

MICHELE OLIVEIRA SANTOS

EFEITOS DO INSETICIDA ENDOSSULFAM SOBRE A MORFOLOGIA E
A MORFOMETRIA TESTICULAR EM MORCEGOS FRUGÍVOROS

Artibeus lituratus (OLFERS, 1818)

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

MICHELE OLIVEIRA SANTOS

EFEITOS DO INSETICIDA ENDOSSULFAM SOBRE A MORFOLOGIA E
A MORFOMETRIA TESTICULAR EM MORCEGOS FRUGÍVOROS
Artibeus lituratus (OLFERS, 1818)

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

APROVADA: 17 de fevereiro de 2012.

Mariella Bontempo Duca de Freitas

João Bosco Gonçalves de Barros

Sérgio Luis Pinto da Matta
(Orientador)

*Para ser o que sou hoje, fui vários homens e se volto a
encontrar-me com os homens que fui, não me
envergonho deles.
Foram etapas do que sou.
Tudo o que sei custou às dores das experiências.
Tenho respeito pelos que procuram, pelos que tateiam,
pelos que erram.
E, o que é mais importante, estou persuadido de que
minha luz se extinguiria se eu fosse o único a possuí-la.
Goethe.*

*Cada um de nós
compõe a sua história.
E cada ser em si, carrega o dom de ser capaz...
E ser feliz...
**Almir Sater e Renato
Teixeira.***

DEDICATÓRIA

*É com grande satisfação
que dedico este trabalho
aos meus pais, Geraldo e Marta.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades que me foram dadas na vida, principalmente por ter conhecido pessoas e lugares interessantes, mas também por ter vivido fases difíceis, que foram matérias-primas de aprendizado;

Aos meus Pais Geraldo Soares dos Santos e Marta Oliveira Santos que souberam me dar com dignidade a maior de todas as heranças: o estudo. Amo Vocês!

A toda minha família: avós, tios (as), primos (as) e agregados (as) , pela torcida e apoio;

Ao meu orientador Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta, pela sabedoria, dedicação, amizade, incentivo, ética, transparência, pela paciência e compreensão diante das minhas limitações, enfim não tenho palavras suficientes a dizer, pelo tanto que tenho a agradecer por tudo;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Animal, pela oportunidade de realização deste mestrado;

Ao Programa de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI) pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de estudos;

A Prof.^a Mariella Bontempo Duca de Freitas e o aluno Alessandro Brinati que gentilmente disponibilizaram este material para a realização do trabalho;

A Danielle Barbosa Morais, que forneceu bons momentos de discussão sobre o tema abordado, material de pesquisa, pela ajuda incondicional em todas as etapas desse trabalho, pela parceria;

Aos membros da banca Prof.^a Mariella Bontempo Duca e Prof. João Bosco Gonçalves de Barros por participarem da banca examinadora;

Aos Prof. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho e Prof.^a Juliana Silva Rocha, pelos conselhos, amizade, momentos de descontração e por todas as oportunidades;

As professoras de Graduação, Prof.^a Daniella Chaves Resende e Prof.^a Mariana Machado Neves, pelo exemplo de profissionalismo e ética;

Às alunas de iniciação científica Sendy Moreira Reis e Juliana Mattos Souza Lima;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Estrutural: Ana Carolina Morais, Danielle Barbosa, Maytê Balarini, Ana Paula Matta, Suellen Condessa, Diane Miranda, Alex

Bhering, Sendy Reis, Juliana Mattos, Kyvia Lugatti, Marli Cupertino, Kenner Morais, Daiane Marques, Wagner Gonzaga, Rômulo Novais, Arlete Penitente, Bruna Fontana, Fabíola Araújo, Juliana Silveira, Graziela Domingues, Tatiana Prata, Mário Neto, Stéphanie Valente e Priscila Tótaró, pelos momentos de descontração e convivência;

Aos meus amigos de graduação: Eliane Rodrigues, Daniele Silva, Vanessa Mendes, Priscilla Lana e Alex Carvalho pelo incentivo;

A Nina que sempre me recebia com toda alegria e carinho quando eu retornava para casa em Ipatinga;

Aos funcionários do Departamento de Biologia Animal, Adnilson Brasileiro e Lucia Helena disponibilidade em solucionar problemas burocráticos;

Às minhas companheiras de república: Ana Carolina Marinho, Jovana Azevedo, Leticia Alves, Aline Rocha, Karina Abreu, Janaína Luiza e Evelyze Pinheiro;

Aos professores do Departamento de Biologia Animal: Gisele Mendes Lessa, Jorge Abdala Dergam dos Santos, Ita de Oliveira Silva, Mariella Bontempo Duca de Freitas, Oswaldo Pinto Ribeiro Filho, Renato Neves Feio, Rômulo Ribon e Cristiano Lopes Andrade;

A minha grande amiga Fabiana Braga Lopes, que mesmo morando em Brasília sempre me deu apoio, incentivo e conselhos nos momentos difíceis;

A Ana Carolina Torre e Suellen Silva Condessa que abriram as portas pra mim quando cheguei a viçosa. Serei eternamente grata pelas oportunidades;

Ao Dora's clube : Ana Carolina Torre, Danielle Barbosa Morais, Maytê Koch Balarini, pelos incentivos, força, conselhos, momentos de descontração, viagens, almoços e pelo companheirismo;

A Galera da 4x4: Suellen Condessa, Vanessa Mendes, Eliane Rodrigues e Marcelle Souza pela amizade, paciência e disponibilidade (teremos coisas bonitas pra contar);

A Prof.^a Luzimar por ceder espaço e equipamento para a obtenção das imagens no laboratório de Anatomia Vegetal;

Os amigos Marcos Rodrigues, Maria Angélica, Tâmara Tosato e Priscila Lana, pelos momentos de descontração;

A todos que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho. Muito Obrigada.

BIOGRAFIA

Michele Oliveira Santos, filha de Geraldo Soares dos Santos e Marta Oliveira Santos, nasceu em 12 de abril de 1983, em Ipatinga, Minas Gerais.

Graduou-se como Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em biologia da conservação em dezembro de 2008, pelo Centro universitário do Leste de Minas Gerais UnilesteMG, Ipatinga – MG.

Em março de 2009 iniciou disciplinas como estudante não-vinculado, no programa de Pós Graduação em nível de Mestrado, pela Universidade Federal de Viçosa.

Iniciou o curso de Mestrado em Biologia Animal na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, em Março de 2010, defendendo a dissertação em 17 de fevereiro de 2012.

SUMÁRIO

Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	x
Resumo	xii
Abstract	xiv
1. Introdução	01
2. Revisão de literatura	02
2.1. Considerações sobre a espécie	02
2.2. Agrotóxicos	04
2.2.1. Endossulfam	06
2.3. Testículo	07
2.4. O processo espermatogênico.....	08
2.5. Células de Leydig	10
3. Hipótese	11
4. Objetivos	11
4.1. Objetivos específicos	11
5. Referências Bibliográficas	12
Artigo I: Efeitos do inseticida endossulfam sobre o compartimento tubular e intertubular em testículos de <i>Artibeus lituratus</i> (OLFERS, 1818)	18
Resumo	18
1. Introdução	20
2. Material e Métodos	21
2.1. Área de estudo	21
2.2. Captura coleta, manutenção dos animais	21
2.3. Coleta dos testículos e processamento histológico	23
2.3.1. Índice gonadossomático (IGS)	23
2.3.2. Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes do parênquima testicular.....	23
2.3.3. Índice tubulossomático (ITS)	24
2.3.4. Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos	24
2.3.2. Morfometria das células de Leydig	25

2.3.3. Índice Leydigossomático (ILS)	26
3. Análise estatística	26
4. Resultados	26
5. Discussão	34
6. Conclusões	37
7. Referências Bibliográficas	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de <i>Artibeus lituratus</i> , mostrando a listras brancas faciais e a folha nasal, características da espécie. Barros, 2009	03
Figura 2. Mapa da distribuição geográfica de <i>Artibeus lituratus</i> (Larsen et al., 2007)	04
Figura 3. Estruturas moleculares do α -endossulfam (a), β -endossulfam (b) (Correia, 2005)	06

Artigo I

Figura 1. Imagens do local do experimento: A. Morcegário inserido em meio à mata do Museu de Zoologia (MZJM - UFV); B. Morcegos distribuídos nos grupos experimentais e mantidos em gaiolas de arame galvanizado; C. Mamões mantidos suspensos após imersão na calda; D. <i>A.lituratus</i> se alimentando	22
Figura 2: Secções transversais testiculares de <i>Artibeus lituratus</i> , controle e tratados com espalhante e endossulfam. A: Grupo controle (GC); B: Grupo espalhante (GES); C: Grupo endossulfam I (GEI); D: Grupo endossulfam II (GEII). CT: Compartimento tubular; L: lúmen; I: Intertubulo; ▼: Células de Sertoli; ↓ : Túnica própria. Azul de toluidina - borato de sódio. Barra: 50 μ m ..	28
Figura 3: Secções transversais testiculares de <i>Artibeus lituratus</i> , controle e tratados com espalhante e endossulfam. A: Grupo Controle (GC); B: Grupo espalhante (GES); C: Grupo endossulfam I (GEI); D: Grupo endossulfam II (GEII). T: túbulo seminífero; I: intertúbulo; VS: vaso sanguíneo; CL: células de Leydig; C: citoplasma de célula de Leydig; * espaço linfático; ↓: tecido conjuntivo. Azul de toluidina - borato de sódio. Barra: 20 μ m	31

LISTA DE TABELAS

Artigo I

Tabela 1. Média e desvio padrão dos pesos (g) corporais (PC), testiculares (PTT) e índice gonadossomático (IGS) (%) de <i>Artibeus lituratus</i> em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II)	26
Tabela 2. Pesos (g) da albugínea (PA), do parênquima testicular total (PPT) e percentual de albugínea (A) dos testículos de <i>Artibeus lituratus</i> em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II)	27
Tabela 3. Proporção volumétrica e volumetria entre os componentes do parênquima testicular, em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II)	28
Tabela 4. Percentuais do compartimento tubular representados por lúmen (L), epitélio seminífero (ES) e túnica própria (TP) dos testículos de <i>Artibeus lituratus</i> em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II)	29
Tabela 5. Diâmetro tubular (DT), altura do epitélio seminífero (AES), comprimento dos túbulos seminíferos por testículo (CTST), por grama de testículo (CTSGT) e comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS) de testículos de <i>Artibeus lituratus</i> em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II)	29
Tabela 6. Proporções volumétricas (%) entre túbulos seminíferos (TS) e intertúbulo (INT) e volume (mL) dos túbulos seminíferos (VTTS) e do intertúbulo (VTI) nos testículos de <i>Artibeus lituratus</i> , em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II)	30
Tabela 7. Percentual de célula de Leydig (CL), vasos sanguíneos (VS), espaço linfático (EL) e tecido conjuntivo (TC) no compartimento intertubular dos testículos de <i>Artibeus lituratus</i> em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE	

I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II)	31
Tabela 8. Percentual de célula de Leydig (CL), vasos sanguíneos (VS), espaço linfático (EL), tecido conjuntivo (TC) e de intertúbulo (INT) no testículo de <i>Artibeus lituratus</i> em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II)	32
Tabela 9. Valor médio do volume total (mL) das células de Leydig (CL), vaso sanguíneo (VS), espaço linfático (EL), tecido conjuntivo (TC) e de intertúbulo (INT) dos elementos do compartimento intertubular por parênquima testicular de <i>Artibeus lituratus</i> em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II)	32
Tabela 10. Morfometria das células de Leydig: diâmetro nuclear (DNCL), percentuais (%) de núcleo (NCL) e citoplasma de CL (CCL), volumes (mL) de núcleo (VNCL) e citoplasma (VCCL) de CL e volume (mL) de CL (VCL) nos testículo de <i>Artibeus lituratus</i> em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II)	33
Tabela 11. Número total de células de Leydig (NTL), número de CL por grama de testículo (NGT) e índice leydigossomático (ILS) em <i>Artibeus lituratus</i> em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II)	34

RESUMO

SANTOS, Michele Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Efeitos do inseticida endossulfam sobre a morfologia e a morfometria testicular em morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* (OLFERS, 1818)**. Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta. Coorientadores: Juliana Silva Rocha e Oswaldo Pinto Ribeiro Filho.

