentaram alterações metabólicas e hepáticas. Não há relatos sobre seu efeito no epidídimo, importante órgão reprodutivo responsável na maturação e na estocagem de espermatozoides. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do mancozeb e do tebuconazol sobre parâmetros histomorfométricos epididimários. Foram utilizados morcegos da espécie *Artibeus lituratus* (n=25) divididos em cinco grupos (G=5/grupo). Animais do grupo G1 (controle 1) foram alimentados com mamão sem mancozeb ou espalhante, enquanto que animais do G2 se alimentaram de mamão com espalhante adesivo (1 mL/L; controle 2) e do G3 receberam mamão com calda de espalhante adesivo (1mL/L) e mancozeb (2 g/L) durante 7 dias. Já o grupo 4 recebeu por 7 dias tebuconazol (1 mL/L), com espalhante adesivo, e o grupo 5 tebuconazol (1 mL/L) por 30 dias mais o espalhante. Os epidídimos foram obtidos após eutanásia (CEUA 106/2014) dos animais, sendo os epidídimos fixados inteiros em solução de Karnovsky e incluídos em resina. Imagens microscópicas de 10 cortes histológicos de cada região epididimária, cabeça, corpo e cauda (aumento de 200X), foram analisadas no software Image Pro Plus 4.5, mensurando-se altura de epitélio (μm) e diâmetros luminal (DL) e tubular (DT) (μm). A proporção volumétrica (%) de epitélio, lúmen e interstício foi avaliada através da contagem de 266 pontos sobre 10 cortes histológicos/região em aumento de 200X. Os resultados foram submetidos a ANOVA, sendo as médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5%. Os resultados obtidos mostraram que houve um aumento no percentual de epitélio da região da cabeça epididimária nos animais do G3 ($61,14 \pm 3,05$) e G4 ($58,85 \pm 3,25$) em relação aos animais de G1 ($52,0 \pm 3,37$) e G2 ($51,2 \pm 2,51$). O percentual de interstício, na mesma região, foi menor em G3 ($28,10 \pm 3,86$) e G4 ($29,61 \pm 3,08$) que em G1 ($36,0 \pm 1,21$) e G2 ($36,77 \pm 1,66$). Foi observado aumento no DT ($139,83 \pm 9,42 \mu\text{m}$) e no DL em G4 ($63,23 \pm 4,20 \mu\text{m}$) em relação aos demais grupos. A região do corpo apresentou um aumento no diâmetro tubular médio em animais do G3 ($148,75 \pm 9,65 \mu\text{m}$), G4 ($147,90 \pm 13,0 \mu\text{m}$) e G5 ($145,18 \pm 9,29 \mu\text{m}$) em relação aos animais do G1 ($125,53 \pm 10,05 \mu\text{m}$), e um aumento no percentual médio de interstício em G2 ($40,00 \pm 4,57$), quando comparado com G1 ($31,70 \pm 4,56$) e G3 ($28,09 \pm 6,77$). Não foram observadas alterações histomorfométricas na região epididimária da cauda nos animais avaliados em relação ao

mancozeb ($P > 0,05$). Houve aumento no DT ($206,05 \pm 22,77 \mu\text{m}$) em G4 na região da cauda em relação aos demais grupos, exceto o G3. O aumento no percentual de epitélio pode ter contribuído para a redução do percentual de interstício em animais tratados com mancozeb e tebuconazol, quando analisada a região da cabeça. Sabe-se que o mancozeb e o tebuconazol alteram o metabolismo de andrógenos, reduzindo sua produção de andrógenos, que afeta a funcionalidade das células epiteliais epididimárias. Pode concluir que morcegos expostos ao mancozeb por 7 dias e ao tebuconazol por 7 e 30 dias apresentaram alterações histomorfométricas nas regiões epididimárias da cabeça, corpo e cauda.

ABSTRACT

OLIVEIRA NETO, Mario Jose de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Histomorphometry evaluation of the epididymis of fruit-eating bats (*Artibeus lituratus* Olfers, 1818) treated with fungicides mancozeb and tebuconazole.** Adviser: Mariana Machado Neves.

Mancozeb and Tebuconazole are fungicides used in Brazilian crops, especially in fruit growing and cereal crops. We know that bats feeding on fruits contaminated with these fungicides showed metabolic and liver changes. There are no reports about its effect in the epididymis, important reproductive organ responsible for the maturation and sperm storage. The aim of this study was to evaluate the effects of mancozeb and tebuconazole on epididymal morphometric parameters. From bats were used *Artibeus lituratus* species (n = 25) divided into five groups (G = 5 / group). Animals in the G1 (control 1) were fed papaya without mancozeb or spreader, while G2 animals fed on papaya with adhesive spreader (1 mL / L; control 2) and G3 received papaya with adhesive spreader syrup (1mL / L) and mancozeb (2 g / l) for 7 days, group 4 received tebuconazole for 7 days (1 mL / L), with spreader-sticker, and 5 tebuconazole group (1 ml / l) for 30 days plus the spreader . The epididymides were obtained after euthanasia (CEUA 106/2014) of the animals on the eighth day of experiment, they set whole being in Karnovsky solution and embedded in resin. Microscopic images of 10 histological cuts of each epididymal region, caput, corpus and cauda (increase of 200X) were analyzed in the software Image Pro Plus 4.5, epithelial height is measuring them (microns) and diameters, and tubular lumen (microns). The volumetric ratio (%) of epithelium, interstitium and lumen was assessed by counting 266 points 10 on histological / region 200X magnification. The results were submitted to ANOVA and the averages were compared by the test Student-Newman-Keuls 5%. The results showed that there was an increase in the epithelium of the percentage of the epididymal caput region in G3 animals (61.14 ± 3.05) and G4 (58.85 ± 3.25) compared to G1 animals ($52, 0 \pm 3.37$) and G2 (51.2 ± 2.51). The percentage of interstitial, in the same region, was lower in G3 (28.10 ± 3.86) and G4 (29.61 ± 3.08) than in G1 (36.0 ± 1.21) and G2 ($36, 77 \pm 1.66$). There was an increase in DT in G4 ($139.83 \pm 9.42 \mu\text{m}$), and increased DL in G4 ($63.23 \pm 4.20 \mu\text{m}$) compared to the other groups. The corpus region experienced an increase in average diameter tubular in G3 animals ($148.75 \pm 9.65 \mu\text{m}$), G4 ($147.90 \pm 13.0 \mu\text{m}$) and G5 ($145.18 \pm 9.29 \mu\text{m}$) compared to animals G1 ($125.53 \pm 10.05 \mu\text{m}$) and an increase in average interstitial percentage of G2 (40.0 ± 4.57) when compared to G1 (31.70 ± 4.56) and G3 ($28, 09 \pm 6.77$). Histomorphometric changes were observed in the epididymal region of the cauda in animals evaluated for mancozeb ($P > 0.05$). There was an increase in DT (206.05 ± 22.77) in G4 in the

cauda region compared to the other groups except the G3. The increase in the percentage of epithelium may have contributed to the reduction of interstitial percentage in animals treated with mancozeb and tebuconazole, when analyzed to the caput. It is known that tebuconazole and mancozeb alter androgen metabolism, reducing the production of androgens, which affect the functionality of epididymal epithelial cells. Can conclude that bats exposed to mancozeb for 7 days and tebuconazole for 7 and 30 days have histomorphometric changes in epididymal the caput, corpus and cauda.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso indiscriminado de pesticidas tem causado um impacto significativo na biodiversidade animal. Um número considerável de espécies já teve sua capacidade reprodutiva alterada pelos desreguladores endócrinos, dos quais muitos agrotóxicos fazem parte. O efeito dessa classe de poluentes na reprodução se manifesta já nos recém-nascidos, reduzindo as concentrações plasmáticas de andrógenos, alterando a espermatogênese, o desenvolvimento do pênis e o comportamento sexual (Oberdörster e Cheek, 2001; IPCS, 2002; Jobling *et al.*, 2006; Milnes *et al.*, 2006; Guillette e Edwards, 2008). Outros efeitos dos desreguladores endócrinos se manifestam na determinação sexual, na diferenciação das gônadas e na maturação sexual (Stoker *et al.*, 2003; Crain *et al.*, 2007; Orlando e Guillette, 2007; Stoker *et al.*, 2008; Hass *et al.*, 2012).

Foram encontrados poucos trabalhos que avaliaram o efeito de pesticidas em animais silvestres, especificamente sobre a mastofauna brasileira. Sabe-se que os pesticidas desreguladores endócrinos e desreguladores derivados de outras classes de poluentes são bioacumulados ao longo da cadeia alimentar causando sérios danos aos sistemas endócrino, reprodutor e imune (Berny, 2007). Estudos avaliaram o efeito de fungicidas sobre o metabolismo energético e sistemas antioxidantes em quirópteros (Machado, 2010; Carvalho, 2010). O efeito tóxico sobre a espermatogênese foi mostrado quando os morcegos-da-fruta foram expostos por 30 dias ao tebuconazol (Miranda, 2012). Morcegos-da-fruta desempenham serviços ecológicos essenciais para a manutenção e regeneração de biomas ameaçados como a mata atlântica, como a dispersão de sementes, pólen, e efeitos lesivos na sua reprodução geraria impactos graves sobre esse bioma.

Contudo, pouco se conhece a respeito do efeito dos fungicidas sobre o epidídimo de morcegos, um órgão andrógeno dependente responsável por modificar e atuar na maturação e estocagem dos espermatozoides por longos períodos. Nenhum trabalho foi encontrado com relação a análises de fungicidas no epidídimo de morcegos, e pouco se sabe como esse órgão pode ser afetado quando exposto a pesticidas.

Formulou-se a hipótese de que morcegos frugívoros expostos aos fungicidas mancozeb e tebuconazol apresentam alterações na histomorfometria das regiões epididimárias. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da exposição aguda aos fungicidas mancozeb e tebuconazol e crônica pelo tebuconazol sobre a histomorfometria epididimária em morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Desreguladores endócrinos são componentes químicos exógenos com capacidade de alterar o funcionamento do sistema endócrino, que afetam toda a vida selvagem e também os seres humanos. Vários estudos *in vivo* e *in vitro* comprovaram que defensivos agrícolas, também chamados pesticidas, são potentes desreguladores endócrinos, principalmente quando usados indiscriminadamente nas lavouras. Nestes casos, eles acabam contaminando o solo, a água e o ar, o que traz riscos para os trabalhadores rurais, nos quais os pesticidas podem se bioacumular (Jaga e Dharmani, 2003; Sanghi *et al.*, 2003; Zietz *et al.*, 2008; Abhilash e Singh, 2009; Arrebola *et al.*, 2012). Apesar dos seus efeitos tóxicos, os pesticidas apresentam misturas de componentes químicos, sintéticos ou naturais, capazes de repelir ou combater pragas agrícolas, e há mais de meio século são usados como a principal forma de manter e expandir a produção de alimentos (Alves-Filho 2002).

A atividade mimetizadora ou bloqueadora de estrógeno dos desreguladores endócrinos vem sendo amplamente investigada. Análises *in vivo* comprovaram esta capacidade dos pesticidas DDT (diclorodifeniltricloroetano), metoxiclor, clordecona (Kepone) e, posteriormente, vários ensaios *in vitro* comprovaram a interferência do endossulfam, toxafeno, dieldrin, metiocarbe, procloraz, fenarimol e triadimefon nos receptores de estrógenos (Soto *et al.*, 1994; Jorgensen *et al.*, 1997; Raun Andersen *et al.*, 2002; Grünfeld e Bonefeld-Jorgensen, 2004; Bonefeld-Jorgensen *et al.*, 2005).

Os estrógenos são hormônios sexuais de grande importância para o aparelho reprodutor. Eles atuam em ambos os sexos durante o desenvolvimento fetal e são essenciais para o crescimento, diferenciação e função não só de órgãos sexuais, como também do sistema nervoso central, cardiovascular, locomotor e imunológico. Os desreguladores endócrinos, através do seu efeito estrogênico, afetam a fertilidade promovendo anomalias fetais e acarretam o desenvolvimento de câncer em glândulas endócrinas (Arnold *et al.*, 1996; Mueller, 2004; Sikka e Wang, 2008; Bonefeld-Jorgensen *et al.*, 2011; Kjeldsen e Bonefeld-Jorgensen, 2013).

Estudos mostraram o efeito dos pesticidas desreguladores endócrinos sobre o aparelho reprodutor masculino e comprovaram a ação antiandrogênica dos desreguladores endócrinos, a partir do momento em que eles afetam receptores de andrógenos (AR) e modificam todas as rotas de sinalização hormonal. Os AR's regulam a expressão de genes que

determinam a diferenciação sexual masculina ainda no período de desenvolvimento sexual na fase fetal e o desenvolvimento e a atividade espermatogênica no aparelho reprodutor masculino. O comprometimento dessa sinalização pode levar ao desenvolvimento de câncer testicular, anormalidades na genitália, redução da qualidade do sêmen e, por conseguinte, subfertilidade (Toppari *et al.*, 1996; Raun Andersen *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2005; Dehm e Tindall, 2007; Sharpe e Skakkebaek, 2008).

Outra propriedade de pesticidas, como o DDT, clordane e o dieldrin, é a sua bioacumulação, que afeta tanto os animais quanto o homem. Devido ao impacto desses agrotóxicos no ambiente, alguns pesticidas como os organoclorados foram banidos na maior parte do mundo, inclusive no Brasil, obrigando a adoção de novas classes de pesticidas como substitutos. Nessa nova classe de pesticidas encontram-se os fungicidas e os inseticidas da classe dos azóis e ditiocarbamatos, que são usados extensivamente em culturas pela sua atividade antimicótica (Kjeldsen e Bonfeld- Jorgensen, 2013).

O mecanismo geral de ação dos fungicidas como o tebuconazol e o mancozeb se baseia na inibição da enzima citocromo P450 dependente 14 α demetilase nos fungos, que atua na conversão do lanosterol em ergosterol, um esteroide essencial na fluidez de membrana dos fungos (Henry e Sisler, 1984). Esta inibição se deve à interação forte dos imidazóis pelo átomo de ferro, que é cofator da enzima. Entretanto, a ação inibidora é inespecífica e afeta também enzimas chave na biossíntese e metabolismo de esteroides, como o complexo CYP19 aromatase que converte a androstenediona a estrógeno e testosterona em estradiol (Laignelet *et al.*, 1989). A aromatase catalisa a conversão de esteroide com o grupo metil no carbono C19 em estrógenos, sendo encontrada no ovário, testículo, placenta, encéfalo, fígado, adipócitos, músculo e na mama (Simpson *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1999; Goss e Strasser, 2001; Simpson e Davis, 2001).

2.1 Tebuconazol

O tebuconazol [(RS)-1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmetil)pentan-3-ol] é classificado como um fungicida inibidor da demetilação de esteroides como o ergosterol, componente da membrana plasmática dos fungos. Por essa ação, ele é utilizado amplamente em todo o mundo nas culturas de nozes, uvas, verduras e cereais como agente protetor contra as pragas: oídio, manchas foliares, ferrugem e podridão de raiz (Lyr,

1995). No Brasil ele é utilizado nas culturas de arroz, cana-de-açúcar e uva (Jardim e Caldas, 2012).

O tebuconazol promove danos à vida aquática, devido a sua persistência no ambiente, afetando a reprodução e a fertilidade de peixes (Sancho *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2013). Apesar de sua baixa toxicidade aguda, foi constatado que o tebuconazol apresenta alta toxicidade quando administrado cronicamente em cachorros, levando a hipertrofia da glândula adrenal, além de apresentar ação teratogênica em camundongos (Robinson *et al.*, 2012; Menegola *et al.*, 2013). Outro estudo mostrou o efeito deletério do tebuconazol sobre o sistema nervoso de ratos Sprague-Dawley afetando o comportamento. Foram observados efeitos no sistema reprodutor, a cauda do epidídimo teve redução de 17% em seu peso, sendo maiores as alterações nos tratamentos com tebuconazol 6 mg/kg e 14 mg/kg, se comparadas ao tratamento de 60 mg/kg (Moser *et al.*, 2001).

Sabe-se que fungicidas da classe dos azois, como epoxiconazol, procloraz e tebuconazol, são capazes de aumentar o tempo de gestação, promover a virilização de fêmeas em desenvolvimento e afetar hormônios esteroides em fetos de ambos os sexos (Kjærstad *et al.*, 2007; Sancho *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2013).

2.2 Mancozeb

O mancozeb (manganês etilenobis(ditiocarbamate) (polimérico) complexado com sal de zinco) é um fungicida da classe dos etilenobisditiocarbamato (EBDC's), constituído de um polímero complexo de 20% de manganês e 2-5% de sais de zinco, utilizado na defesa contra uma variedade de doenças fúngicas foliares e que afetam as sementes. O mancozeb age como inibidor da ação do patógeno e forma uma barreira na superfície da planta, prevenindo a penetração do fungo no tecido vegetal (Gisi e Sierotzki, 2008). É geralmente instável em meio alcalino ou ácido e nos sistemas biológicos decompõem-se rapidamente em água e na presença de oxigênio (Jacobsen *et al.*, 2004).

O mancozeb teve seu efeito tóxico comprovado em roedores gerando malformação fetal, alterações na produção de esteroides no período gestacional, além de gerar virilização nas fêmeas (Menegola *et al.*, 2006; Hass *et al.*, 2012). O mancozeb é um desregulador da glândula tireoide e possivelmente atua na desregulação do desenvolvimento cerebral (Hurley 1998; Taxvig *et al.*, 2007).

Foi relatada a toxicidade dose dependente do mancozeb em tratamento oral onde foram administrados 500, 1000, e 1500 mg/kg por 30, 60, 180, e 360 dias em ratos, levando a morte e sinais graves de toxidez; afetando ainda o aparelho reprodutor. Foram observados processos de degeneração dos túbulos seminíferos, redução de espermatozoides no epidídimo, redução do peso do testículo e epidídimo, e ação deletéria sobre enzimas fosfatase ácida, fosfatase alcalina, succinato desidrogenase e lactato desidrogenase (Kackar *et al.*, 1996).

Estudos realizados com mancozeb em ratos Wistar e camundongos mostraram que o mancozeb induz alterações testiculares e epididimárias. Foram observadas redução do peso testicular e do epidídimo, alterações na arquitetura dos túbulos seminíferos, redução no número e diâmetro das células da linhagem espermatogênica e de Leydig, diminuição da motilidade e viabilidade espermática, inibição da espermatogênese e desorganização do tecido intersticial testicular (Kackar *et al.*, 1996; Ksheerasagar e Kaliwal, 2003; Sakr *et al.*, 2009; Kaliwal e Ksheerasagar, 2010). Além disso, alterações epididimárias foram observadas como danos às células principais do epitélio epididimário, presença de restos celulares no lúmen e decréscimo do número de espermatozoides na cauda do epidídimo para os grupos que receberam as maiores concentrações de mancozeb por mais tempo (1500 mg/kg/dia) (Kackar *et al.*, 1996).

Outro estudo mostrou que em ratos o peso do epidídimo é reduzido e a viabilidade dos espermatozoides da cauda do epidídimo também é afetada devido a distúrbios da tireoide, principal alvo do mancozeb. O estudo reportou que os espermatozoides apresentam gotas citoplasmáticas e são inférteis, possivelmente devido à inibição da ação das células claras em remover a gota citoplasmática do espermatozoide ao longo do ducto do epidídimo (Ivanova-Chemishanska *et al.*, 1971; Jiang *et al.*, 2000).

2.3 Morcegos

Sabe-se que morcegos apresentam características que os tornam bioindicadores, pois apresentam taxonomia bem estabelecida, fácil capacidade de monitoramento e acurácia na identificação das espécies, e finalmente distribuição cosmopolita de táxons que podem ser monitorados em diferentes países ao mesmo tempo. O fato de serem os únicos mamíferos voadores contribui para sua distribuição cosmopolita, exceto nos polos e ilhas oceânicas isoladas. A grande riqueza de hábitat, como folhagens, grutas, fendas de rochas, caules e ocos de árvores e estruturas feitas pelo homem, os seus padrões de comportamento e reprodução fazem

dos morcegos mamíferos fundamentais para o monitoramento de hábitat (Kunz e Pierson, 1994; Patterson *et al.*, 2003; Simmons e Conway, 2003; Reis *et al.*, 2007).

Devido aos diferentes padrões de alimentação os morcegos ocupam diferentes níveis tróficos. Com isso eles são sensíveis à acumulação de pesticidas o que tem levado ao declínio da sua população. Serviços ecológicos são realizados pelos morcegos como a polinização e a dispersão de sementes, além de controle de pragas agrícolas. Tais serviços são fundamentais para a regeneração de florestas. Contudo, as alterações climáticas como secas, inundações, deterioração da qualidade da água, expansão da fronteira agrícola, fragmentação de habitats, uso intenso e indiscriminado de pesticidas vêm declinando a população e despertando o interesse do monitoramento destes animais (Estrada *et al.*, 1993; Medellín *et al.*, 2000; , 2005; Clarke, *et al.*, 2005; Kunz *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2009; Boyles *et al.*, 2011).

O declínio da população de morcegos ocorreu em Missouri, nos Estados Unidos, onde se observou a diminuição de 95% da população de *Myotis sodalis*. Sabe-se que algumas espécies de morcegos apresentam baixos índices de reprodução e lenta reposição de sua população. Doenças como a síndrome de *white-nose* são a causa de extensa mortalidade e declínio populacional nos EUA (Bayat *et al.*, 2014). Constatou-se que os pesticidas constantemente são a causa da mortalidade de morcegos devido a alterações no sistema imune. O efeito tóxico dos pesticidas leva a susceptibilidade destes animais a ação de novos patógenos como o fungo causador da síndrome de *white-nose*, principalmente devido à ação sob os sistemas imunológico, endócrino e reprodutor, e ação direta sobre o desenvolvimento fetal gerando malformações (Bayat *et al.*, 2014).

Sabe-se que a sensibilidade de morcegos é maior se comparada aos roedores em relação a pesticidas (Luckens e Davis, 1964). Miranda (2012) avaliou o efeito do mancozeb e do tebuconazol sobre túbulos seminíferos em *Artibeus lituratus* e constatou baixa toxicidade de ambos sobre esse órgão. Entretanto, outros órgãos do sistema reprodutor como epidídimo e próstata apresentam dependência de andrógenos ou sensibilidade à estrógenos, sendo portanto considerados mais sensíveis à ação de fungicidas desreguladores endócrinos (Ksheerasagar e Kaliwal, 2003; Hess *et al.*, 2011; Jacobsen *et al.*, 2012).

2.4 Epidídimo

O epidídimo (do grego *epi*= acima, *didymoi*= testículo) é o órgão responsável pela maturação pós-testicular do espermatozoide, que apresenta progressiva motilidade e capacidade

fecundante. O órgão apresenta anatomicamente três regiões principais: cabeça, corpo e cauda. Essas três regiões apresentam diferentes perfis de expressão gênica, o que as tornam responsáveis pelas diferentes funções epididimárias referentes às diferentes fases de maturação dos espermatozoides (Belleannee *et al.*, 2012). As regiões da cabeça e corpo são responsáveis pela aquisição de motilidade e capacidade fertilizante, já a cauda propicia um ambiente luminal favorável ao armazenamento dos espermatozoides por longos períodos (Turner, 1995; Jones e Murdoch, 1996).

Durante a maturação o espermatozoide sofre modificações bioquímicas em sua membrana plasmática resultantes da interação com o microambiente epididimário e suas diferentes proteínas (Olson e Hinton, 1985; Veeramachaneni *et al.*, 1990; Dacheux *et al.*, 2003; Dacheux *et al.*, 2009). Sabe-se que o perfil de expressão gênica de cada região atua diretamente nessas etapas, porém os fatores que influenciam as alterações nesse perfil ainda não estão claros. Alguns estudos investigaram a importância dos fatores liberados no lúmen (*Lumicrine factors*), andrógeno e estrógenos, e mostraram uma influência do fluido testicular e de seus andrógenos nas regiões proximais do epidídimo (Robaire e Viger, 1995; Hinton *et al.*, 1997; Joseph *et al.*, 2011).

A composição do fluido epididimário é controlado pela secreção de até 6 tipos celulares dispostos em arranjo pseudo-estratificado no epitélio. As células apicais e estreitas são de ocorrência exclusiva da cabeça, e no caso exclusivo de roedores ocorrem também na região do segmento inicial que é localizada entre o ducto eferente e a região da cabeça. As células principais, basais, claras e halo podem ocorrer em todos os três segmentos do órgão (Belleannee *et al.*, 2012).