No Brasil, é introduzida no ambiente grande quantidade de produtos agroquímicos usados para destruir ou impedir a ação de pragas e organismos que atacam as lavouras, de forma direta ou indireta. Há relatos sobre o declínio de diversas populações de animais silvestres em consequência da contaminação de seus habitats por estes pesticidas. Os morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* são eficientes dispersores de sementes em regiões tropicais e subtropicais, desempenhando relevante papel no equilíbrio dos ecossistemas nestas regiões eles proporcionam valiosa perspectiva para comparação dos padrões de contaminação em mamíferos, por serem altamente móveis e por ocuparem uma posição privilegiada na cadeia alimentar. O endossulfam é um inseticida e acaricida muito utilizado com ação por contato e ingestão. Apesar de seu grande espectro de ação, é bem tolerado por uma série de insetos benéficos e tem se mostrado efetivo para uma grande variedade de pragas. Contudo, estudos demonstrando sua ação sobre a fisiologia de morcegos são necessários, principalmente sobre a biologia reprodutiva desses animais, particularmente com relação ao seu ciclo reprodutivo. Objetivou-se neste estudo, avaliar os efeitos toxicológicos do inseticida endossulfam sobre a morfologia e a morfometria testicular em morcegos frugívoros *A. lituratus*. Foram capturados 26 morcegos *A. lituratus* machos adultos em remanescentes de Mata Atlântica na Região de Viçosa, MG, através de redes (*mist nets*). Eles foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: controle 1 (GC): alimentados com mamões sem endossulfam; espalhante 2 (GES): alimentados com mamões expostos ao espalhante adesivo Wil Fix, numa calda com concentração 0,015g/L; endossulfam 3 (GE I): alimentados com mamões expostos ao endossulfam numa calda com concentração de 1,05 g/L; endossulfam 4 (GE II): alimentados com mamões expostos endossulfam numa calda com concentração de 2,1 g/L. Após a captura, os animais foram mantidos em gaiolas por um período de cinco semanas, no Morcegário do Museu de Zoologia do Departamento de Biologia Animal da UFV. Após decapitação, os testículos foram coletados, pesados e então processados para histologia de rotina em historesina. Imagens das preparações foram

obtidas e, a partir delas, foi conduzido um estudo da morfometria e estereologia tubular e intertubular. Foram avaliados: o diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero, a proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular e do compartimento intertubular, o comprimento total dos túbulos seminíferos e os índices gonadossomático (IGS), leydigossomático (ILS) e tubulossomático (ITS), além da volumetria de células de Leydig. Todas as análises foram feitas utilizando-se o software Image-Pro Plus 4.5[®]. Os dados foram submetidos a ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Student -Newman-Keuls a 5%. Não houve diferença significativa entre os valores das biometrias corporais, testiculares e IGS dos morcegos tratados durante todo o período experimental. Houve aumento do peso da albugínea nos animais do grupo tratado com a maior dose (GEII) com relação ao controle e GES. Foi observado menor percentual de célula de Leydig nos animais do GEII em relação aos animais dos outros grupos. O espaço linfático por intertúbulo foi maior nos animais dos grupos tratados. Todos os grupos tratados apresentaram aumento no percentual de núcleo e redução do citoplasma de células de Leydig. Houve também redução do volume de citoplasma da célula de Leydig em GEII. Não houve alterações no número de células de Leydig por testículo, por grama de testículo e no índice Leydigossomático. A ausência de alterações tubulares e intertubulares em *A. lituratus* permite-nos concluir que o endossulfam, na forma de oferecimento e no período avaliado, não interfere nos padrões espermatogênicos dessa espécie de morcego.

ABSTRACT

SANTOS, Michele Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Effects of the endosulfan on the testicular morphology and morphometry in fruit bats *Artibeus lituratus* (OLFERS, 1818)**. Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-advisers: Juliana Silva Rocha and Oswaldo Pinto Ribeiro Filho.

Large amounts of agricultural chemicals are discharged into the environment in Brazil. These pesticides are often used to destroy or impair the activity of organisms that attack crops. There are some reports in the literature concerning the decline of many wildlife populations as a result of contamination of their habitats by pesticides. One of the putative affected species is the fruit bat *Artibeus lituratus*, which are efficient seed dispersers along tropical and subtropical regions, where they occur, helping in the balance of ecosystems in these regions. Furthermore, they can provide valuable insights on the patterns of contamination in mammals in general, because they are highly mobile and occupy a privileged position on the food chain. Endosulfan is a widely used insecticide and acaricide, and acts by contact and ingestion. Despite its broad spectrum of action, endosulfan is well tolerated by a number of beneficial insects and has been proven effective against a wide variety of pests. Nonetheless, studies showing its effect on the physiology of bats are needed, especially on the reproductive biology of these animals. The aim of this study was to evaluate the toxicity of the insecticide endosulfan on testicular morphology and morphometry in fruit bats *A. lituratus*. Twenty-six *A. lituratus* adult male bats were captured from Atlantic Forest remnants in the region of Viçosa, State of Minas Gerais, Brazil, using mist nets and kept in cages in an Animal House at the Museum of Zoology, Department of Animal Biology of UFV. They were randomly divided into 4 groups: 1) control (GC): receiving papaya without endosulfan; 2) spreader (GES): receiving papaya exposed to adhesive spreader Wil Fix, in a solution with concentration 0.015 g / L; 3) endosulfan (GE I): receiving papaya exposed to an endosulfan solution with a concentration of 1.05 g / L; and 4) endosulfan (GE II): receiving papaya exposed to an endosulfan solution with a concentration of 2.1 g / L. Treatment lasted 35 days, after that, animals were euthanized and the testes were collected, weighed and then processed for routine histology in glycol methacrylate. Testis morphometry and stereology of both tubular and intertubular compartments were performed using images obtained from histological slides. The

parameters evaluated were: seminiferous tubules diameter and seminiferous epithelium height, the volumetric proportion of the testicular parenchyma components and intertubular compartment, the total length of seminiferous tubules and the gonadosomatic (GSI), leydigosomatic (ILS) and tubulossomatic (ITS) indices, plus, the Leydig cell volume. All the measurements were performed using the software Image-Pro[®] Plus 4.5. Data was analyzed using ANOVA and Student-Newman-Keuls test to compare means, level of significance was 5%. The results on the biometric parameters of body and testes were not significantly different among groups. Weight of albuginea was increased in the group treated with the highest dose (GE II) compared to control and GES. We found a lower percentage of Leydig cells in the animals of GE II in comparison to the other groups. The lymphatic space was greater in the groups GES, GE I and GE II, compared to control. These groups GES, GE I and GE II showed an increase in the percentage of the nucleus and a reduction in the cytoplasm of Leydig cells. There was a reduction in volume of Leydig cell cytoplasm in GE II. There were no differences in the number cell of Leydig cells per testis and per gram of testis, also in the Leydigosomatic index. The lack of changes in tubular and intertubular spaces in *A. lituratus* indicates that the endosulfan, at the concentrations used and the duration of this experiment, did not interfere with spermatogenic patterns of this bat species.

1. INTRODUÇÃO

O rápido desenvolvimento industrial ocorrido no século XX, principalmente, após a Segunda Guerra Mundial, resultou não apenas no marcante crescimento da produção de medicamentos, fibras sintéticas, pesticidas e compostos químicos industriais como também na liberação dessas substâncias no ambiente (Mello, 2007). A intensificação da exploração agrícola se deu a partir de 1960, acarretando o aumento na produção e utilização de pesticidas no combate a pragas da lavoura (Ecobichon, 1996). Em busca de uma solução rápida e economicamente viável para diminuir a perda de frutas pelo ataque de insetos e doenças causadas por fungos e bactérias, produtores se utilizam de compostos químicos que acabam sendo carregados para o solo e corpos d'água. Estes resíduos podem ser encontrados nos alimentos e na água para o consumo oferecendo riscos à saúde do homem e de outros organismos não alvos, como os morcegos. Vale resaltar que, os pesticidas são rotineiramente utilizados em culturas agrícolas, sem controle na sua aplicação e sobre seus efeitos na natureza (Carvalho, 2006; Camargo & Alonso, 2006).

A contaminação dos ecossistemas por poluentes orgânicos persistentes que são compostos estáveis e que persistem no ambiente, resistindo à degradação química, fotolítica e biológica, pode ser de difícil avaliação sem conhecimentos comparativos ou experimentais para interpretar dados referentes à ação de resíduos químicos (O'Shea *et al.*, 2000). Neste contexto, tem sido relatada a ocorrência de declínio de diversas populações de animais silvestres em consequência da contaminação de seus habitats por pesticidas (Thies & McBee, 1994). Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos experimentais para avaliar e identificar as possíveis implicações decorrentes da exposição aos agrotóxicos, no que se refere a seus efeitos no desenvolvimento animal, potencial neurotoxicidade e efeitos genotóxicos (O'Shea *et al.*, 2000).

O endossulfam é um inseticida e acaricida, com ação de contato e ingestão, desenvolvido pelo laboratório da Hoechst AG em 1952 sendo, desde então, utilizado em larga escala no mundo. Apesar de seu grande espectro de ação, é bem tolerado por uma série de insetos benéficos e tem se mostrado efetivo para uma grande variedade de insetos das ordens Hemiptera, Lepidoptera, Homoptera, Coleoptera, Isoptera, Thysanoptera e Orthoptera, que são as de maior importância agrícola, além de ácaros (Brooks, 1976; Huttenbach, 1982).

Apesar da grande importância para o ambiente como dispersores de sementes e controladores de insetos, algumas espécies de morcegos acabam sendo consideradas

nocivas por fruticultores e responsáveis por perdas na produção de frutas, uma vez que morcegos frugívoros são comumente vistos em pomares, devido à abundância de alimento e, em alguns casos, pela destruição do seu ambiente natural (Larini, 1999).

Existem evidências de que a exposição a determinadas substâncias químicas contribui para o surgimento de distúrbios do sistema reprodutor masculino de animais, incluindo alterações estruturais e funcionais, tais como, inibição na biossíntese de andrógenos nos testículos de ratos adultos quando administradas diferentes doses de endossulfam (Singh & Pandey, 1990; Gray, 1998; Chitra *et al.*, 1999). Portanto, estudos dos efeitos dos contaminantes ambientais que interferem nas funções reguladas pelo sistema endócrino e no sistema reprodutivo é de grande interesse. Em morcegos, no entanto, trabalhos relacionando os efeitos do endossulfam sobre parâmetros morfofuncionais testiculares ainda são escassos, sendo importante seu estudo para o conhecimento dos efeitos desta substância sobre a fertilidade destes animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE

Os morcegos são mamíferos pertencentes à Ordem Chiroptera, a qual representa um grupo muito versátil devido sua à diversidade de formas, adaptações e hábitos alimentares, bem como de distribuição geográfica (Brusco *et al.*, 2009). A ordem Chiroptera compreende o segundo maior grupo de mamíferos em número de espécies, representando 25% desta classe de animais (Altringham, 1996). Esta grande distribuição é explicada pela característica única dentre os mamíferos: o voo. Em morcegos, os braços e os dedos são alongados e unidos por uma membrana, o quiropatágio. Esta membrana resistente, associada a modificações nos sistemas muscular e esquelético, fornecem suporte para o voo (Nowak, 1994).

Segundo Reis *et al.* (2007), são conhecidas no Brasil 9 famílias de morcegos, englobando 64 gêneros e 167 espécies. Os morcegos possuem reconhecidamente grande importância na regulação dos ecossistemas tropicais, representando, em algumas áreas, de 40% a 50% das espécies de mamíferos naquele local (Patterson *et al.*, 1972; Timm, 1994).

A ordem Chiroptera é dividida em duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera. Na subordem Megachiroptera são encontrados os maiores morcegos do mundo, os quais chegam a 2 metros de envergadura, distribuídos exclusivamente nas

regiões tropicais do Velho Mundo (Ásia e África) e Oceania, compreendendo apenas 1 família (Pteropodidae), com 42 gêneros e 185 espécies. A subordem Microchiroptera está amplamente distribuída por todo o globo, exceto nos pólos, envolvendo 17 famílias, 157 gêneros e mais de 928 espécies, com os mais variados hábitos alimentares, podendo ser frugívoros, insetívoros, nectarívoros, piscívoros e hematófagos e, com frequência, dependem da ecolocalização para navegação e para encontrar presas (Simmons, 2005; Reis *et al.*, 2007).



Figura 1. Exemplar de *Artibeus lituratus*, mostrando a listras brancas faciais e a folha nasal, características da espécie.

No Brasil, a família Phyllostomidae representa o maior número de espécies (90) (Marinho-Filho, 1996). A principal característica para o reconhecimento dos morcegos desta família é a presença de um apêndice nasal, conhecido também como folha nasal, caracterizada por uma protuberância carnosa do nariz com forma lanceolada, podendo ser longa, e ultrapassar a cabeça do animal em tamanho em algumas espécies, ou ainda ser bem reduzida em outras (Nowak, 1994). Dentro da família Phyllostomidae, a espécie *Artibeus lituratus* (OLFERS, 1818), (Figura 1) pertencendo à subfamília Stenodermatinae, tem ampla distribuição nas regiões neotropicais, ocorrendo do oeste do México até o norte da Argentina, Bolívia, Trinidad e Tobago, pequenas Antilhas, Ilhas Três Marias e em todas as regiões do Brasil (Figura 2) (Eisenberg & Redford, 1999; Reis *et al.*, 2007; Zortéa, 2007). Pode ser encontrada em altitudes que variam desde o nível do mar até 2.000 m. No Brasil, está representada em todas as regiões e biomas, sendo uma importante espécie dispersora de sementes e formadora de florestas, por apresentar uma dieta variada, embora a frugivoria predomine como hábito principal, com consumo de uma grande variedade de frutos. É considerada uma espécie de grande

porte, com antebraço podendo passar de 75 cm e peso acima de 75 g (Bredt *et al.*, 1996; Reis *et al.*, 2007). O *A. lituratus* apresenta quatro listras brancas na cabeça, um apêndice nasal na face e diversas verrugas no lábio inferior, características que facilitam sua identificação taxonômica. Seu vôo é característico: baixo com manobras ascendentes e descendentes em forma de “clave de sol” ou de “oito invertido” (∞) (Pacheco *et al.*, 2010). Os animais dessa espécie vivem em grupos pequenos (oito indivíduos) ou grandes (mais de 30 indivíduos), habitando árvores copadas, cavernas, frestas entre rochas, ocos de árvores, telhados (Esbérard *et al.*, 2006), ou formando tendas com as folhas de palmeiras, as quais são cortadas com os dentes (Zortéa *et al.*, 1994). Eles vivem tanto em áreas bem conservadas quanto em ambientes impactados, como é caso das cidades (Sazima *et al.*, 1994). Esta espécie não é considerada ameaçada de extinção (IUCN, 2011).

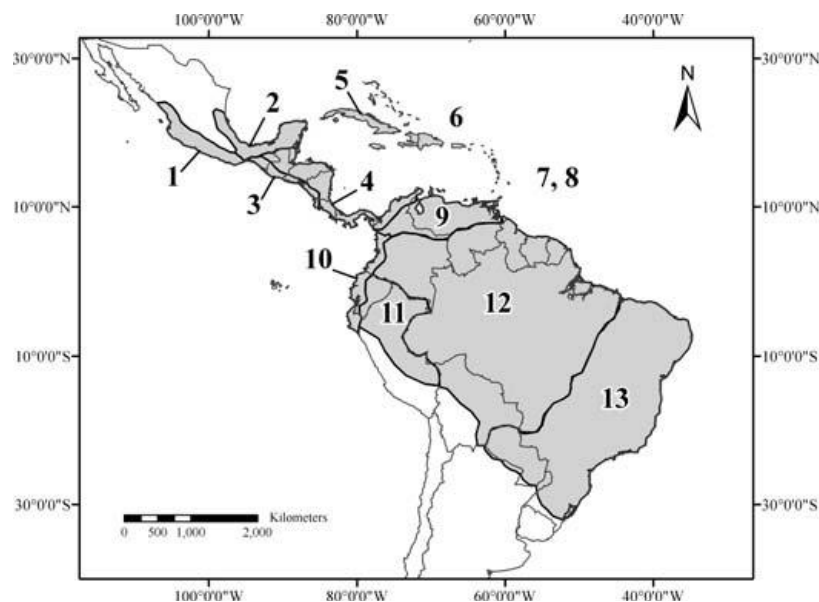


Figura 2. Mapa da distribuição geográfica de *Artibeus lituratus* (Larsen *et al.*, 2007).

2.2. AGROTÓXICOS

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2011), agrotóxico é uma substância ou mistura de substâncias destinada a impedir a ação, matar ou controlar uma praga a organismos que atacam lavouras, em sentido amplo, que possa oferecer risco ou incômodo às populações e ao ambiente. Segundo Cerqueira (2005), o crescimento da utilização de agrotóxicos é alarmante: o relatório das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação mostra que o Brasil lidera este ranking como o maior consumidor de agrotóxico do mundo (OMS, 2011). Existem cerca de 15.000 formulações para 400

agrotóxicos diferentes, sendo que cerca de 8.000 formulações encontram-se licenciadas no Brasil (Couto, 2006). Os agrotóxicos podem ser classificados de diferentes formas, de acordo com a finalidade, modo de ação, persistência, deslocamento, duração do efeito do tratamento, toxicidade, origem ou grupo químico. Uma das classificações mais importantes é a toxicidade do praguicida. A classificação toxicológica é baseada na identificação do componente de risco referente a uma substância química, e diferencia a toxicidade dos agrotóxicos com base no ingrediente ativo e sua formulação (Larini, 1999). Os organoclorados são compostos com propriedades físico-químicas semelhantes, são lipofílicos, à base de carbono com radicais de cloro e altamente resistentes aos mecanismos de decomposição dos sistemas biológicos. Seu uso está proibido ou severamente restringido em diversos países, como União Européia e várias nações ao Oeste da África e Ásia. De acordo com cronograma estabelecido pela ANVISA (2010), o endossulfam não poderá ser comercializado, no Brasil, a partir de 31 de julho de 2013. A partir de 2011, o produto não pode mais ser importado, e a fabricação em território nacional será proibida a partir de 31 de julho de 2012. Alguns dos principais e mais conhecidos compostos organoclorados com atividade inseticida são: Hexaclorobenzeno (BHC), lindano, aldrin, dieldrin, heptacloro, endossulfam, Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), dodecacloro e toxafeno (Santos, 2007).

Uma das maiores preocupações na atualidade é a degradação ambiental progressiva, cujos sinais já são evidentes colocam a população mundial em estado de alerta (Branco, 1990). Os agrotóxicos dão uma contribuição significativa à degradação ambiental, pois além das pragas, outros organismos também são atingidos, levando a desequilíbrios biológicos e ecológicos (Macêdo, 2002). Embora produzam resultados positivos no controle de pragas (fungos, insetos, ácaros etc.), seus efeitos danosos em animais que não interferem no processo de produção (espécies não alvo) não devem ser excluídos (Jonsson, 1991). Os agentes químicos podem afetar o ciclo reprodutivo destas espécies em qualquer das suas diferentes fases. Um agente químico pode, por exemplo, impedir ou inibir temporariamente a reprodução, pode ainda causar defeitos de desenvolvimento na prole exposta. Desta forma os estudos de toxicidade reprodutiva têm que ser igualmente abrangentes para que se possam detectar diferentes tipos de comprometimento do ciclo reprodutivo (Mello, 2007).

2.2.1. ENDOSSULFAM

O endossulfam é um inseticida e acaricida organoclorado com ação por contato ou ingestão (Maier-Bode, 1968; Azevedo, 1998), sendo amplamente utilizado na agricultura como um pesticida para proteger culturas de algodão, cereais, árvores frutíferas e culturas como chá e café (Toxicological Profile, 2000). Desenvolvido pela Hoechst Aktiengesellschaft na Alemanha (Goebel *et al.*, 1982), o ingrediente ativo do endossulfam consiste na mistura de dois isômeros, sendo 70% α -endossulfam e 30% de β -endossulfam (Figura 3) (Lehr, 1992).