As células principais compõem até 80% do epitélio epididimário, em todas as regiões. A principal função destas células é sintetizar e secretar proteínas de forma apócrina ou merócrina. A secreção apócrina é realizada através de vesículas chamadas de epididimossomos, sendo a composição das proteínas e suas funções nestas vesículas já avaliadas e descritas (Sullivan *et al.*, 2007; Caballero *et al.*, 2010). Essas proteínas participam da aquisição da função de fertilização dos espermatozoides, atuam na motilidade, e na proteção dos gametas masculinos contra a ação de espécies reativas de oxigênio, e também na destruição de espermatozoides defeituosos (Sutovsky *et al.*, 2001; Montfort *et al.*, 2002; Frenette *et al.*, 2004; Vernet *et al.*, 2004). As células principais apresentam variações em seu formato de acordo com a região, e decrescem em altura no sentido cabeça-cauda. O seu perfil de transportadores e

canais de membrana de água (aquaporinas), bicarbonato, ATP e cloreto, também é variável o que gera a variação fisiológica de acordo com a região, sendo essa variação influenciada diretamente por andrógenos e estrógenos que regulam a expressão das aquaporinas (Herms *et al.*, 2005; Kujala *et al.*, 2007).

Os demais cinco tipos celulares ocorrem em menor proporção no órgão e apresentam funções variadas. As células claras são responsáveis pela acidificação do fluido, função importante na manutenção da quiescência dos espermatozoides até a ejaculação e são mais abundantes na cauda. Estas células também apresentam microvilos que atuam na endocitose de proteínas do fluido epididimário (Breton *et al.*, 1999; Shum *et al.*, 2009). As células basais apresentam aspecto piramidal, além de várias junções com as demais células do epitélio, que explicam as possíveis funções de monitoramento do fluido epididimário, a presença de enzimas antioxidantes também sugere ação protetora contra espécies reativas de oxigênio (Nonogaki *et al.*, 1992; Shum *et al.*, 2011). As células halo são mais abundantes na região da cabeça, e consistem em diferentes tipos de linfócitos ou macrófagos, porém a ação imunocompetente destas células ainda requer elucidação (Serre e Robaire, 1999).

As células do epitélio epididimário são intimamente unidas por junções de oclusão. Devido à presença de complexos juncionais e às diferenças de concentração entre as substâncias mantidas entre as células do epitélio e o sangue, foi cunhado o termo barreira hemato-epididimária. Estudos em roedores mostraram espaços entre as células desta barreira, no qual prolongamentos de células basais e de células dendríticas atravessam, onde as células dendríticas parecem fazer a interface entre o ambiente imunológico livre do lúmen rico em espermatozoides e as células do sistema imunológico (Hinton e Howards, 1981; Cyr *et al.*, 2007; Shum *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2011; Belleanne *et al.*, 2012).

Sabe-se que o microambiente da região da cabeça do epidídimo, é mais susceptível a alterações causadas por xenobióticos que afetam andrógenos, principalmente a DHT (diidrotestosterona) (Johnston *et al.* 2005, Jelinsky *et al.*, 2007). A redução da DHT promove alterações no aparato secretor do epitélio epididimário que podem ser medidas por métodos volumétricos e histomorfométricos (Garcia *et al.*, 2012).

Os principais genes do epidídimo e ducto eferente que tiveram seu perfil de expressão aumentado por ação de desreguladores endócrinos (Esr1 *knockout* e antiestrogênio ICI) foram os transportadores de Na⁺/H⁺, ânions e zinco (SLC9A3, SLC20A2, SLC30A2), anidrase carbônica (CAR 2), aquaporinas 1, 4 e 9, Citocromo P450 (CYP 4f4). Os genes que

reduziram a expressão pela ação desreguladora foram o regulador transmembrana de condução da fibrose cística CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), metalopeptidase de matriz (MMP7), domínio 7 de desintegrina metaloprotease (ADAM 7) e receptor de andrógeno (AR) (Hess *et al.*, 2011).

Xenobióticos também causam efeitos deletérios no epidídimo que podem ser analisados histopatologicamente como granulomas espermáticos, dilatação do lúmen tubular, degeneração hialina, epididimites, infiltrados inflamatórios, e destruição seletiva das células claras nas regiões proximais. As substâncias sintéticas mais usadas para comparação de efeito tóxico epididimário são o alfa clorodrin, metilcloride, e o etano dimetano sulfonato (Kluwe *et al.*, 1983; Toth *et al.*, 1989, Liu *et al.*, 1993).

Não foram encontrados estudos que avaliaram por métodos histológicos a ação de fungicidas sobre o epidídimo de morcegos. Sabe-se que a ação desreguladora endócrina dos fungicidas afeta órgãos andrógenos dependentes como o epidídimo. Entretanto, pouco se conhece a respeito de como essas substâncias afetam a reprodução de animais silvestres no Brasil e no mundo.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHILASH, P. C.; SINGH, N. Pesticide use and application: An Indian scenario. **Journal of Hazardous Materials**, v. 165, n. 1, p. 1-12, 2009.

ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos**. Annablume, 2002.

ARNOLD, S. F. et al. Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. **Science**, v. 272, n. 5267, p. 1489-1492, 1996.

ARREBOLA, J. P. et al. Concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum and adipose tissue from Bolivia. **Environmental Research**, v. 112, p. 40-47, 2012.

BAYAT, S. et al. Organic contaminants in bats: Trends and new issues. **Environment International**, v. 63, p. 40-52, 2014.

BELLEANNEE, C.; THIMON, V.; SULLIVAN, R. Region-specific gene expression in the epididymis. **Cell Tissue Research**, v. 349, n. 3, p. 717-31, Sep 2012. ISSN 1432-0878 (Electronic) 0302-766X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22427067>>. Acesso em: 01 de Fevereiro de 2015.

BENNETT, B. S.; THIES, M. L. Organochlorine pesticide residues in guano of Brazilian free-tailed bats, *Tadarida brasiliensis* Saint-Hilaire, from East Texas. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 78, n. 3, p. 191-194, 2007.

BERNY, P. Pesticides and the intoxication of wild animals. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, 2, p. 93-100, 2007.

BONEFELD-JORGENSEN, E. C.; GRÜNFELD, H. T.; GJERMANDSEN, I. M. Effect of pesticides on estrogen receptor transactivation in vitro: a comparison of stable transfected MVLN and transient transfected MCF-7 cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 244, n. 1, p. 20-30, 2005.

BONEFELD-JORGENSEN, E. C. et al. Perfluorinated compounds are related to breast cancer risk in Greenlandic Inuit: a case control study. **Environmental Health**, v. 10, n. 1, p. 88, 2011.

BOYLES, J. G. et al. Economic importance of bats in agriculture. **Science**, v. 332, n. 6025, p. 41-42, 2011.

BRETON, S. et al. Postnatal development of H⁺ ATPase (proton-pump)-rich cells in rat epididymis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 111, n. 2, p. 97-105, 1999.

CABALLERO, J.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, n. 1, p. 1-13. 2011.

CALDAS, E. D., MIRANDA, M. C. C., CONCEIÇÃO, M. H., DE SOUZA, L. C. K. R. Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risk for consumers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, 11, p. 1877-1883, 2004.

CARVALHO, T.F. **Alterações metabólicas induzidas pela exposição de agrotóxicos em morcegos frugívoros *Artibeus lituratus***. Monografia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 27 p., 2010.

CLARKE, F. M.; ROSTANT, L. V.; RACEY, P. A. Life after logging: post-logging recovery of a neotropical bat community. **Journal of Applied Ecology**, v. 42, n. 2, p. 409-420, 2005.

CRAIN, A., ERIKSEN, M., IGUSHI, T., JOBLING, S., LAUFER, H., LEBLANC, G.A., GUILLETTE, L.J. An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology. **Reproductive Toxicology**. v. 24, p. 225–239, 2007.

CYR, D. G. et al. Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. **Asian J Andrology**, v. 9, n. 4, p. 463-75, Jul 2007. ISSN 1008-682X (Print)1008-682X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17589783>>. Acesso em: 02 de Fevereiro de 2015.

DA SILVA, N. et al. A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. **Reproduction**, v. 141, n. 5, p. 653-63, May 2011. ISSN 1741-7899 (Electronic) 1470-1626 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21310816>>. Acesso em: 02 de Fevereiro de 2015.

- DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 1, p. 7-17, 2003.
- DACHEUX, J.-L. et al. Mammalian epididymal proteome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 306, n. 1, p. 45-50, 2009.
- DEHM, S. M.; TINDALL, D. J. Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. **Molecular Endocrinology**, v. 21, n. 12, p. 2855-2863, 2007.
- ESTRADA, A.; COATES-ESTRADA, R.; MERITT, D. Bat species richness and abundance in tropical rain forest fragments and in agricultural habitats at Los Tuxtlas, Mexico. **Ecography**, v. 16, n. 4, p. 309-318, 1993.
- FRENETTE, G.; LESSARD, C.; SULLIVAN, R. Polyol pathway along the bovine epididymis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, n. 4, p. 448-456, 2004.
- GALT, R. E. Pesticides in export and domestic agriculture: Reconsidering market orientation and pesticide use in Costa Rica. **Geoforum**, v. 39, n. 3, p. 1378-1392, 2008.
- GAO, W.; BOHL, C. E.; DALTON, J. T. Chemistry and structural biology of androgen receptor. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 9, p. 3352-3370, 2005.
- GARCIA, P. V. et al. Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 6, p. 1444-1451, 2012.
- GISI, U.; SIEROTZKI, H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. **European Journal of Plant Pathology**, v. 122, n. 1, p. 157-167, 2008.
- GOSS, P. E.; STRASSER, K. Aromatase inhibitors in the treatment and prevention of breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 3, p. 881-894, 2001.
- GRÜNFELD, H. T.; BONEFELD-JORGENSEN, E. C. Effect of in vitro estrogenic pesticides on human oestrogen receptor α and β mRNA levels. **Toxicology Letters**, v. 151, n. 3, p. 467-480, 2004.
- GUILLETTE, L.J., EDWARDS, T.M. Environmental influences on fertility: can we learn lessons from studies of wildlife? **Fertility Sterility**, v. 89, p. 21-24, 2008.
- HASS, U. et al. Adverse effects on sexual development in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 261-274, 2012.
- HENRY, M. J.; SISLER, Hugh D. Effects of sterol biosynthesis-inhibiting (SBI) fungicides on cytochrome P-450 oxygenations in fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 22, n. 3, p. 262-275, 1984.
- HERMO, L. et al. Region-and cell-specific differences in the distribution of carbonic anhydrases II, III, XII, and XIV in the adult rat epididymis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 53, n. 6, p. 699-713, 2005.

HINTON, B. T.; HOWARDS, S. S. Permeability characteristics of the epithelium in the rat caput epididymidis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 63, n. 1, p. 95-99, 1981.

HINTON, B. T. et al. Testicular regulation of epididymal gene expression. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 53, p. 47-57, 1997.

HURLEY, Pamela M. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 8, p. 437, 1998.

IPCS Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. International Program of Chemical Safety, **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, 2002.

JACOBSEN, H. et al. Repeated dose 28-day oral toxicity study in Wistar rats with a mixture of five pesticides often found as residues in food: alphacypermethrin, bromopropylate, carbendazim, chlorpyrifos and mancozeb. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 8, p. 1269-1277, 2004.

JACOBSEN, P. R., AXELSTAD, M., BOBERG, J., ISLING, L. K., CHRISTIANSEN, S., MANDRUP, K. R., HASS, U. Persistent developmental toxicity in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. **Reproductive Toxicology**, v. 34, 2, 237-250, 2012.

JAGA, K.; DHARMANI, C. Global surveillance of DDT and DDE levels in human tissues. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 16, n. 1, p. 7-20, 2003.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food—Results from 2001 to 2010. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 607-616, 2012.

JELINSKY, S. A. et al. The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 4, p. 561-570, 2007.

JIANG, J.; UMEZU, M.; SATO, E. Characteristics of infertility and the improvement of fertility by thyroxine treatment in adult male hypothyroid rdw rats. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 6, p. 1637-1641, 2000.

JOBLING, S., WILLIAMS, R., JOHNSON, A., TAYLOR, A., GROSS-SOROKIN, M., NOLAN, M., TYLER, C.R., VAN AERLEERLE, R., SANTOS, E., BRIGHTY, G., Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. Rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. **Environmental Health Perspective**, v. 114, 32–39, 2006.