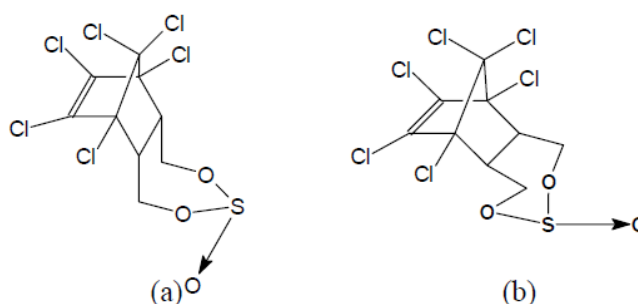


Figura 3. Estruturas moleculares do α -endossulfam (a), β -endossulfam (b) (Correia, 2005).

O produto organoclorado Endosulfan AG (1,4,5,6,7,7 - hexachloro 8,9,10 - trinorborn-5-2,3-ylenebismethylene), tido como desregulador endócrino, demonstrou inibição na biossíntese de andrógenos nos testículos de ratos adultos quando administradas doses de 7,5 e 10 mg / kg de peso corporal, consecutivamente por 15 e 30 dias (Singh & Pandey, 1990; Chitra *et al.*, 1999). Chintre e colaboradores (1999) também relataram uma diminuição nas concentrações plasmáticas de gonadotrofinas e testosterona em morcegos expostos a diferentes concentrações de endossulfam, especialmente após exposição mais prolongada, assim como alteração na atividade de enzimas esteroidogênicas, como a 3- α 17- β -hidroxiesteróide desidrogenase. Sing & Pandey (1990) observaram diminuição significativa nos conteúdos e atividades microsossomais do citocromo P 450 e oxidases de função mista nos testículos de ratos tratados com endossulfam, juntamente com uma acentuada inibição da atividade da enzima citosólica conjugação-glutationa S- transferase, em duas as doses estudadas. Estas alterações foram revertidas quando o tratamento com endossulfam foi retirado. A exposição de ratos SD-CD, machos e fêmeas, por duas gerações, ao endossulfam técnico (97% de pureza), em concentrações de 0, 3, 15 e 75 ppm da dieta,

aproximadamente iguais a 0,2 , 1,0 e 6,0 mg/kg peso/dia, não causou efeitos nocivos sobre a reprodução, pois não foram relatados efeitos sobre o desempenho reprodutivo ou sobre a descendência que fossem relacionados ao composto ou às doses utilizadas (Edwards *et al.*, 1984).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010), o agrotóxico endossulfam, considerado altamente tóxico e associado a problemas reprodutivos e do sistema endócrino, será banido do País a partir de 31 de julho de 2013. O endossulfam é usado no Brasil no cultivo de algodão, cacau, café, cana-de-açúcar e soja. Porém, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (Para) da ANVISA, identificou presença do produto em 14 de 20 culturas analisadas, sendo que em nenhuma delas o uso do endossulfam era permitido.

2.3. TESTÍCULO

O testículo, um órgão de funções endócrina e exócrina, tem na sua estrutura uma cápsula de tecido conjuntivo denso não modelado, denominada túnica albugínea. Internamente ele é constituído por um compartimento tubular e um intertubular. O primeiro é constituído pelos túbulos seminíferos, com suas células germinativas e de Sertoli, onde são produzidos os espermatozoides. O segundo compartimento é constituído por vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, tecido conjuntivo e células de Leydig, produtoras de andrógeno. O testículo apresenta estrutura similar para várias espécies de mamíferos, estrutura esta altamente conservada em vertebrados, variando, em geral somente, a proporção volumétrica de seus componentes (Fawcett *et al* 1973; Banks, 1992; Junqueira & Carneiro, 2008). Os túbulos seminíferos têm sua parede formada por um epitélio germinativo ou epitélio seminífero, envolvido por uma lâmina basal, por uma bainha de tecido conjuntivo e por células mióides. A camada aderida à lâmina basal consiste em células mióides achatadas com capacidade contrátil (Junqueira & Carneiro, 2008). Os elementos componentes do compartimento intertubular são as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, fibras do tecido conjuntivo e uma população celular variável, constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Russell *et al.*, 1990; Setchell, 1991).

Segundo França & Russell (1998), existe uma relação direta entre o peso testicular e a produção espermática: quanto maior o testículo, maior a produção de espermatozóides. Porém a quantidade de espermatozóides produzidos é sempre maior que o número necessário para a fecundação e não necessariamente, o tamanho do

testículo acompanha proporcionalmente o tamanho corporal, uma vez que os animais de grande porte produziram um enorme excedente.

2.4. O PROCESSO ESPERMATOGÊNICO

A espermatogênese é um processo sincrônico e regular de diferenciação celular, pelo qual uma espermatogônia sofre várias divisões e diferenciação e termina por originar uma célula haploide altamente especializada, o espermatozoide. Este processo, que ocorre nos túbulos seminíferos, dura em torno de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos estudados. Esta diferenciação envolve três classes de células germinativas: as espermatogônias, os espermatócitos e as espermátides. Nos machos adultos, a espermatogênese é um processo contínuo que pode ser dividido em três fases distintas: a mitótica, a meiótica e a espermiogênese, cada uma delas caracterizada por mudanças morfológicas e bioquímicas dos componentes do citoplasma e núcleo celular. Baseando-se em aspectos morfológicos e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: fase I- fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas, mantendo seu número basal; fase II- fase meiótica ou espermatocitária, onde o material genético é duplicado, e passa por recombinação e segregação gênica, levando à formação de células haploides, as espermátides; e fase III- fase de diferenciação ou espermiogênica, na qual as espermátides passam por complexa série de transformações citológicas, tais como formação do acrossoma e do flagelo e condensação nuclear, resultando na produção de células muito especializadas. Finalmente, as espermátides maduras serão liberadas para o lume tubular, passando então a se chamar espermatozoides, marcando, assim, o final da espermatogênese (Russell *et al.*, 1990; Sharpe, 1994; França & Russell, 1998).

O epitélio seminífero compõe-se de três camadas de gerações distintas de células germinativas, sustentadas morfofisiologicamente por um tipo de célula somática denominada célula de Sertoli. No ambiente basal do epitélio seminífero, observam-se as espermatogônias e células em pré-leptóteno; na região intermediária encontram-se as gerações de espermatócitos em leptóteno e no ambiente adluminal localizam-se os espermatócitos primários em meiose I, os espermatócitos secundários e as espermátides (Russell *et al.*, 1990). As espermatogônias podem ser classificadas em duas categorias básicas: indiferenciadas e diferenciadas. As espermatogônias isoladas (A_{is}), pareadas (A_{pr}) e alinhadas (A_{al}) pertencem à primeira categoria. As espermatogônias do tipo A, espermatogônia intermediária (In) e espermatogônia do tipo B pertencem à segunda

categoria e estão comprometidas com a formação de espermatozóides (De Rooij, 1998). As espermatogônias podem ser identificadas com base na morfologia, dinâmica e volume do núcleo, número de nucléolos por núcleo, posição topográfica em relação a outras células e a lâmina basal, e a disposição dos cromossomos durante a divisão (Clermont & Antar, 1973). A espermatogênese inicia-se com a célula germinativa primitiva, a espermatogônia A, que é a célula fonte, localizada junto à membrana basal. As espermatogônias se dividem por mitose e as células neoformadas podem continuar a dividir e originar novas espermatogônias ou cessar a divisão e crescer, originando os espermatócitos, células que entram em meiose (Kierszenbaum, 2008; Junqueira & Carneiro, 2008). A meiose compreende duas divisões: as células da primeira divisão são chamadas de espermatócitos primários (I) e as da segunda, espermatócitos secundários (II). Os espermatócitos I são as maiores células da linhagem espermatogênica e caracterizam-se pela presença de cromossomos em diferentes fases de condensação. Os espermatócitos II ficam mais próximos da luz dos túbulos seminíferos sendo difícil observá-los em cortes histológicos, pois entram logo na segunda divisão meiótica. Desta divisão resultam as espermatídes, células que são caracterizadas pelo pequeno tamanho, núcleos com zona de cromatina condensada e por sua localização próxima à luz dos túbulos seminíferos (Junqueira & Carneiro, 2008; Kierszenbaum, 2008). Estas células possuem a forma inicialmente arredondada (Clermont, 1972; Russell *et al.*, 1990) e depois que são formadas, uma série de mudanças morfológicas, histoquímicas e bioquímicas vão ocorrer em seu núcleo e componentes do citoplasma (Guraya, 1987). Esta fase de mudanças é denominada espermiogênese, e vai culminar com a formação de células haplóides altamente diferenciadas e especializadas que são os espermatozoides. Em seguida, ocorre a espermição, quando os espermatozoides formados são liberados para o lume dos túbulos seminíferos (Menezes, 2006).

Durante o processo espermatogênico as células de Sertoli e as células germinativas, interagem de maneira bastante complexa, tanto física quanto bioquimicamente. Existem diversas formas de junções intercelulares entre estes dois tipos de células, incluindo-se desmossomos, junções comunicantes, junções adesivas, conhecidas como especializações ectoplasmáticas e os complexos túbulo bulbares. A interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente células de Sertoli, células de Leydig e células mióides, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente (Skinner, 1994; Dadoune & Demoulin, 1993; Jégou, 1993; Spiteri-Grech & Nieschlag, 1993; Pescovitz *et al.*, 1994; Russell *et al.*, 1994; Schlatt *et al.*, 1997; França & Russell, 1998).

2.5. CÉLULAS DE LEYDIG

Distribuídas no tecido conjuntivo frouxo, no espaço intertubular do parênquima testicular, estão as células produtoras de esteróides denominadas células de Leydig. São células relativamente grandes, poliédricas e limitadas pela membrana plasmática que usualmente contém microvilos. Seu núcleo está localizado excêntricamente no citoplasma com um a três nucléolos, usualmente de formato arredondado ou oval. Grânulos de heterocromatina formam uma camada intimamente associada ao envoltório nuclear, sendo uma característica universal destas células.

Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica (%) dos diferentes componentes do compartimento intertubular, de maneira geral a célula de Leydig é o tipo celular mais abundante neste compartimento (Russell, 1996; Godinho, 1999).

Nos testículos dos mamíferos, as células de Leydig sintetizam andrógenos que incluem a testosterona e a diidrotestosterona. A testosterona é requerida em altas concentrações nos testículos a fim de sustentar a espermatogênese nos túbulos seminíferos, promover a diferenciação do trato genital masculino, além de promover e manter os caracteres sexuais secundários. Particularmente, a diidrotestosterona é responsável pela manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo (Luke & Coffey, 1994; Fan & Robaire, 1998; Goyal *et al.*, 1999). A síntese de testosterona é controlada por hormônio luteinizante (LH) produzido pela hipófise (Colleta & Carvalho, 2005).

3. HIPÓTESE

A exposição a doses ambientais do pesticida endossulfam por 35 dias causa alterações morfológicas nos testículos e no processo espermatogênico de *Artibeus lituratus*.

4. OBJETIVO

Avaliar os efeitos da exposição ao pesticida organoclorado endossulfam nas doses de 1,05 g/L = 0, 105% e 2,1 g/L = 0,21% por 35 dias de exposição sobre a morfologia e morfometria testicular em morcegos frugívoros *Artibeus Lituratus* (OLFERS, 1818).