JOHNSTON, D. S. et al. The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 3, p. 404-413, 2005.

JONES, G. et al. Carpe noctem: the importance of bats as bioindicators. **Endangered Species Research**, v. 8, n. 1-2, p. 93-115, 2009.

JONES, R. C.; MURDOCH, R. N. Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of eutherian and marsupial mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 4, p. 553-568, 1996. ISSN 1448-5990.

JORGENSEN, E. C. B.; AUTRUP, H.; HANSEN, J. C. Effect of toxaphene on estrogen receptor functions in human breast cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 8, p. 1651-1654, 1997. ISSN 0143-3334.

JOSEPH, A.; SHUR, B. D.; HESS, R. A. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. **Biology Reproduction**, v. 84, n. 2, p. 207-17, Feb 2011. ISSN 1529-7268 (Electronic)0006-3363 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20926801>>. Acesso em: 02 de Fevereiro de 2015.

HESS, R. A., FERNANDES, S. A., GOMES, et al. Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 600-613, 2011.

IVANOVA-CHEMISHANSKA, L.; MARKOV, D. V.; DASHEV, G. Light and electron microscopic observations on rat thyroid after administration of some dithiocarbamates. **Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 201-212, 1971.

KACKAR, R.; SRIVASTAVA, M. K.; RAIZADA, R. B. Induction of gonadal toxicity to male rats after chronic exposure to mancozeb. **Industrial Health**, v. 35, n. 1, p. 104-111, 1996.

KALIWAL, B.; KSHEERASAGAR, R. L. Effect of mancozeb on thyroid, testis, accessory reproductive organs and biochemical constituents in albino mice. **Recent Research in Science and Technology**, v. 2, n. 8, 2010.

KJÆRSTAD, M. B. et al. Effects of azole fungicides on the function of sex and thyroid hormones. **Pesticides Research**, v.1, n. 111. 2007.

KJELDSEN, L. S.; BONEFELD-JORGENSEN, E. C. Perfluorinated compounds affect the function of sex hormone receptors. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 11, p. 8031-8044, 2013.

KLUWE, W. M.; GUPTA, B. N.; LAMB, J. C. The comparative effects of 1, 2-dibromo-3-chloropropane (DBCP) and its metabolites, 3-chloro-1, 2-propanoxide (epichlorohydrin), 3-chloro-1, 2-propanediol (alphachlorohydrin), and oxalic acid, on the urogenital system of male rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 67-86, 1983.

KSHEERASAGAR, R. L.; KALIWAL, B. B. Temporal effects of mancozeb on testes, accessory reproductive organs and biochemical constituents in albino mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 15, n. 1, p. 9-17, 2003.

KUJALA, M. et al. Expression of ion transport-associated proteins in human efferent and epididymal ducts. **Reproduction**, v. 133, n. 4, p. 775-784, 2007.

KUNZ, T. H.; PIERSON, E. D. **Bats of the world: an introduction. Walker's bats of the world.** Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, p. 1-46, 1994.

KUNZ, T. H. et al. Ecological impacts of wind energy development on bats: questions, research needs, and hypotheses. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 5, n. 6, p. 315-324, 2007.

LAIGNELET, L. et al. Induction and inhibition of rat liver cytochrome (s) P-450 by an imidazole fungicide (prochloraz). **Toxicology**, v. 59, n. 3, p. 271-284, 1989.

LIU, X.; TEMPLE-SMITH, P. D.; RISBRIDGER, G. P. Acute effects of ethane dimethane sulfonate (EDS) on the structure of the cauda epididymidis in the rat: selective destruction of clear cells in the proximal cauda region. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 3, p. 295-306, 1993.

LUCKENS, M. M.; DAVIS, W. H. Bats: sensitivity to DDT. **Science**, v. 146, n. 3646, p. 948-948, 1964.

LYR, H. **Modern selective fungicides: properties, applications, mechanisms of action**. Gustav Fischer Verlag, 1995.

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, 31 p., 2010.

MEDELLÍN, R. A.; EQUIHUA, M.; AMIN, M. A. Bat diversity and abundance as indicators of disturbance in Neotropical rainforests. **Conservation Biology**, v. 14, n. 6, p. 1666-1675, 2000.

MENEGOLA, E. et al. Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphogenic effects. **Reproductive toxicology**, v. 22, n. 2, p. 186-195, 2006.

MENEGOLA, E. et al. Effects of mixtures of azole fungicides in postimplantation rat whole-embryo cultures. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 11, p. 1989-1997, 2013. ISSN 0340-5761.

MILNES, M.R., BERMUDEZ, D.S., BRYAN, T.A., EDWARDS, T.M., GUNDERSON, M.P., LARKIN, I.L., MOORE, B.C., GUILLETTE Jr., L.J. Contaminant-induced feminization and demasculinization of nonmammalian vertebrate males in aquatic environments. **Environmental Research**, v.100, p. 3–17, 2006.

MIRANDA, D.C. **Efeitos dos pesticidas mancozeb e tebuconazol sobre parâmetros testiculares do morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818)**. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal de Viçosa, 2012.

MONTFORT, L.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. Sperm–zona pellucida interaction involves a carbonyl reductase activity in the hamster. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 1, p. 113-119, 2002.

MOSER, V. C. et al. The effects of perinatal tebuconazole exposure on adult neurological, immunological, and reproductive function in rats. **Toxicological Sciences**, v. 62, n. 2, p. 339-352, 2001.

MUELLER, S. O. Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 3, p. 582-587, 2004. ISSN 1618-2642.

NONOGAKI, T. et al. Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. **Human Reproduction**, v. 7, n. 1, p. 81-85, 1992.

OBERDÖRSTER, E., CHEEK, A.O. Gender benders at the beach: endocrine disruption in marine and estuarine organisms. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 20, p. 23–36, 2001.

OLSON, G. E.; HINTON, B. T. Regional Differences in Luminal Fluid Polypeptides of the Rat Testis and Epididymis Revealed by Two-dimensional Gel Electrophoresis. **Journal of andrology**, v. 6, n. 1, p. 20-34, 1985.

ORLANDO, E.F., GUILLETTE JR., L.J. Sexual dimorphic responses in wildlife exposed to endocrine disrupting chemicals. **Environmental Research**, 104, p. 163–173, 2007.

PATTERSON, B. D.; WILLIG, M. R.; STEVENS, R. D. Trophic strategies, niche partitioning, and patterns of ecological organization. **Bat ecology**, v. 9, p. 536-57, 2003.

RAUN ANDERSEN, H. et al. Effects of Currently Used Pesticides in Assays for Estrogenicity, Androgenicity, and Aromatase Activity< i> in Vitro</i>. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 179, n. 1, p. 1-12, 2002.

REIS, N. R. et al. Morcegos do Brasil. In: (Ed.). **Morcegos do Brasil**: Universidade Estadual de Londrina, 2007.

ROBAIRE, B.; VIGER, R. S. Regulation of epididymal epithelial cell functions. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 2, p. 226-236, 1995.

ROBINSON, J. F. et al. Triazole induced concentration-related gene signatures in rat whole embryo culture. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 275-283, 2012.

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**, v. 3, n. 2, p. 1328-1333, 2009.

SANCHO, E. et al. Physiological effects of tricyclazole on zebrafish (< i> Danio rerio</i>) and post-exposure recovery. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology e Pharmacology**, v. 150, n. 1, p. 25-32, 2009.

SANGHI, R. et al. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. **Human & experimental toxicology**, v. 22, n. 2, p. 73-76, 2003.

SERRE, V.; ROBAIRE, B. Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. **Biology of reproduction**, v. 61, n. 3, p. 705-714, 1999.

SHARPE, R. M.; SKAKKEBAEK, N. E. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 2, p. e33-e38, 2008. ISSN 0015-0282.

SHUM, W. W. C. et al. Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. **Cell**, v. 135, n. 6, p. 1108-1117, 2008.

SHUM, W. W. C. et al. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. **Experimental Biology**, v. 212, n. Pt 11, p. 1753-61, Jun 2009. ISSN 0022-0949(Print) 0022-0949 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448084>>. Acesso em: 02 de Fevereiro de 2015.

SHUM, W. W. C. et al. Establishment of Cell-Cell Cross Talk in the Epididymis: Control of Luminal Acidification. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 576-586, 2011.

SIKKA, S. C.; WANG, R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. **Asian Journal of Andrology**, v. 10, n. 1, p. 134-145, 2008. ISSN 1745-7262.

SIMMONS, N. B.; CONWAY, T. M. Evolution of ecological diversity in bats. **Bat ecology**, p. 493-535, 2003.

SIMPSON, E. R.; DAVIS, S. R. Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis—some new perspectives. **Endocrinology**, v. 142, n. 11, p. 4589-4594, 2001.

SIMPSON, E. R. et al. Aromatase Cytochrome P450, The Enzyme Responsible for Estrogen Biosynthesis*. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 3, p. 342-355, 1994.

SINGH, A. et al. The regulation of aromatase activity in breast fibroblasts: the role of interleukin-6 and prostaglandin E2. **Endocrine-related Cancer**, v. 6, n. 2, p. 139-147, 1999.

SOTO, A. M.; CHUNG, K. L.; SONNENSCHNEIN, C. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. 4, p. 380, 1994.

STOKER, C., REY, F., RODRIGUEZ, H.A., RAMOS, J.G., SIROSKY, P., LARRIERA, A., LUQUE, E.H., MUÑOZ-DE-TORO. Sex reversal effects on Caiman latirostris exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. **General Comparative Endocrinology**, v. 133, p. 287–296, 2003.

STOKER, C., BELDOMÉNICO, P.M., BOSQUIAZZO, V.L., ZAYAS, M.A., REY, F., RODRÍGUEZ, H., MUÑOZ-DE-TORO, M., LUQUE, E.H. Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in Caiman latirostris. **General Comparative Endocrinology**, v.156, p. 603–612, 2008.

SULLIVAN, R.; FRENETTE, G.; GIROUARD, J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, n. 4, p. 483-491, 2007.

SUTOVSKY, P. et al. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 9, p. 1665-1675, 2001.

TAXVIG, C., HASS, U., AXELSTAD, M. DALGAARD, M., BOBERG, J., ANDEASEN, H.R. Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. **Toxicology Science**, 100, p. 464–473, 2007.

TOPPARI, J. et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. Suppl 4, p. 741, 1996.

TOTH, G. P.; ZENICK, H.; SMITH, M. K. Effects of epichlorohydrin on male and female reproduction in Long-Evans rats. **Toxicological Sciences**, v. 13, n. 1, p. 16-25, 1989.

TURNER, T. T. On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 4, p. 292-298, 1995.

VEERAMACHANENI, D. R. et al. Proteins in Luminal Fluid of the Ram Excurrent Ducts: Change in Composition and Evidence for Differential Endocytosis. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 2, p. 140-154, 1990.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, n. 1, p. 31-39, 2004.

YU, L. et al. Thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae following exposure to hexaconazole and tebuconazole. **Aquatic Toxicology**, v. 138, p. 35-42, 2013.

ZIETZ, B. P. et al. Long-term biomonitoring of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human milk from mothers living in northern Germany. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 211, n. 5, p. 624-638, 2008.

ARTIGO

Histomorfometria epididimária de morcegos da fruta *Artibeus lituratus* expostos aos fungicidas mancozeb e tebuconazol

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que apresenta um dos maiores consumos de pesticidas do mundo por ser um dos principais produtores agrícolas mundiais (Alves-Filho 2002; Caldas *et al.*, 2004; Berny, 2007; Faria *et al.*, 2007). Sabe-se que muitos dos pesticidas utilizados são capazes de interferir no sistema endócrino, reprodutivo e imunológico de mamíferos, por agirem como desreguladores endócrinos (Hass *et al.*, 2012). Dentro do grupo de pesticidas que apresentam esse efeito desregulador podem-se incluir duas classes de fungicidas, os etilenobisditiocarbamato e os triazóis, os quais apresentam como exemplares o mancozeb e o tebuconazol, respectivamente. Os dois fungicidas são capazes de inibir a síntese de esteroides do tipo ergosterol na membrana plasmática dos fungos (Zarn *et al.*, 2003; Taxvig *et al.*, 2007; Menegola *et al.*, 2013).

Contudo, essa ação interfere também na síntese de hormônios esteroides quando mamíferos entram em contato com estes fungicidas, podendo afetar funções endócrinas e, conseqüentemente, reprodutivas (Jacobsen *et al.*, 2012). Morcegos frugívoros que se alimentam de plantações estão susceptíveis à contaminação com estes fungicidas. Isto passa a ser um problema ecológico, ao considerar que os morcegos são importantes dispersores de sementes (Reis *et al.*, 2007, Sato *et al.*, 2008).

O morcego frugívoro da espécie *Artibeus lituratus*, amplamente distribuído na América do Sul, apresenta hábitos alimentares variados, ingerindo desde insetos, frutos e até néctar. Quando se alimentam de frutos contaminados, eles apresentaram alterações testiculares, causadas tanto no túbulo quanto no intertúbulo de *Artibeus lituratus* em tratamento por 30 dias com tebuconazol (Miranda, 2012).

Não foram encontrados trabalhos mostrando o efeito destes fungicidas sobre parâmetros histomorfométricos no epidídimo, que é um órgão considerado andrógeno dependente (Robaire *et al.*, 2006). Sabe-se que o epidídimo é responsável pela ocorrência do processo de maturação espermática e pela estocagem dos espermatozoides. O comprometimento de suas funções pode afetar a fertilidade em mamíferos, por ser nele que os espermatozoides adquirem a motilidade e a capacidade fecundante (Kackar *et al.*, 1996; Hess e Nakai, 2000; Robaire *et al.*, 2006).

Com base no exposto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos dos fungicidas mancozeb e tebuconazol sobre a histomorfometria do epidídimo de *Artibeus lituratus*, utilizando concentrações preconizadas pelos fabricantes. Os objetivos específicos são analisar a histologia do epitélio epididimário, com relação a sua arquitetura e distribuição de células ao longo de todo o epidídimo, após exposição a diferentes concentrações dos pesticidas. Mensurar parâmetros morfométricos epididimários, como altura do epitélio, diâmetros luminal e tubular, e proporção volumétrica dos seus constituintes após a exposição dos pesticidas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fungicidas

Os fungicidas utilizados neste estudo foram o Mancozeb BR[®] (80% p/p), na concentração 2g/L, e o Folicur[®] (200 g/L) na concentração 1ml/L. Os ingredientes ativos desses fungicidas são o mancozeb e o tebuconazol, respectivamente. As concentrações dos fungicidas utilizados 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 de 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.

2.2. Animais e tratamento

Morcegos machos (n=25) 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. A coleta foi autorizada pelo IBAMA (licença número 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 Federal de Viçosa – CEUA/UFV (número 106/2014).

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 João Moojen da UFV. Transcorrido este 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 do outro.

Tabela 1: 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 = 5)
GTE7	Tebuconazol (1mL/L) + espalhante (1mL/L) por sete dias (n = 5)
GTE30	Tebuconazol (1mL/L) + espalhante (1mL/L) por 30 dias (n = 5)

Os morcegos frugívoros foram alimentados em cativeiro diariamente às 18:00 horas, sendo a água ofertada *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 fungicida 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 do 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. As frutas foram ofertadas com as cascas posicionadas para cima, no intuito de simular condições mais fiéis às da natureza.

2.3. Eutanásia e fixação dos epidídimos

Os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina. A coleta dos epidídimos foi feita a partir de incisão longitudinal mediana na região ventral dos animais. Os epidídimos foram dissecados, sendo o epidídimo direito fixado em solução de Karnovsky (paraformaldeído 4% e glutaraldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4) por 24 horas e usado no processamento histológico.

2.4. Processamento histológico no Laboratório de Biologia Celular e Estrutural

Após 24 horas de fixação, os epidídimos foram desidratados em soluções crescentes de etanol (70, 80, 90, 95% e absoluto) por 30 minutos e incluídos inteiros em 2- hidroxietil metacrilato (Historesin[®], Leica). Os blocos foram cortados na espessura de 3µm em micrótomo rotativo (Reichert-Jung, Alemanha), de forma semi-seriada, utilizando-se navalha de vidro. Os cortes histológicos obtidos foram corados com Azul de toluidina/ Borato de Sódio 1%, sendo posteriormente feita a montagem das lâminas com lamínulas usando Entellan[®] (Merck).

2.5. Morfologia das regiões epididimárias

Para avaliar se os fungicidas testados causaram alteração na arquitetura tecidual do epidídimo, avaliou-se qualitativamente as três regiões epididimárias (cabeça, corpo e cauda) quanto a distribuição e caracterização das células principais, apicais, claras, halo, estreitas e basais, diâmetro tubular e altura de epitélio, bem como presença dos estereocílios e de grânulos de secreção em microscópio de luz Olympus BX-53 em diferentes aumentos.

2.6. Morfometria e volumetria do epidídimo

Para a morfometria, foram capturadas dez imagens digitais de campos histológicos aleatórios das regiões epididimárias da cabeça, corpo e cauda utilizando fotomicroscópio (Olympus BX-50) na objetiva de 20x. As análises foram realizadas utilizando-se o software *Image Pro Plus 4.5*[®] (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

A proporção volumétrica (%) dos componentes dos compartimentos tubular e intertubular foi estimada por meio da contagem de um total de 2660 pontos projetados sobre imagens capturadas em 10 campos aleatórios nos diferentes cortes histológicos das três regiões epididimárias de cada animal. Foram contabilizadas 266 interseções coincidentes sobre epitélio, lúmen e interstício.

O diâmetro médio das secções do ducto epididimário, por região e por animal, foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 25 secções transversais do ducto que apresentarem contorno o mais circular possível. Esse diâmetro foi mensurado a partir de uma medida equidistante da porção basal de uma célula principal à porção basal da célula principal oposta. Nas mesmas 25 secções foram feitas as mensurações da altura do epitélio epididimário, o qual foi medido da região basal até o ápice de uma célula principal, excluindo os estereocílios. O diâmetro luminal foi obtido a partir da diferença entre o valor obtido para o diâmetro tubular e o dobro do valor encontrado para a altura do epitélio.

2.7. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e suas médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ao nível de significância de 5%, utilizando-se o programa STATISTICA. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Alterações histológicas

A arquitetura tecidual do ducto epididimário mostrou-se sem alterações, apresentando ocorrência e distribuição normal das células epiteliais e organização dos componentes teciduais presentes no compartimento intertubular de todas as regiões estudadas, inclusive cabeça e cauda (Figura 1), estando de acordo com o descrito por Beguelini *et al.* (2010), para morcegos. Observou-se nos animais de todos os grupos experimentais, principalmente os tratados com mancozeb, a presença de células germinativas no lúmen do ducto (Figura 1), em todas as regiões do epidídimo. A ocorrência de células germinativas no

lúmen parece ser comum nas espécies de morcegos analisadas em nosso laboratório, e pode estar associada ao longo tempo de armazenamento dos espermatozoides no epidídimo de morcegos (Crichton *et al.*, 1993; Cervantes *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2013). Além disso, verificou-se a ocorrência de extrusões na superfície epitelial e no lúmen (Figura 1D), de todos animais nos quatro grupos experimentais. As extrusões geralmente são restos celulares de espermatozoides, espermátides e vesículas apócrinas epididimárias conhecidas como epididimossomos, que atuam nas modificações dos espermatozoides (Saez *et al.*, 2003). O conhecimento acerca das proteínas dos epididimossomos em morcegos pode fornecer bases para entender o complexo funcionamento da longa estocagem dos espermatozoides no epidídimo de morcegos, e ajudar a entender a presença de extrusões e restos celulares em grande quantidade no lúmen epididimário desta ordem.

Animais dos grupos que receberam mancozeb e tebuconazol por sete dias apresentaram, na região da cabeça, a presença de microvacuolizações citoplasmáticas nas células principais (Figura 1C). Essas alterações podem justificar aumento do volume das células principais, visto que houve aumento na porcentagem de epitélio dessa região para ambos os tratamentos.

Alterações histológicas pontuais foram observadas em alguns animais que receberam tebuconazol por sete dias, nas três regiões epididimárias. Essas alterações consistiram da presença de discreto infiltrado leucocitário inflamatório mononuclear localizado, geralmente, próximos a vasos sanguíneos, no compartimento intertubular (Figura 2). Esses infiltrados apresentaram macrófagos e linfócitos, além de mastócitos e plasmócitos, identificados pelo núcleo cuja cromatina se dispersa em forma de roda de carroça, em menor quantidade (Figura 3). Pelo menos em 3 dos 5 animais dos grupos que receberam tebuconazol foram encontrados infiltrados leucocitários mononucleares discretos, além de mastócitos e plasmócitos (figuras 2 e 3).

Foram observados sinais de inflamação crônica, com predomínio de linfócitos e macrófagos e menor ocorrência de células polimorfonucleares como neutrófilos, processo de inflamação conhecido como epididimite, com presença de vasodilatação associados à presença de infiltrado, e aumento no interstício em um dos animais que recebeu tebuconazol por 30 dias. Essas alterações foram mais discretas nos animais que receberam mancozeb por 7 dias, e também foram encontradas em um dos animais do grupo controle. Essas observações possivelmente correspondem variações de variabilidade que é melhor observada entre os animais

silvestres coletados em ambiente natural e que mesmo após a aclimação, podem persistir. As alterações mais severas que foram observadas para o animal tratado por 30 dias com tebuconazol são comparadas às provocadas pelo benomil (Hess e Nakai 2001). Este é um fungicida tóxico para os microtúbulos das células de Sertoli e promove graves danos à espermatogênese, obstrução dos ductos eferentes e acúmulo de restos celulares no lúmen do epidídimo levando ao recrutamento de células inflamatórias, culminando com o desenvolvimento de epididimite e granulomas (Hess e Nakai 2001).

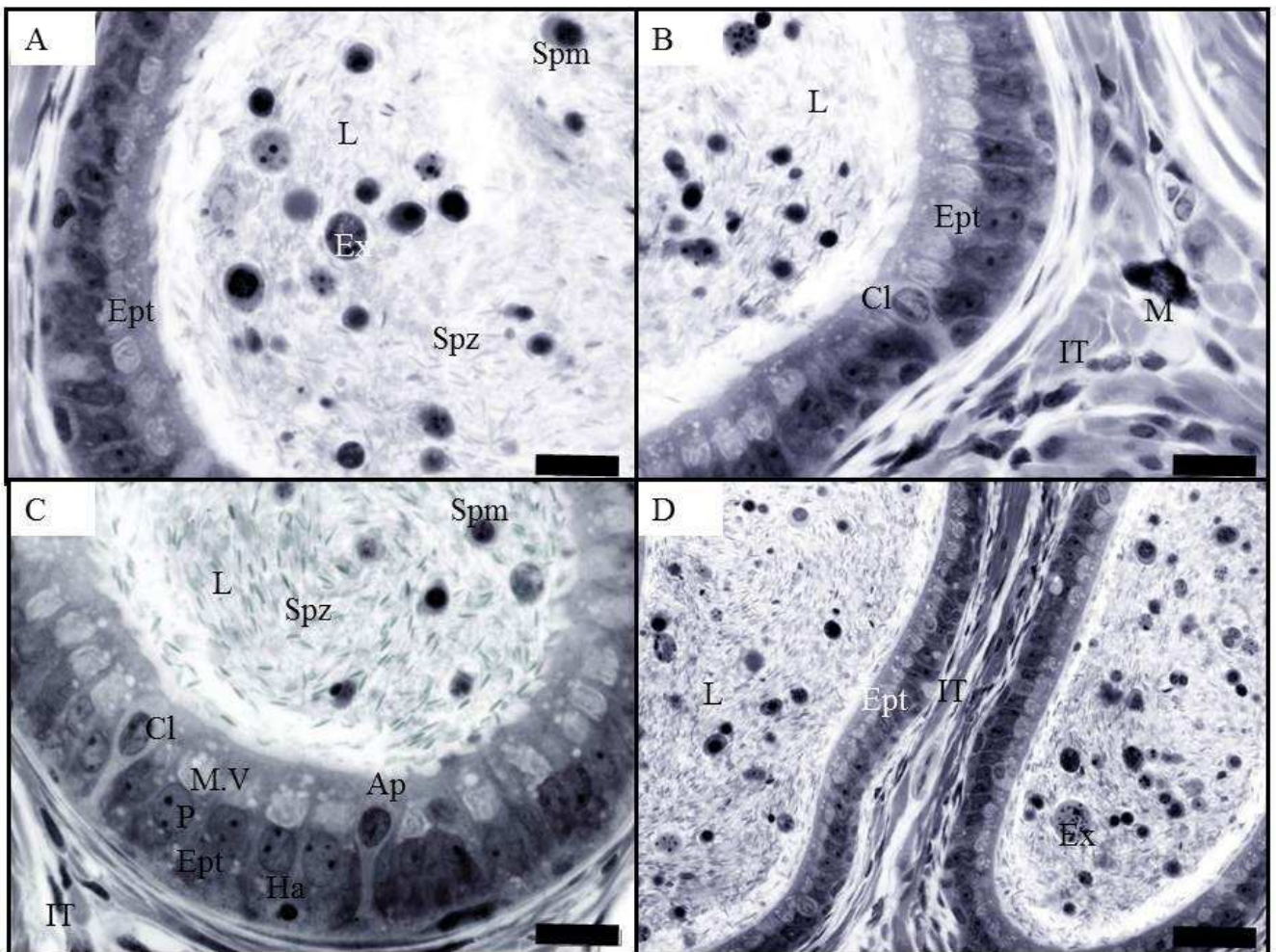


Figura 1. Cortes histológicas do ducto epididimário de *Artibeus lituratus* tratado com mancozeb na região da cauda, mostrando: A) epitélio (Ept), lúmen (L) com presença de espermatozoides (Spz) e extrusões (Ex) e espermátides (Spm), B) Epitélio contendo uma célula clara (Cl), lúmen amplo contendo espermatozoides e restos celulares, e interstício contendo mastócito (M), C) Secção contendo espermatozoides e restos celulares, e interstício contendo mastócito (M), D) Secção contendo espermatozoides e restos celulares, e interstício contendo mastócito (M).