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da exposição ao endossulfam sobre:

- O índice gonadossomático (IGS);
- A proporção volumétrica e volume dos componentes do parênquima testicular;
- O diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero;
- O comprimento dos túbulos seminíferos por testículo, por grama de testículo e comprimento total dos túbulos seminíferos;
- O índice tubulossomático (ITS);
- A proporção nucleoplasmática de células de Leydig;
- O volume nuclear, citoplasmático e celular de Leydig;
- O volume de células de Leydig por testículo;
- O número total de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;
- O índice Leydigossomático (ILS).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altringham, J. D. 1996. Bats, Biology and Behaviour. **Oxford University Press: University of Leeds, New York.**

Anvisa. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). 2010. **Agrotóxico endossulfam será banido no Brasil em 2013; demora é criticada.** Disponível em < <http://www.estadao.com.br/noticias/impreso,agrotoxico-endosulfam-sera-banido-no-brasil-em-2013-demora-e-criticada,581365,0.htm> >. Acesso em: Dezembro de 2011.

Azevedo, F. A. 1998. Breves referências aos aspectos toxicológicos do endossulfam. **TECBAHIA. Revista Baiana de Tecnologia.** 1(13): 142 -164.

Banks, W. J. 1992. Histologia Veterinária Aplicada. **Editora Manole. São Paulo:** 2ed. p.629.

Branco, S. M. 1990. Natureza e Agroquímicos. **Editora Moderna. Coleção Desafios. São Paulo.** p.90.

Bredt, A. I.; Araújo, F. A.; Caetano Jr, J.; Rodrigues, M. G. R.; Yoshizawa, M.; Silva, M. M. S.; Harman, N. M. S.; Massunaga, P. N. T.; Bürer, S. P.; Porto, V. A. R.; Uieda, W. 1996. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. **Brasília: Fundação Nacional de Saúde / Ministério da Saúde.**p. 117.

Brooks, G. T. 1976. Chlorinated insecticides: biological and environmental aspects. **Boca Raton: CRC Press.** p.197.

Brusco, A. R.; Tozato, H. C. 2009. Frugivoria na dieta de *Artibeus lituratus* Olfers, 1818 (CHIROPTERA, PHYLLOSTOMIDAE) no Parque do Ingá, Maringá / PR. **FAP Ciência.** Apucarana-PR. 2(3): 19-29.

Camargo, J. A.; Alonso, A. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. **Environment International - Elsevier.** 32: 831-849.

Carvalho, F. P. 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environmental Science & Policy - Elsevier.** 9: 685-692.

Cerqueira, A. **Resíduos na produção da mandioca ainda prejudicam meio ambiente.** Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas - SEBRAE. Alagoas, abr . 2005 . Disponível em: < [http://www.al.sebrae.com.br/conexao/VisualizarConteudo .asp?CodConteudoConexao=1056&Codpasta=149](http://www.al.sebrae.com.br/conexao/VisualizarConteudo.asp?CodConteudoConexao=1056&Codpasta=149)>. Acesso em: Dezembro 2011.

Chitra, K. C.; Latchoumycandean, C.; Mathur, P. P. 1999. Chronic effect of endosulfam on the testicular functions of rat. **Asian Journal of Androl.** 1: 203-206.

Clermont, Y.; Antar, M. 1973. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey (*Macaca arctoides*). **American Journal of Anatomy.**136:153-166.

Colleta, H. H. M. D.; Carvalho, H. F. 2005. Células de Leydig. In: Carvalho, H. F.; Colares-Buzato, C. B., (eds). *Células: Uma abordagem multidisciplinar*. Editora Manole: São Paulo. p.325-334.

Couto, J. L. V. **Riscos na aplicação de agrotóxicos**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ. Seção de Segurança do trabalho na área rural. Seropédica, 2006. Disponível em: <<http://www.ufrj.br/institutos/it/de/acidentes/agrotx.htm>>. Acesso em: Dezembro 2011.

Dadoune, J. P.; Demuolin, A. 1993. Structure and functions of the testis. In: Thibault, C., Levasseur, M. & Hunter, R. H. F. (Eds). *Reproduction in mammals and man*. Paris: Ellipses. Cap.13. p 227-250.

De Rooij, D. G. 1998. Stem cells in the testis. **International Journal of Experimental Pathology**. 79: 67-80.

Ecobichon, D. J. 1996. Toxic effects of pesticides. In: Klassen, C. D. Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons. New York: McGraw-Hill. 643-689.

Edwards, J.A.; Reid, Y.L.; Offer, J. M.; Almond, R.H.; Gibson, W.A. 1984. Effects of endosulfan-technical on reproductive function of multiple generations in the rat. Submitted to WHO by Hoechst AG. England. Huntingdon Research Centre, (Unpublished report N. A29428; Huntingdon Report N. HST 204/83768).

Eisenberg, J. F.; Redford, K. H. 1999. Mammals of the Neotropics. Vol. 3, The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. Chicago: University of Chicago. p.609.

Esbérard, C. E. L.; Nogueira, T. J.; Luz, J. L.; Melo, G. G. S.; Mangolin, R.; Jucá, N.; Raices, D. S. L.; Enrici, M. C.; Bergallo, H. G. 2006. Morcegos da Ilha Grande, Angra dos Reis, Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecias**. 8: 147-153.

Fan, X.; Robaire, B. 1998. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology*. 2: 2128-2136.

Fawcett, D. W.; Neaves, W. B.; Flores, M. N. 1973. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biology of Reproduction**. 9: 500-532.

França, L.R.; Russell, L.D. 1998. The testis of domestic mammals. In: Regadera, J. and Martinez-Garcia, F. (Eds.). *Male Reproduction: A Multidisciplinary Overview*. Churchill Livingstone, Madrid. 197-219.

Godinho, C. L. **Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros**. 1999. 80p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular). Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1999.

Goebel, H.; Gorbach, S.; Knauf, W.; Rimpau, R. H.; Hüttenbach, H. 1982. Properties, effects, residues and analytics of the insecticide endosulfan. New York: Springer-Verlag. p.174.

Guraya, S. S. 1987. Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals. **Spring-Verlag, Berlin**. p. 430.

Gray Jr. L. E.; Otsby, J. 1998. Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus nonendocrine mechanisms. **Toxicology and Industrial Health**. 14 (1-2): 159-184.

Goyal, H. O.; Williams, C. S.; Khalil, M. K.; Vig, M. M.; Maloney, M. A. 1999. Postnatal differentiation of ductus deferents, tail of the epididymis, and distal body of epididymis in goats occurs independently of rete testis fluid. **The Anatomical Record**. 254: 508-520.

Huttenbach, H. T. 1982. Fields of application and survey of technical literature Residue. **Reviews**. 83: 112-137.

IUCN (World Conservation Union). **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em < <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/search> >. Acesso em: Dezembro de 2011.

Jégou, B. 1993. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. **International Review Cytology**. 147: 25- 95.

Jonsson, C. M. **Estudos de toxicidade e acúmulo de endosulfan nos peixes *Brachydanio rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus***. 1991.180 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de alimento) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

Junqueira, L. C.; Carneiro, J. 2008. Histologia Básica. **Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro**. p. 524.

Kierszenbaum, A. L. 2008. Histologia e Biologia Celular. Uma introdução à Patologia. **Editora Elsevier: Rio de Janeiro**. p. 654.

Larini, L. 1999. Toxicologia dos Praguicidas. **Editora Manole: São Paulo**. p. 230.

Larsen, P. A.; Hooper, S. R.; Bozeman, M. C.; Pedersen, S. C.; Genoways, H. H.; Phillips, C. J.; Pumo, D. E.; Baker, R. J. 2007. Phylogenetics and Phylogeography of the *Artibeus jamaicensis* complex based on Cytochrome-b DNA sequences. **Journal of Mammalogy**. 88(3): 712-727.

Lehr, W. 1992. Statement concerning soil metabolism and mobility of endosulfan. (Hoe 002671) **Frankfurt: HOECHST**. p.1-8.

Luke, M. C.; Coffey, D. S. 1994. The male sex accessory tissue: structure, androgen action and physiology. In: Knobil, E.; Neill, J. D. The physiology of reproduction. **New York: Raven Press**. p.1435-1488.

- Macêdo, J. A. B. 2002. Introdução a Química Ambiental (Química & Ambiente & Sociedade). 1ª edição. **Juiz de Fora, Minas Gerais**. p. 150.
- Maier-Bode, H. 1968. Properties, effect, residues and analytics of the insecticide endosulfan. **Residue Reviews Journal**. 22: 1-44.
- Marinho-Filho, J.; Vasconcellos-Neto, J. 1994. Dispersão de *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers. (Guttiferae) por morcegos na região de Manaus, Amazonas. **Acta Botanica Brasilica**. 8 (1): 87-96.
- Mello, M. S. C. **Avaliação da toxicidade reprodutiva do pesticida trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos**. 2007. 131p. (Tese de doutorado em Vigilância Sanitária). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ. Rio de Janeiro. 2007.
- Menezes, C. M. C. **Análise morfofuncional da espermatogênese de queixadas (*Tayassu pecari* LINK, 1975)**. 2006. 96p. (Dissertação de mestrado em Produção Animal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes-RJ, 2006.
- Nowak, R. M. 1994. Walker's Bats of the World. **London: The Johns Hopkins University Press**. p.296.
- OMS. (Organização Mundial da Saúde).2011. **Agrotóxicos**. Disponível em <<http://www.who.int/es/>>. Acesso em: Dezembro de 2011.
- O'Shea, T. J.; Everette, A. L.; Ellison, L. E. 2000. Cyclodiene Insecticide, DDE, DDT, Arsenic, and Mercury Contamination of Big Brown Bats (*Eptesicus fuscus*) Foraging at a Colorado Superfund Site. **Environmental Contamination and Toxicology**. 40: 112–120.
- Pacheco, S. M .; Caldas, E. P .; Rosa, J. C. A.; Rosa, D. P.; Batista. H.; Ferreira, J. C.; Predebom, J.; Roehe, P. M. 2010. Registro de *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Chiroptera: Phyllostomidae) positivo para o vírus rábico no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre. 8(1): 61-63.
- Patterson, B.; Pascual, R. 1972. The fossil mammal fauna of South America.; p. 247-309. *In*: Keast; A; Erk, FC & Glass, B (Eds). Evolution, mammals and southern continents. **Albany, State University New York Press**. p. 543.
- Pescovitz, O. H.; Srivastava, C. H.; Breyer, P. R.; Monts, B. A. 1994. Paracrine control of spermatogenesis. **Trends Endocrinol and Metabolism**. 5: 126-131.
- Reis, N. R.; Peracchi, A. L.; Pedro, W. A.; Lima, I . P. 2007. Morcegos do Brasil. **Editora da universidade Estadual de Londrina**. Londrina. p. 253.
- Russell, L. D. 1996. The Leydig Cell. **Cache River Press. Vienna**. p. 43-96.