transversal da região da cabeça, onde pode-se observar epitélio com células principais (P), apresentando microvesículas (M.V) na sua porção apical, célula apical (Ap), célula clara (Cl), célula halo (Ha), lúmen (L) contendo espermatozoides (Spz) e espermátides (Spm) e interstício (IT). D) Secção transversal na região da cauda evidenciando lúmen (L) contendo espermatozoides, espermátides e extrusões. Azul de toluidina. Barra = 20 micrômetros.

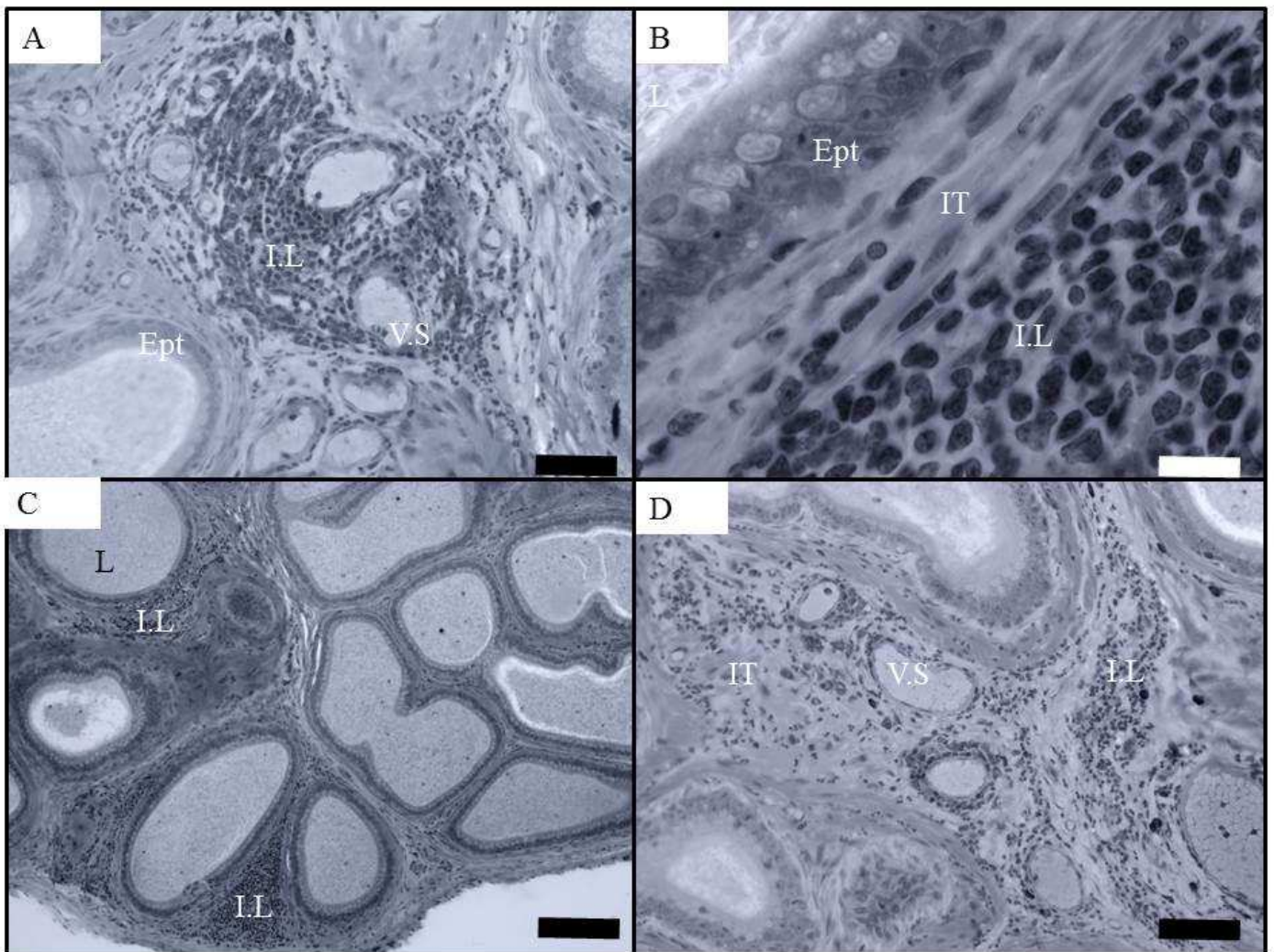


Figura 2. A- Corte histológico do ducto epididimário de *Artibeus lituratus* do grupo tratado com tebuconazol por 30 dias, mostrando: Área de epitélio (Ept) e interstício contendo infiltrado leucocitário (I.L) e vasos sanguíneos (V.S) na região da cauda. B) Corte da cauda mostrando epitélio (Ept) e interstício (IT) contendo infiltrado leucocitário (I.L) com células mononucleares. C) Secção transversal da cauda mostrando discreto

infiltrado leucocitário. D- Secção da cauda mostrando interstício (IT) contendo infiltrado leucocitário (IL) e vasos sanguíneos. Azul de toluidina. Barra preta = 20 micrômetros; Barra branca = 5 micrômetros.

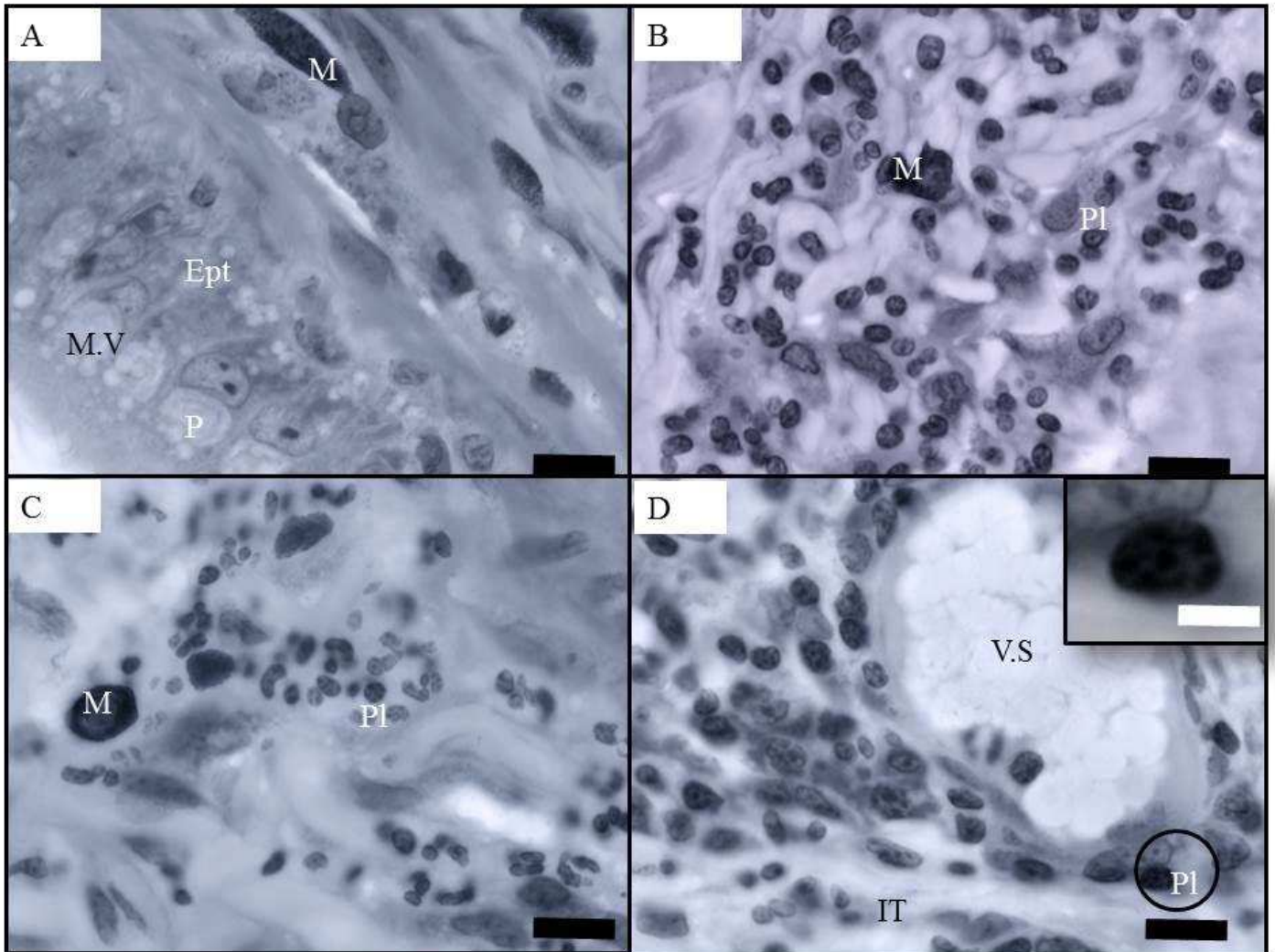


Figura 3. Cortes histológicos do ducto epididimário de *Artibeus lituratus* tratado com tebuconazol 30 dias, mostrando: A) no epitélio (Ept) com células principais (P) com microvesículas apicais (M.V) e interstício contendo mastócitos (M) região da cauda. B e C) Observa-se na cauda o interstício com infiltrado leucocitário composto por mastócitos (M) e plasmócitos (Pl). D) Secção da cauda mostrando interstício (IT) contendo infiltrado leucocitário, vasos sanguíneos (V.S) e plasmócitos (Pl) no detalhe . Azul de toluidina. Barra = 5 micrômetros, Barra branca = 2 micrômetros.

3.2 Alterações Histomorfométricas

3.2.1 Cabeça

As alterações na morfologia epididimária não influenciaram os resultados obtidos para a morfometria e volumetria, que estão mostrados nas tabelas 2, 3 e 4. A região que apresentou maior quantidade de alterações morfométricas foi a cabeça, seguida do corpo e da cauda, ao contrário das alterações morfológicas que foram maiores na cauda.

Alterações no epitélio epididimário de camundongos *Esr1* ^{-/-} foram também observadas, como vacuolizações nas células claras, apicais e estreitas, relacionadas às alterações no transporte de íons e desregulação do ambiente luminal do ducto epididimário (Hess *et al.*, 2000). As alterações observadas nos animais tratados com mancozeb indicam que o mesmo gerou aumento na percentagem de epitélio na cabeça, e redução na percentagem de interstício. Essas alterações podem estar relacionadas a redução no metabolismo de proteínas das células principais do epidídimo que é diretamente afetado com a queda de andrógenos, principal mecanismo que explica as alterações epididimárias nos trabalhos que avaliaram fungicidas no epidídimo (Dikshith e Datta, 1972, Dixit e Gupta, 1987, Bedwal *et al.*, 1994, Desta, 1994). O acúmulo de proteínas e colesterol no epidídimo em ratos tratados com tebuconazol e mancozeb (Joshi *et al.*, 2005, Joshi e Gulati 2005) indica que os fungicidas afetam o metabolismo destas substâncias no órgão. Esses dados de literatura explicariam a alteração do epitélio epididimário na região da cabeça, mas não é possível determinar o tipo de degeneração em inclusão em resina na ausência de protocolos para as técnicas de Sudan, PAS e protocolos para identificação de degeneração hialina.