Russell, L. D.; Chandrashekar, V.; Bartke, A.; Sinha-Hikim, A. P. 1994. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. **International Journal of Andrology**. 17: 93-106.

Russell, L. D.; Ettlín, R. A.; Sinha Hikim, A. P.; Clegg, E. D. 1990. Mammalian spermatogenesis. In: Russell, L. D.; Ettlín, R. A.; Sinha Hikim, A. P.; Clegg, E. D. (eds). Histological and histopathological evaluation of the testis. Bolesta: **Cache River Press**. 1: 40.

Santos, R. **Agrotóxicos: uma unidade temática de ensino**. 2007. 41 p. Monografia (Licenciatura em Química). Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Educação - FAE. Belo Horizonte. 2007.

Sazima, I.; Fischer, W. A.; Sazima, M.; Fischer, E. A. 1994. The fruit bat *Artibeus lituratus* as a forest and city dweller. **Ciência e Cultura, São Paulo**. 46(3):164-168.

Setchell, B. P. 1991. Male reproductive organs and semen. In: Cupps, P.T. Reproduction in Domestic Animals, ed.4. **San Diego: Academic Press**. p. 670.

Schlatt, S.; Meinhardt, A.; Nieschlag, E. 1997. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. **European Journal of Endocrinology**. 137: 107-117.

Sharpe, R.M. 1994. **Regulation of spermatogenesis**. In: Knobil, E, Neill, J.D. (Eds.). The Physiology of Reproduction, ed.2. **New York: Raven Press**. cap 22:1363-1434.

Singh, S. K.; Pandey, R. S. 1990. Effect of sub-chronic endosulfan exposures on plasma gonadotrophins, testosterone, testicular testosterone and enzymes of androgen biosynthesis in rat. **The Journal of Experimental Biology**. 28: 953-956.

Simmons, N. B., 2005. Order Chiroptera *in*: Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference, Third Edition, (D.E. Wilson and D. M Reeder, eds.). **Johns Hopkins University Press, Baltimore**. 1(3): 312-529.

Skinner, M. 1994. Cell-cell interactions in the testis. **Endocrine Reviews**. 12: 45-77.

Spiteri-Grech, J.; Nieschlag, E. 1993. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis - a review. **Journal of Reproduction Fertility**. 98: 1-14.

Timm, R. M. 1994. The mammal fauna. p. 229-237. *In*: Mcdade, LA; Bawa, KS; Hespenheide HA & Hartshorn, GS (Eds). La Selva: Ecology and natural history of a neotropical rain forest. **Chicago, University of Chicago Press**. p. 486.

Thies, M. L.; McBee, K. 1994. Cross- Placental transfer of organochlorine pesticides in Mexican free-tailed bats from Oklahoma and New Mexico. **Environmental Contamination and Toxicology**. 27: 239-242.

Toxicological profile. 2000. Endosulfan. U.S. Department Of Health and Human Services. **Us Department of Health and Public Services**. p. 323.

Zortéa, M. 2007. Subfamília Stenodermatinae. p. 107- 128. In: Reis, N.R., Peracchi, A.L., Pedro, W.A.; Lima, I.P. (eds.). Morcegos do Brasil. **Editora da Universidade Estadual de Londrina. Londrina.** p.253.

Zortéa, M.; Chiarello, A. G. 1994. Observations on the big fruit-eating bat, *Artibeus lituratus*, in an urban reserve southeast Brazil. **Mammalia.** 4: 665-670.

Artigo I

Efeitos do inseticida endossulfam sobre o compartimento tubular e intertubular em testículos de *Artibeus lituratus* (OLFERS, 1818)

Resumo. A quiropterofauna tem sofrido ação a dos agrotóxicos devido ao uso indiscriminado destes químicos em culturas frutíferas, com especial atenção as espécies frugívoras, que têm contato constante com estes fungicidas e inseticidas. O objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos do endossulfam, um inseticida organoclorado, sobre a morfometria tubular e intertubular em testículos de *Artibeus lituratus*. Foram capturados 26 morcegos *Artibeus lituratus* machos, adultos, em fragmento de Mata Atlântica, nas cidades de Viçosa/MG (20°45'14"S e 42°52'53"W) e Espera Feliz- MG (20°39'00"S e 41°54'26"W), Brasil. Os animais foram divididos em 4 grupos: 1 Controle (GC): alimentados com mamões sem o inseticida endossulfam (n= 6); 2 espalhante (GES): alimentados com mamões expostos ao espalhante adesivo Wil Fix 0,015g/L (n=8); 3 endossulfam (GEI): alimentados com mamões expostos ao inseticida Endossulfam na concentração de 1,05 g/L = 0, 105% m/v e espalhante adesivo 0,015 g/L (n=6); 4 endossulfam (GEII): alimentados com mamões expostos ao inseticida Endossulfam na concentração 2,1 g/L = 0,21% m/v e espalhante adesivo 0,015 g/L (n=6). Após processamento histológico de rotina para inclusão em metacrilato, secções de 3µm foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio e analisadas sob microscopia de luz. Obteve-se o percentual dos elementos do parênquima testicular, e foram realizadas as análises morfométricas e estereológicas das células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos e tecido conjuntivo. Não houve diferença significativa entre os valores das biometrias corporais, testiculares e IGS dos morcegos tratados durante todo o período experimental. Houve aumento do peso da albugínea nos animais do grupo GEII com relação ao controle e GES. Não foram encontradas diferenças nas proporções volumétricas e o volume dos componentes do parênquima testicular bem como no índice tubulossomático. A proporção dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero, comprimento dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo e o comprimento total dos túbulos seminíferos não apresentaram diferenças estatísticas. Foi observado menor percentual de célula de Leydig nos animais do grupo GEII em relação aos animais dos outros grupos. O espaço linfático por intertúbulo foi maior nos animais dos grupos tratados. Todos os grupos tratados apresentaram aumento no percentual de núcleo e redução do citoplasma de células de Leydig. Houve também redução do volume de citoplasma da célula de Leydig em GEII. Não houve alterações

no número de células de Leydig por testículo, por grama de testículo e no índice Leydigossomático. A morfologia geral do intertúbulo não mostrou maiores alterações entre os tratamentos. Assim, não há evidências da ação deletéria do endossulfam no espaço tubular e intertubular nos testículos de *A. lituratus*, nas doses ofertadas e no tempo de exposição utilizado neste trabalho. Concluindo assim que o endossulfam nas condições deste estudo não interfere nos padrões espermatogênicos dessa espécie de morcego.

Palavras-chave: endossulfam, morcegos, túbulos seminíferos, espaço linfático espermatogênese, células de Leydig.

1. INTRODUÇÃO

A família Phyllostomidae, endêmica do continente americano, destaca-se como o grupo mais versátil na exploração de alimentos entre os Chiroptera, podendo explorar frutos, néctar pólen, folhas, insetos, vertebrados e sangue (Nowac & Paradiso, 1983). Devido à sua ampla variedade de hábitos alimentares, esses animais participam ativamente da reciclagem de nutrientes e energia em um ecossistema (Simmons, 2005). Morcegos que consomem frutos são denominados frugívoros, sendo a subfamília Stenodermatinae composta principalmente por morcegos com este hábito. Uma das espécies mais abundantes nesta subfamília é o *Artibeus lituratus*. Trata-se de um morcego de grande porte, havendo relatos de sua ocorrência desde a região central do México até o sul do Brasil (Brusco & Tozato, 2009). Os morcegos são os únicos mamíferos que apresentam voo ativo, devido à transformação dos seus membros superiores em asas e, em decorrência dessa capacidade e da grande variedade de hábitos alimentares, são importantes no controle populacional de insetos e na polinização e dispersão de sementes, sendo um dos principais agentes na regeneração de *habitats* fragmentados (Beguelini, 2008).

Ao contrário de outros mamíferos, existe pouca informação relacionada ao processo espermatogênico em morcegos, uma grande e diversificada classe de organismos que apresenta diferentes estratégias reprodutivas (Beguelini, 2008).

O endossulfam é um composto organoclorado usado mundialmente como inseticida e acaricida no controle de várias pragas na agricultura. O efeito do endossulfam em animais, até o presente momento, é restrito a estudos imunológicos, neurológicos e genotóxicos (Toxicological Profile, 2000). Estudos com o produto Endosulfan AG (1,4,5,6,7,7 – hexachloro 8,9,10 – trinorborn-5-2,3-ylenebismethylene), tido como disruptor endócrino, demonstraram inibição na biossíntese de andrógenos nos testículos de ratos adultos (Singh & Pandey, 1990; Chitra *et al.*, 1999). Houve uma diminuição nas concentrações plasmáticas de gonadotrofinas e testosterona quando os morcegos foram expostos a diferentes concentrações de endossulfam, especialmente após exposição mais prolongada, assim como alteração na atividade de enzimas esteroidogênicas, como a 3 e 17 beta-hidroxiesteróide desidrogenases (Chitra *et al.*, 1999). Uma diminuição significativa nos conteúdos e atividades microssomais do citocromo P 450 e oxidases de função mista no testículo de ratos tratados também foi observado, juntamente com uma acentuada inibição da atividade da enzima citosólica de conjugação glutationa S-transferase em ambas as doses estudadas. Estas alterações

bioquímicas foram revertidas quando o tratamento endossulfam foi retirado (Sing & Pandey, 1990).

Relatos sobre o efeito do endossulfam sobre as funções reprodutivas são escassos, principalmente em animais silvestres (Singh & Pandey, 1990). Devido a insuficiência de informações sobre o efeito tóxico do endossulfam na reprodução dos morcegos *Artibeus lituratus*, tendo como base os dados apresentados acima, o objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos desse organoclorado sobre a morfometria tubular e intertubular de morcegos *Artibeus lituratus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo

As coletas foram realizadas em um fragmento de Mata Atlântica em Viçosa/MG (20°45'14"S e 42°52'53"W) e Espera Feliz- MG (20°39'00"S e 41°54'26"W). A licença de coleta foi obtida junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/ SISBIO - 25048-1). Este estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Viçosa com o parecer nº 93/2011.

2.2. Captura coleta, manutenção dos animais

Vinte e seis machos da espécie *Artibeus lituratus* foram capturados utilizando-se redes de neblina (*mist nets*) armadas próximas aos abrigos onde ocorre esta espécie, entre os meses de agosto de 2010 e janeiro de 2011. Após a captura, os animais foram colocados individualmente em sacos de contenção e transferidos para gaiolas de arame galvanizado 45 x 22 cm. Posteriormente, os animais foram transportados para o morcegário inserido em meio à mata do Museu de Zoologia do Departamento de Biologia Animal da UFV (Figura 1), com temperatura ambiente e iluminação natural, e lá foram mantidos durante dois dias para a adaptação em cativeiro. No terceiro dia, os morcegos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Grupo 1 Controle (GC): alimentados com mamões sem o inseticida endossulfam (n=6); 2 espalhante (GES): alimentados com mamões expostos ao espalhante adesivo Wil Fix 0,015g/L (n=8); 3 endossulfam (GE I): alimentados com mamões expostos ao inseticida endossulfam na concentração de 1,05 g/L = 0, 105% m/v e espalhante adesivo 0,015 g/L (n=6); 4 endossulfam (GE II): alimentados com mamões expostos ao inseticida endossulfam na concentração 2,1 g/L = 0,21% m/v e espalhante adesivo 0,015 g/L

(n=6). Após imersão na calda, os mamões foram mantidos suspensos em uma caixa plástica adaptada, de modo que não ocorresse contato com outras superfícies, para evitar assim a retirada do agente químico por contato e também para a secagem dos mesmos, sendo posteriormente partidos ao meio, pesados e oferecidos aos animais com a casca.