Animais tratados com mancozeb durante sete dias e tebuconazol durante sete dias apresentaram maior percentual de epitélio na região da cabeça, em relação aos animais dos demais tratamentos, e menor valor percentual para o interstício, quando comparado aos animais dos grupos controle e controle com espalhante (E% G3 e G4 P = 0,00102, 0,00891) (IT G3 e G4 P = 0,00634, P = 0,01027). Quanto à morfometria, observou-se que animais tratados com tebuconazol por sete dias apresentaram maior valor médio para os diâmetros tubular (P = 0,00056) e luminal (P = 0,00020), em relação aos animais dos demais tratamentos. O maior percentual de epitélio pode ter influenciado no aumento dos diâmetros tubular e luminal e na diminuição do percentual de intertúbulo, não alterando a altura epitelial. O aumento do diâmetro luminal dos ductos eferentes foi correlacionado por Oliveira (2003) com alterações nos receptores de estrógenos ER α , com efeito marcante sobre a reabsorção do fluido testicular nesta

região que absorve cerca de 90% desse fluido. Estudos posteriores mostraram que esse efeito gera também danos na expressão gênica de vários transportadores do epidídimo, pois o mesmo também pode ter seus receptores de estrógenos desregulados (Hess 2003; Hermo e Smith 2011, Joseph *et al.*, 2011).

Análises do epitélio epididimário submetido a substâncias xenobióticas desreguladoras endócrinas mostraram alterações no aparato secretor das células principais da região da cabeça epididimária. Essas alterações são visíveis nas micrografias das células principais, e podem ser quantificadas por análises histomorfométricas e volumétricas, contudo é necessário análises ultraestruturais para confirmar essa inferência (Garcia *et al.*, 2013).

Estudos histomorfométricos provêm uma acurácia significativa na análise de danos celulares induzidos por xenobióticos, proporcionando informações sobre células alvo e podem indicar os sinais de toxicidade e recuperação caso a alteração seja reversível ao se analisar tratamentos com diferentes intervalos para a mesma substância (Morakinyo *et al.*, 2011; Capucho *et al.*, 2012).

Tabela 2- Proporção volumétrica e morfometria da região da cabeça do epidídimo de morcegos *Artibeus lituratus* expostos ao mancozeb e tebuconazol.

Grupos	E (%)	L (%)	IT (%)	DT (µm)	DL (µm)	AE (µm)
GC	52,00 ± 3,37 ^a	12,00 ± 2,24	36,00 ± 1,21 ^a	106,91 ± 11,0 ^a	42,61 ± 7,40 ^a	32,15 ± 5,35
GCE	51,20 ± 2,51 ^a	12,03 ± 3,54	36,77 ± 1,66 ^a	119,66 ± 13,1 ^a	49,62 ± 0,21 ^a	35,02 ± 6,44
GME7	61,14 ± 3,05 ^b	10,76 ± 2,17	28,10 ± 3,86 ^b	109,10 ± 7,71 ^a	45,52 ± 6,85 ^a	31,79 ± 3,78
GTE7	58,85 ± 3,25 ^b	11,54 ± 1,17	29,61 ± 3,08 ^b	139,83 ± 9,42 ^b	63,23 ± 4,20 ^b	38,30 ± 3,11
GTE30	53,75 ± 2,32 ^a	13,27 ± 5,97	32,98 ± 5,27 ^{ab}	111,88 ± 9,33 ^a	49,56 ± 8,05 ^a	31,16 ± 2,15

Média ± desvio-padrão; ^{a, b}Letras diferentes na mesma coluna se diferem significativamente entre si (P < 0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls. E: epitélio; L: Lúmen; IT: interstício; DT: diâmetro tubular; DL: diâmetro do lúmen; AE: altura de epitélio. GC: Controle, sem fungicida e espalhante, GCE: Controle com espalhante adesivo polioxietileno alquil fenol éter por sete dias, GME7: Mancozeb + espalhante por sete dias, GTE7: Tebuconazol + espalhante por sete dias, GTE30: Tebuconazol + espalhante por 30 dias

A região da cabeça do epidídimo pode ser considerada mais sensível que as demais regiões a alterações histofisiológicas e morfométricas, devido a observação de maior concentração de 5- α -redutase na cabeça (enzima que converte nessa região a testosterona em diidrotestosterona), se comparado ao corpo e cauda sugerida pela análise da expressão gênica das diferentes regiões do epidídimo, o que explicaria a maior andrógeno-dependência desta

região (Lan *et al.*, 1998; Sipila *et al.*, 2006; Sipila *et al.*, 2011). Trabalhando com *Artibeus lituratus*, Miranda (2012) não fez a mensuração de testosterona sérica, porém analisou o testículo, que produz e manda várias substâncias como a testosterona para o segmento inicial do epidídimo pelo fluido testicular, e não verificou alterações drásticas na função das células do epitélio seminífero, bem como das células de Leydig, observando contudo, algumas variações histomorfométricas para o tratamento de 30 dias com tebuconazol.

3.2.2 Corpo

Com relação a região do corpo, animais tratados com tebuconazol, nos dois tempos, e mancozeb por sete dias apresentaram maior diâmetro tubular médio que animais do grupo controle ($P < 0,05$; tabela 3 ($P = 0,03842, 0,03248, 0,03934$ para G3, G4 e G5 respectivamente). Este resultado, no entanto, não influenciou os resultados obtidos para a volumetria dos componentes tubulares e intertubulares nos animais tratados com os fungicidas (AE e DL $P = 0,75024, 0,22610$ respectivamente). Não houve diferença entre os tratamentos para as medidas de altura de epitélio e diâmetro luminal (AE $P = 0,24340$, DL $P = 0,18037$). As alterações no diâmetro tubular da região do corpo indicam que o mancozeb e o tebuconazol possivelmente interferem na composição do fluido epididimário.

Animais tratados com o espalhante adesivo apresentaram aumento do percentual médio de interstício em relação aos demais tratamentos ($P = 0,01969$). Não há relatos de toxicidade desse composto para o epidídimo e análises futuras podem elucidar esse achado.

Tabela 3 - Proporção volumétrica e morfometria da região do corpo epididimário de *Artibeus lituratus* expostos ao mancozeb e tebuconazol.

Grupos	E (%)	L (%)	IT (%)	DT (μm)	DL (μm)	AE (μm)
GC	46,00 \pm 5,47	22,30 \pm 6,81	31,70 \pm 4,56 ^a	125,53 \pm 10,05 ^a	68,55 \pm 17,98	28,49 \pm 5,33
GCE	44,00 \pm 3,06	16,00 \pm 0,61	40,00 \pm 4,57 ^b	144,14 \pm 21,65 ^{ab}	86,58 \pm 19,12	28,78 \pm 1,26
GME7	46,44 \pm 8,64	25,47 \pm 5,23	28,09 \pm 6,77 ^a	148,75 \pm 9,65 ^b	93,77 \pm 22,86	27,49 \pm 6,38
GTE7	50,32 \pm 9,13	23,79 \pm 9,59	25,89 \pm 4,10 ^a	147,90 \pm 13,0 ^b	79,44 \pm 10,14	34,23 \pm 3,28
GTE30	48,60 \pm 7,23	23,88 \pm 8,14	27,52 \pm 2,48 ^a	145,18 \pm 9,29 ^b	86,68 \pm 15,20	29,25 \pm 3,99

Média \pm desvio-padrão; ^{a, b}Letras diferentes na mesma coluna se diferem significativamente entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls; GC Controle, sem fungicida e espalhante (n = 5), GCE: Controle com espalhante adesivo polioxietileno alquil fenol éter por sete dias, GME7: Mancozeb + espalhante por sete dias, GTE7: Tebuconazol + espalhante por sete dias, GTE30:

Tebuconazol + espalhante por 30 dias; E: epitélio; L: Lúmen; IT: interstício; DT: diâmetro tubular; DL: diâmetro do lúmen; AE: altura de epitélio.

3.2.3 Cauda

Na região da cauda não houve diferença entre os tratamentos com relação às médias obtidas para parâmetros volumétricos e de altura de epitélio e diâmetro luminal ($P = 0,52933$; $P = 0,0847$; tabela 4). Animais tratados com tebuconazol, nos dois períodos testados, apresentaram aumento no diâmetro tubular médio em relação aos animais controle e tratados apenas com espalhante ($P = 0,03067$).

A região da cauda apresenta funções de proteção, estocagem e manutenção da quiescência dos espermatozoides (Verma *et al.*, 2001). O epitélio apresenta menor altura, enquanto o ducto apresenta o maior diâmetro do órgão e também o maior lúmen (Beguelini *et al.*, 2010). A maior distância do testículo e a menor dependência de andrógenos, comprovada pela análise da expressão gênica das diferentes regiões do epidídimo (Lan *et al.*, 1998; Sipila *et al.*, 2006; Sipila *et al.*, 2011) é um dos fatores que explicam a menor alteração dos parâmetros histomorfométricos desta região pela ação de xenobióticos que lesam o testículo (Robaire *et al.*, 2006). A possível explicação para o aumento no diâmetro tubular seria o acúmulo de restos celulares no lúmen e ocorrência de microvacuolizações no epitélio. A ocorrência de restos celulares no lúmen epididimário e alterações no epitélio alterariam a resposta imunológica epididimária, gerando quimiotaxia de células do sistema imunológico, sendo essa uma das explicações dadas por Hess e Nakai (2000) para as alterações testiculares, epididimárias e no ducto eferente mediante a exposição de roedores ao fungicida benomil. Mediante a esses efeitos citados pela ação do fungicida benomil é possível fazer uma comparação e inferir que os fungicidas tebuconazol e mancozeb afetam a histologia epididimária devido às alterações epiteliais e histomorfométricas além de inflamação.

Tabela 4 - Proporção volumétrica e morfometria da região da cauda epididimária de *Artibeus lituratus* expostos ao mancozeb e tebuconazol.

Grupos	E (%)	L (%)	IT (%)	DT (μm)	DL (μm)	AE (μm)
GC	27,91 \pm 3,12	40,26 \pm 13,94	31,83 \pm 3,54	172,96 \pm 17,06 ^a	133,64 \pm 17,68	19,66 \pm 3,46
GCE	25,00 \pm 7,26	48,49 \pm 2,17	26,51 \pm 9,93	201,79 \pm 5,86 ^a	167,39 \pm 5,17	17,20 \pm 0,35
GME7	27,50 \pm 4,26	39,91 \pm 5,18	32,59 \pm 3,85	189,55 \pm 14,04 ^{ab}	146,37 \pm 12,38	21,59 \pm 3,63
GTE7	26,29 \pm 4,65	46,41 \pm 6,08	27,30 \pm 3,90	206,05 \pm 22,77 ^b	166,47 \pm 21,25	19,79 \pm 3,41

GTE30	26,01 ± 5,96	43,50 ± 8,85	30,49 ± 4,93	205,76 ± 7,61 ^b	164,20 ± 5,39	20,78 ± 2,03
-------	--------------	--------------	--------------	----------------------------	---------------	--------------

Média ± desvio-padrão; ^{a, b}Letras diferentes na mesma coluna se diferem significativamente entre si (P < 0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls; GC Controle, sem fungicida e espalhante, GCE: Controle com espalhante adesivo polioxietileno alquil fenol éter por sete dias, GME7: Mancozeb + espalhante por sete dias, GTE7: Tebuconazol + espalhante por sete dias, GTE30: Tebuconazol + espalhante por 30 dias; E: epitélio; L: Lúmen; IT: interstício; DT: diâmetro tubular; DL: diâmetro do lúmen; AE: altura de epitélio.