Diariamente, durante 35 dias de experimento, foram ofertados aos animais 150g de mamão, às 18hs, por ser de fácil aceitação em cativeiro e estar acima da capacidade média de ingestão desta espécie para cada grupo. A água foi oferecida *ad libitum* a todos os grupos. As concentrações de endossulfam utilizadas seguiram a indicação do fabricante para aplicação em diversas culturas como soja, tomate, café, algodão, cana-de-açúcar e frutas.



Figura 1. Imagens do local do experimento: **A.** Morcegário inserido em meio à mata do Museu de Zoologia (MZJM - UFV); **B.** Morcegos distribuídos nos grupos experimentais e mantidos em gaiolas de arame galvanizado; **C.** Mamões mantidos suspensos após imersão na calda; **D.** *A. lituratus* se alimentando.

2.3. Coleta dos testículos e processamento histológico

Os animais foram eutanasiados por decaptação em guilhotina, pesados individualmente, e tiveram os testículos retirados a partir de uma incisão longitudinal mediana na região ventral dos animais. Os testículos foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas e depois transferidos para álcool 70% onde foram mantidos até o processamento.

Foi realizada a pesagem dos testículos utilizando uma balança analítica digital com precisão de 0,0001g (Scientech, AS 210). Para estudos em microscópio de luz, os fragmentos testiculares foram desidratados em série etanólica crescente, procedendo-se a inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesin®, Leica).

Foram obtidas secções de 3µm de espessura utilizando-se micrótomo automático (Reichert-Jung 2045, Alemanha), de maneira semisseriada, mantendo-se o descarte de 13 cortes entre os cortes aproveitados, para evitar a análise do mesmo túbulo seminífero. Os cortes foram corados com solução de azul de toluidina borato de sódio 1%. As preparações histológicas foram montadas em Entellan® (Merck) sendo analisados em microscópio de luz Olympus BX-50.

Após passagem pelo álcool 70%, a albugínea de um dos testículos foi cuidadosamente removida e pesada, sendo assim seu peso descontado da massa testicular para cálculo do volume ocupado pelo parênquima testicular, ou volume líquido testicular, o qual corresponde à parte funcional gametogênica e androgênica do órgão.

2.3.1. Índice gonadossomático (IGS)

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

2.3.2. Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes do parênquima testicular

As proporções volumétricas e o volume dos componentes testiculares foram obtidos contando-se 2.660 pontos, em 10 campos aleatoriamente distribuídos, nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal, utilizando-se o Software para análises de imagem Image-Pro Plus 4.5® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD,

EUA). Foi utilizado um retículo com 266 intersecções (pontos), projetados sobre imagens histológicas obtidas em fotomicroscópio Olympus BX- 40, em aumento de 100x. Foram anotados pontos sobre os componentes tubulares (lume, epitélio e túnica própria) e sobre o intertúbulo.

O volume de cada componente testicular, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado por eles no testículo e do conhecimento do volume líquido do testículo. O valor deste último foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo o peso da túnica albugínea e do mediastino testicular. Como a densidade do testículo é em torno de 1 (Johnson & Neaves, 1981; Tae *et al.*, 2005), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume. Para o cálculo do volume de túbulos e do interstício em mL, foi utilizada a proporção desses e o volume líquido do testículo.

2.3.3. Índice Tubulossomático (ITS)

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

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

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível. Estas medidas não levaram em consideração o estágio do ciclo e foram realizadas utilizando-se o Software para análises de imagem Image-Pro Plus[®] 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) obtidas com objetiva de 20x. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da membrana basal até o lume tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo representa a média de quatro medidas tomadas de forma diametralmente opostas.

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada (Attal & Courot, 1963; Dorst & Sajonski 1974):

$$CT = \frac{VTS}{\pi R^2}$$

onde TS=volume total de túbulos seminíferos; πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2).

2.3.2. Morfometria das células de Leydig

O diâmetro nuclear médio das células de Leydig foi mensurado em imagens capturadas com objetiva de 40x. Trinta núcleos de células de Leydig foram mensurados por animal, utilizando-se o Software para análises de imagem Image-Pro Plus® 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA), escolhendo-se os núcleos que apresentaram contorno circular, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. A proporção núcleoplasmática foi obtida através da proporção volumétrica dos elementos do intertúbulo.

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

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

Com o objetivo de se quantificar o investimento em células de Leydig em relação à massa corporal, foi calculado o índice leydigossomático (ILS), utilizando-se a fórmula: $ILS= \text{volume total de células de Leydig por parênquima testicular}/PC \times 100$, em que PC=peso corporal.

2.3.3. Índice Leydigossomático (ILS)

A fim de se quantificar o investimento em células de Leydig, em relação à massa corporal, foi calculado o índice Leydigossomático (ILS), utilizando-se a fórmula:

ILS= volume total de célula de Leydig por parênquima testicular/PC*100

PC= peso corporal.

3. Análise estatística

Os dados estão apresentados na forma de média \pm desvio padrão da média. Para análise dos resultados foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) seguida do Teste de Student-Newman-Keuls (SNK), quando foi comprovada a distribuição normal e homogeneidade dos dados, utilizando-se o programa Statistica (ANOVA/ MANOVA). Significância estatística estabelecida para $p > 0,05$.

4. RESULTADOS

Não houve diferença significativa entre os valores das biometrias corporais, testiculares e IGS (Tabela 1) dos morcegos tratados durante todo o período experimental ($p>0,05$).

Tabela 1. Média e desvio padrão dos pesos (g) corporais (PC), testiculares (PTT) e índice gonadossomático (IGS) (%) de *Artibeus lituratus* em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II).

	GC	GES	GE I	GE II
PC	75,30 \pm 4,26 ^a	70,11 \pm 10,79 ^a	68,62 \pm 7,83 ^a	76,07 \pm 8,98 ^a
PTT	0,21 \pm 0,05 ^a	0,23 \pm 0,12 ^a	0,20 \pm 0,04 ^a	0,22 \pm 0,07 ^a
IGS	0,27 \pm 0,07 ^a	0,33 \pm 0,17 ^a	0,29 \pm 0,04 ^a	0,24 \pm 0,14 ^a

Letras diferentes na mesma linha estatisticamente diferentes.

Na Tabela 2 encontram-se os valores referentes aos pesos da albugínea e do parênquima testicular, assim como o percentual ocupado pela albugínea. Houve

aumento do peso da albugínea nos animais do grupo tratados com a maior concentração (GEII) com relação ao controle e GES. Não houve variação no peso do parênquima testicular e do percentual ocupado pela albugínea nos testículos.

Tabela 2. Pesos (g) da albugínea (PA), do parênquima testicular total (PPT) e percentual de albugínea (A) dos testículos de *Artibeus lituratus* em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II).

	GC	GES	GE I	GE II
PA	0,0046±0,0012 ^b	0,0050±0,0013 ^b	0,0058±0,0015 ^{ab}	0,0073±0,0013 ^a
PPT	0,21±0,05 ^a	0,23±0,12 ^a	0,20±0,04 ^a	0,22±0,07 ^a
A	4,86±1,63 ^a	5,14±1,89 ^a	5,91±1,62 ^a	7,21±2,08 ^a

Letras diferentes na mesma linha estatisticamente diferentes.

Não houve alterações morfológicas nos componentes tubulares do testículo de *A. lituratus* (Figura 2).

Também não foram encontradas diferenças nas proporções volumétricas (%) e no volume (mL) dos componentes do parênquima testicular bem como no índice tubulossomático conforme pode ser observado na Tabela 3.

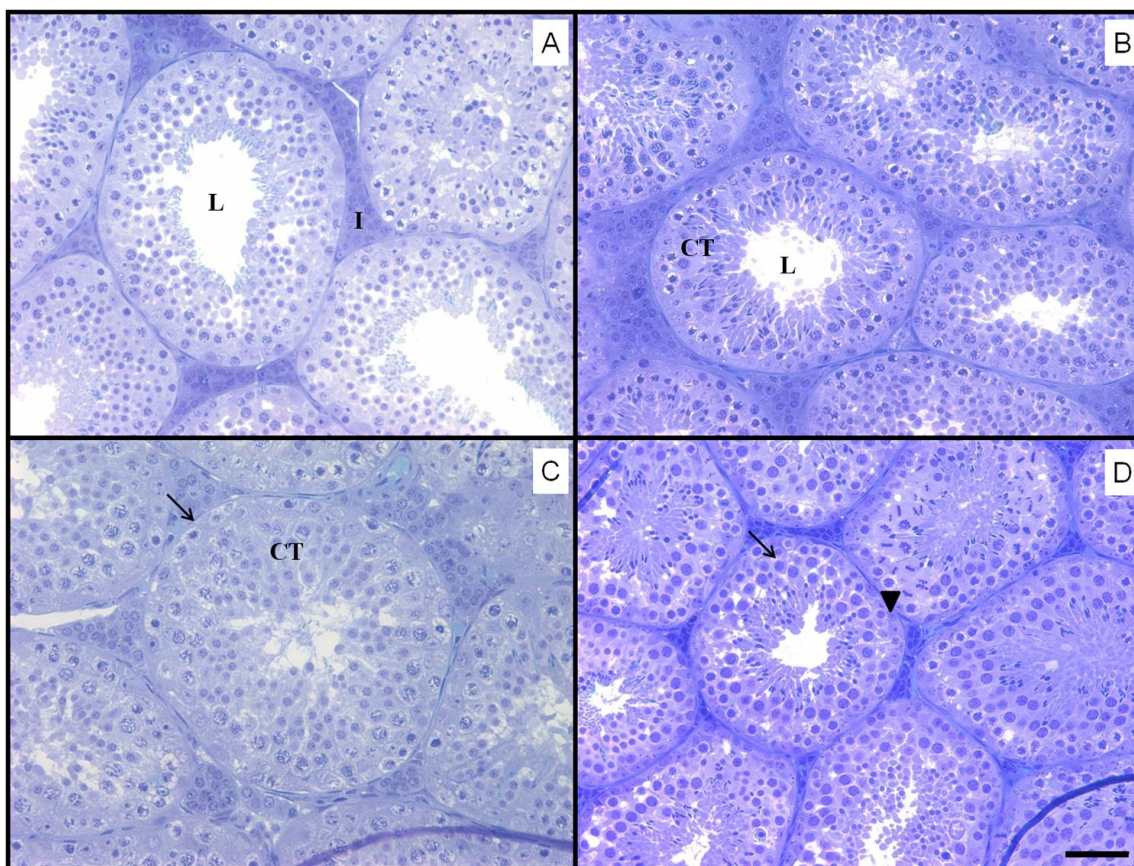


Figura 2: Secções transversais testiculares de *Artibeus lituratus*, controle e tratados com espalhante e endossulfam. **A:** Grupo controle (GC); **B:** Grupo espalhante (GES); **C:** Grupo endossulfam I (GEI); **D:** Grupo endossulfam II (GEII). **CT:** Compartimento tubular; **L:** lúmen; **I:** Intertúbulo; **▼:** Células de Sertoli; **↓:** Túnica própria. Azul de toluidina - borato de sódio. Barra: 50µm.