Sabe-se que bombas, carreadores e transportadores participam da reabsorção do fluido testicular nas regiões proximais do epidídimo e são influenciadas por hormônios esteroides no epidídimo. As aquaporinas são proteínas essenciais para a concentração espermática e atuam na composição nos solutos do fluido epididimário que influenciam a fertilidade. A intensa absorção de água nas regiões proximais do epidídimo foi mostrada pela análise da expressão diferencial dos mRNA das aquaporinas no epidídimo. A aqp 9 foi mais expressa na região da cabeça e corpo do epidídimo em humanos, sabe-se que a expressão da aqp 9 parece ser regulada somente por andrógenos na cabeça do epidídimo; enquanto que a cauda expressa em humanos somente a aqp 1, que parece ser regulada por andrógenos e estrógenos (Da Silva 2006; Thimon *et al.*, 2007; Hermo e Smith, 2011). Outro estudo quantificou em *Artibeus lituratus* a expressão de aquaporinas 1 e 9 (aqp 1 e aqp 9) no testículo, epidídimos e ductos eferentes e deferentes e revelou que a distribuição da aqp 9 é maior na cauda do epidídimo, e a aqp 1 é expressa somente nos vasos sanguíneos do interstício de todos estes órgãos (Oliveira *et al.*, 2013). A variação observada no volume do epitélio do epidídimo pode indicar alterações nos transportadores das células que compõem o epitélio possivelmente causadas por queda nos andrógenos. De acordo com a literatura os andrógenos poderiam influenciar a expressão de aquaporinas 9 (Oliveira *et al.*, 2013). Futuras análises no epidídimo da expressão das aquaporinas em morcegos tratados com desreguladores endócrinos poderão comprovar essa hipótese. Esse processo pode ter sofrido adaptação no tratamento de 30 dias com tebuconazol e as células principais podem ter recuperado dessa variação no volume na cabeça. Já na cauda, ambos os tratamentos geraram o aumento do diâmetro tubular.

O mecanismo proposto para a ação reguladora do estrógeno nos órgãos do aparelho reprodutor masculino como testículo, ductos eferentes, epidídimos, seria a regulação do

transporte de solutos e água. Esse processo de reabsorção de água quando desregulado por ação de fungicidas ou por *knockout* do receptor de estrógeno α , gera diluição do sêmen, já que os estrógenos regulam a expressão de aquaporinas, canais de Na^+ , anidrase carbônica II, e o canal transmembrana regulador de condutância na fibrose cística (CFTR). A inibição dos canais gera a diluição do sêmen na cauda do epidídimo, alterações morfológicas nos espermatozoides e culmina com a redução da fertilidade (Hess 2003; Hess *et al.*, 2011).

Portanto as alterações observadas no epidídimo nos trabalhos citados sinalizam para uma possível interferência do mancozeb e tebuconazol no metabolismo de andrógenos sobre o epidídimo, afetando a síntese de diidrotestosterona, cuja queda afeta às células do epitélio epididimário andrógeno dependentes, que reduziria seus papéis na maturação, proteção e estocagem dos espermatozoides (Brooks 1983, Joshi *et al.*, 2003). Essa resposta foi observada no epitélio da cabeça do epidídimo, sabidamente mais sensível a andrógenos. O acúmulo de restos celulares de espermátides no lúmen no corpo e cauda explicaria a variação no diâmetro tubular, a menor dependência da região do corpo e cauda a andrógenos pode ser sugerida pela ausência de variações no epitélio nos dois parâmetros avaliados.

4. CONCLUSÕES

O epidídimo de morcegos *Artibeus lituratus* apresentou maiores alterações na região da cabeça nos tratamentos agudos de ambos os fungicidas. Foi observado uma alteração na morfometria do corpo e cauda nos três tratamentos. As mesmas indicam maior toxicidade aguda do tebuconazol para o epidídimo dos morcegos analisados se comparado ao mancozeb, visto que o tebuconazol afetou as três regiões, já o mancozeb apenas a cabeça e o corpo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos**. Annablume, 2002.

BEDWAL, R. S. et al. Histological and biochemical changes in testis of zinc deficient BALB/c strain of mice. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 32, n. 4, p. 243-247, 1994.

BEGUELINI, M.R., SERGIO, B.F.S., LEMES, F.L.J., TABOGA, S.R., MORIELLE-VERSUTE, E. Morphological and morphometric characteristics of the epididymis in the Neotropical bats *Eumops glaucinus* and *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). **Chiroptera Neotropical.**, 16,2, 769-779, 2010.

BERNY, P. Pesticides and the intoxication of wild animals. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, 2, p. 93-100, 2007.

BROOKS, D. E. Epididymal functions and their hormonal regulation. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 36, n. 3, p. 205-222, 1983.

CALDAS, E. D., MIRANDA, M. C. C., CONCEIÇÃO, M. H., DE SOUZA, L. C. K. R. Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risk for consumers. **Food and Chemical Toxicology**, 42, 11, p. 1877-1883, 2004.

CAPUCHO, C. et al. Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 11, p. 3956-3962, 2012.

CERVANTES, M. I. et al. Spermatozoa epididymal maturation in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 54, n. 4-5, p. 196-204, 2008.

CRICHTON, E. G. et al. Unique features of the cauda epididymidal epithelium of hibernating bats may promote sperm longevity. **The Anatomical Record**, v. 237, n. 4, p. 475-481, 1993.

DA SILVA, N. et al. Segmental and cellular expression of aquaporins in the male excurrent duct. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 8, p. 1025-1033, 2006.

DESTA, B.. Ethiopian traditional herbal drugs. Part II: Antimicrobial activity of 63 medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n. 2, p. 129-139, 1993.

DIKSHITH, T. S.; DATTA, K. K. Pathologic changes induced by pesticides in the testes and liver of rats. **Experimentelle Pathologie**, v. 7, n. 5, p. 309, 1972.

DIXIT, V. P.; GUPTA, R. S. Antispermatic and antiandrogenic activity of *Sapindus trifoliatus* extract in intact and castrated male gerbils. **Planta Medica**, v. 46, p. 242-246, 1987.

FARIA, N.M. X.; FASSA, A. Gastal; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência Saude Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 25-38, 2007.

GARCIA, P. V. et al. Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 6, p. 1444-1451, 2012.

HASS, U. et al. Adverse effects on sexual development in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 261-274, 2012.

HERMO, L.; SMITH, C. E. Thirsty business: cell, region, and membrane specificity of aquaporins in the testis, efferent ducts, and epididymis and factors regulating their expression. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 565-575, 2011.

HESS, R., A. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. **Reviews of Reproduction**, v. 5, n. 2, p. 84-92, 2000.

HESS, R. A.; NAKAI, M. Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl. **Histology and Histopathology**, v. 15, n. 1, p. 207-224, 2000. ISSN 0213-3911.

HESS, R. A. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. **Reproductive Biology Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 52, 2003.

HESS, R. A., FERNANDES, S. A., GOMES, et al. Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 600-613, 2011.

JACOBSEN, P. R. et al. Persistent developmental toxicity in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 237-50, Sep 2012. ISSN 1873-1708 (Electronic) 0890-6238 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22677472> >. Acesso em: 01 de Fevereiro de 2015.

JONES, G. et al. Carpe noctem: the importance of bats as bioindicators. **Endangered Species Research**, v. 8, n. 1-2, p. 93-115, 2009. ISSN 1863-5407.

JOSHI, S. C. et al. Influence of methyl parathion on reproductive parameters in male rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 14, n. 3, p. 91-98, 2003.

JOSHI, S.C.; GULATI, N.; GAJRAJ, A.. Evaluation of toxic impacts of mancozeb on testis in rats. **Asian Journal of Experimental Sciences**, v. 19, n. 1, p. 73-83, 2005.

JOSHI, S. C.; GULATI, N. Effects of tebuconazole on reproductive function of male rat. **Journal of Cell and Tissue Research**, v. 5, n. 2, p. 457-460, 2005.

KACKAR, R.; SRIVASTAVA, M. K.; RAIZADA, R. B. Induction of gonadal toxicity to male rats after chronic exposure to mancozeb. **Industrial Health**, v. 35, n. 1, p. 104-111, 1996. ISSN 0019-8366.

LAN, Z.; LABUS, J. C.; HINTON, B. T. Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase catalytic activity and protein level in the initial segment of the rat epididymis by testicular factors: role of basic fibroblast growth factor. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 1, p. 197-206, 1998.

MORAKINYO, A.; BO, Ie.; A., D.. Antifertility effect of calcium channel blockers on male rats: association with oxidative stress. **Advances in Medical Sciences**, v. 56, n. 1, p. 95-105, 2011.

MENEGOLA, E. et al. Effects of mixtures of azole fungicides in postimplantation rat whole-embryo cultures. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 11, p. 1989-1997, 2013. ISSN 0340-5761.

MIRANDA, D.C. **Efeitos dos pesticidas mancozeb e tebuconazol sobre parâmetros testiculares do morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818)**. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal de Viçosa, 2012.

OLIVEIRA, C. A. et al. The antiestrogen ICI 182,780 decreases the expression of estrogen receptor-alpha but has no effect on estrogen receptor-beta and androgen receptor in rat efferent ductules. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 75, 2003.

OLIVEIRA, R. L. et al. Differential expression and seasonal variation on aquaporins 1 and 9 in the male genital system of big fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. **General and comparative endocrinology**, v. 186, p. 116-125, 2013.

REIS, N. R. et al. Morcegos do Brasil. In: (Ed.). **Morcegos do Brasil**: Universidade Estadual de Londrina, 2007.

ROBAIRE, B., HINTON, B. T., ORGEBIN-CRIST, M.C. The Epididymis. p. 1071-1148, 2006.

ROELOFS, M. JE et al. Conazole fungicides inhibit Leydig cell testosterone secretion and androgen receptor activation in vitro. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 271-283, 2014.

SAEZ, F.; FRENETTE, G. SULLIVAN, R.. Epididymosomes and prostasomes: their roles in posttesticular maturation of the sperm cells. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 2, p. 149-154, 2003.

SATO, T. M.; PASSOS, F. D. C.; NOGUEIRA, A. C. Frugivoria de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em *Cecropia pachystachya* (Urticaceae) e seus efeitos na germinação das sementes. **Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)**, v. 48, n. 3, p. 19-26, 2008. ISSN 0031-1049.

SANDERSON, J. Thomas et al. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 182, n. 1, p. 44-54, 2002.

SIPILÄ, P. et al. Differential endocrine regulation of genes enriched in initial segment and distal caput of the mouse epididymis as revealed by genome-wide expression profiling. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 2, p. 240-251, 2006.

SIPILÄ, P. et al. Regional expression of androgen receptor coregulators and androgen action in the mouse epididymis. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 711-717, 2011.

TAXVIG, C., HASS, U., AXELSTAD, M. DALGAARD, M., BOBERG, J., ANDEASEN, H.R. Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. **Toxicology Science**, v. 100, p. 464-473, 2007.

THIMON, V. et al. Region-specific gene expression profiling along the human epididymis. **Molecular Human reproduction**, v. 13, n. 10, p. 691-704, 2007.

VERMA, R. J.. Sperm quiescence in cauda epididymis: a mini-review. **Asian Journal of Andrology**, v. 3, n. 3, p. 181-183, 2001.

ZARN, J. A.; BRÜSCHWEILER, B. J.; SCHLATTER, J. R. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 3, p. 255, 2003.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi mostrado que o ducto epididimário de *Artibeus lituratus* apresentou alterações histomorfométricas nas três regiões avaliadas em animais tratados com os dois fungicidas, mancozeb e tebuconazol.

Foi observado que no tratamento por 30 dias o tebuconazol a presença de inflamação. Nos dois tratamentos com 7 dias foram observadas variações no epitélio epididimário que podem indicar um efeito tóxico dos mesmos sobre o metabolismo de andrógenos e estrógenos.

Essa inferência foi feita a partir das alterações na morfometria e volumetria do epidídimo nas regiões proximais do órgão. Esses resultados necessitam de maior aprofundamento experimental para confirmar o efeito desregulador endócrino nos morcegos que receberam mamão com agente espalhante e os dois fungicidas.

Quando órgãos andrógenos dependentes são afetados, podemos fazer um alerta sobre os riscos da ingestão de fungicidas que podem comprometer a fertilidade e viabilidade dos espermatozoides. Devido a escassez de análises em animais silvestres, outros trabalhos podem fornecer bases para o entendimento mais amplo acerca dos problemas causados por fungicidas a nível sistêmico e fomentar novas abordagens de cultivo agrícola para a conservação da mastofauna.