Tabela 3. Proporção volumétrica e volumetria entre os componentes do parênquima testicular, em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II).

	GC	GES	GE I	GE II
TS (%)	87,61±2,33 ^a	86,86±21,46 ^a	90,16±21,97 ^a	88,09±22,05 ^a
INT (%)	12,39±2,33 ^a	13,14±4,12 ^a	9,84±4,41 ^a	11,91±4,33 ^a
VTS (mL)	0,17±0,05 ^a	0,19±0,09 ^a	0,17±0,07 ^a	0,38±0,22 ^a
VINT (mL)	0,024±0,010 ^a	0,028±0,013 ^a	0,018±0,012 ^a	0,039±0,017 ^a
ITS (%)	0,23±0,06 ^a	0,28±0,15 ^a	0,25±0,05 ^a	0,49±0,54 ^a

Letras diferentes na mesma linha estatisticamente diferentes. **TS:** porcentagem de túbulos seminíferos; **INT:** porcentagem de Intertúbulo; **VTS:** Volume total dos túbulos seminíferos; **VINT:** Volume total do intertúbulo; **ITS:** índice tubulossomático.

Os percentuais ocupados pelos elementos do compartimento tubular encontram-se na Tabela 4. Não foram encontrados resultados significativos quanto ao percentual representado pelo lúmen tubular, epitélio seminífero e túnica própria.

Tabela 4. Percentuais do compartimento tubular representados por lúmen (L), epitélio seminífero (ES) e túnica própria (TP) dos testículos de *Artibeus lituratus* em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II).

	GC	GES	GE I	GE II
L	9,56± 1,67 ^a	9,58±2,74 ^a	9,64±2,74 ^a	9,36±2,70 ^a
ES	73,71±3,12 ^a	74,35±17,98 ^a	76,86±18,56 ^a	74,77±18,66 ^a
TP	4,34±0,68 ^a	3,36±1,32 ^a	3,65±1,20 ^a	3,96±1,14 ^a

Letras diferentes na mesma linha estatisticamente diferentes.

Os resultados obtidos para proporção dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero, comprimento dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo e o comprimento total dos túbulos seminíferos não apresentaram diferenças estatísticas como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Diâmetro tubular (DT), altura do epitélio seminífero (AES), comprimento dos túbulos seminíferos por testículo (CTST), por grama de testículo (CTSGT) e comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS) de testículos de *Artibeus lituratus* em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II).

	GC	GES	GE I	GE II
DT (µm)	162,72±21,44 ^a	153,77±37,47 ^a	148,85±38,27 ^a	160,92±40,44 ^a
AES (µm)	60,75±6,09 ^a	56,25±14,02 ^a	53,69±14,23 ^a	57,83±14,82 ^a
CTST (m)	16,21±1,07 ^a	20,17±8,24 ^a	19,61±7,24 ^a	41,24±25,54 ^a
CTSGT (m)	41,78±10,44 ^a	89,52±78,54 ^a	51,10±64,14 ^a	44,27±56,01 ^a
CTTS (%)	8,11±0,54 ^a	10,08±4,12 ^a	9,80±3,62 ^a	20,62±12,77 ^a

Letras diferentes na mesma linha estatisticamente diferentes.

As médias das proporções volumétricas (%) e o volume (ml) dos componentes do parênquima testicular estão registrados na Tabela 6. O percentual ocupado pelo

compartimento intertubular no parênquima testicular e os volumes do intertúbulo e dos túbulos seminíferos não apresentaram alterações significativas.

Tabela 6. Proporções volumétricas (%) entre túbulos seminíferos (TS) e intertúbulo (INT) e volume (mL) dos túbulos seminíferos (VTTS) e do intertúbulo (VTI) nos testículos de *Artibeus lituratus*, em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II).

	GC	GES	GE I	GE II
TS (%)	87,61±2,33 ^a	86,86±21,46 ^a	90,16±21,97 ^a	88,09±22,05 ^a
INT (%)	12,39±2,33 ^a	13,14±4,12 ^a	9,84±4,41 ^a	11,91±4,33 ^a
VTTS (mL)	0,17±0,05 ^a	0,19±0,09 ^a	0,17±0,07 ^a	0,38±0,22 ^a
VTI (mL)	0,02±0,01 ^a	0,03±0,01 ^a	0,02±0,01 ^a	0,04±0,02 ^a

Letras diferentes na mesma linha estatisticamente diferentes.

Não houve alterações morfológicas nos componentes intertubulares do testículo de *A. lituratus* (Figura 2).

Na Tabela 7 encontram-se os percentuais ocupados pelos elementos constituintes do compartimento intertubular. Não foram observadas diferenças entre os grupos para os percentuais de vaso sanguíneo e tecido conjuntivo. Porém, os animais do GES e GEI apresentaram menor percentual de célula de Leydig em relação aos animais dos grupos GC e GEII. Foram observadas também diferenças no espaço linfático, que se apresentou maior em todos os tratamentos se comparado ao GC.

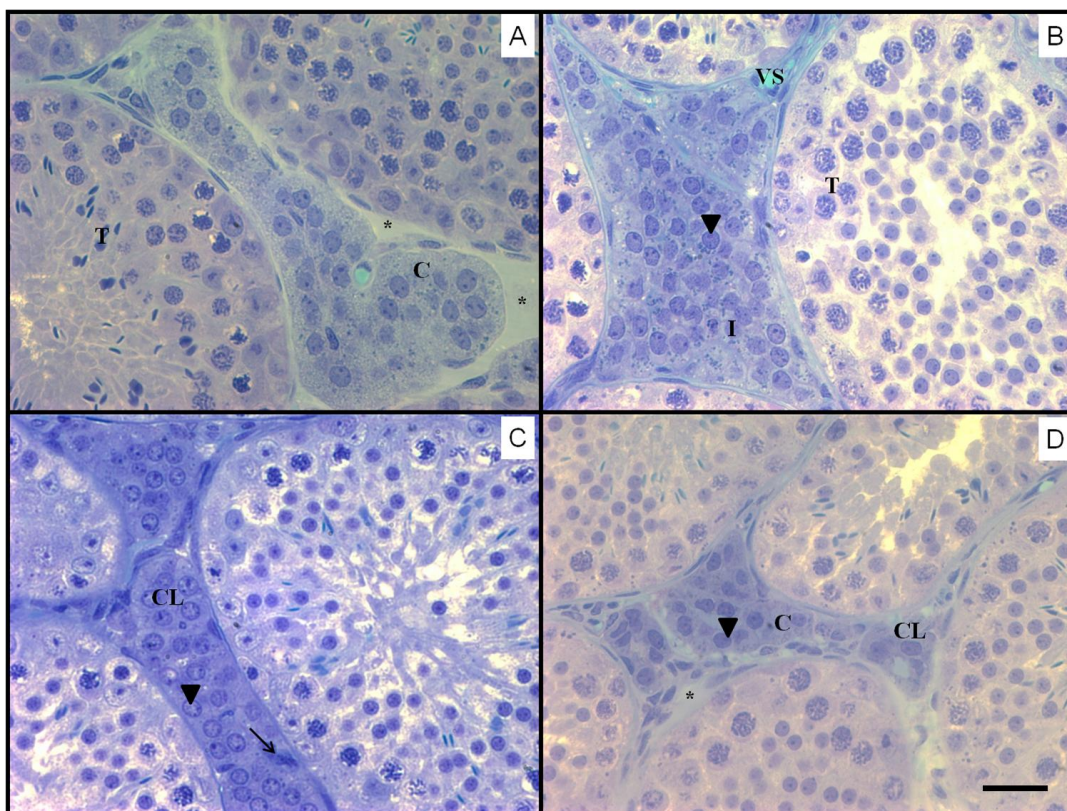


Figura 3: Secções transversais testiculares de *Artibeus lituratus*, controle e tratados com espalhante e endossulfam. A: Grupo Controle (GC); B: Grupo espalhante (GES); C: Grupo endossulfam I (GEI); D: Grupo endossulfam II (GEII). T: túbulo seminífero; I: intertúbulo; VS: vaso sanguíneo; CL: células de Leydig; C: citoplasma de célula de Leydig; * espaço linfático; ↓: tecido conjuntivo. Azul de toluidina - borato de sódio. Barra: 20µm.

Tabela 7. Percentual de célula de Leydig (CL), vasos sanguíneos (VS), espaço linfático (EL) e tecido conjuntivo (TC) no compartimento intertubular dos testículos de *Artibeus lituratus* em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II).

	GC	GES	GE I	GE II
CL (%)	88,21±14,15 ^b	70,04±21,4 ^a	77,43±20,54 ^a	85,22±20,84 ^b
VS (%)	1,22±0,27 ^a	1,32±0,48 ^a	1,63±0,85 ^a	2,02±0,90 ^a
EL (%)	4,76±2,01 ^b	20,88±9,42 ^a	11,48±6,06 ^a	8,31±4,54 ^a
TC (%)	5,81±1,65 ^a	7,76±2,29 ^a	9,46±2,79 ^a	4,45±2,70 ^a

Letras diferentes na mesma linha estatisticamente diferentes.

Na Tabela 8 são apresentados os percentuais dos elementos do intertúbulo com relação ao testículo. Os percentuais ocupados por células de Leydig, vasos sanguíneos e

tecido conjuntivo não apresentaram resultados significativos. Porém, o espaço linfático aumentou no grupo GES.

Tabela 8. Percentual de célula de Leydig (CL), vasos sanguíneos (VS), espaço linfático (EL), tecido conjuntivo (TC) e de intertúbulo (INT) no testículo de *Artibeus lituratus* em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II).

	GC	GES	GE I	GE II
CL (%)	10,93±2,27 ^a	9,14±3,12 ^a	7,62±3,36 ^a	10,15±3,42 ^a
VS (%)	0,15±0,07 ^a	0,17±0,08 ^a	0,16±0,05 ^a	0,24±0,09 ^a
EL (%)	0,59±0,07 ^b	2,72±0,42 ^a	1,13±0,06 ^b	0,99±0,04 ^b
TC (%)	0,72±0,25 ^a	1,01±0,39 ^a	0,92±0,29 ^a	0,53±0,31 ^a

Letras diferentes na mesma linha estatisticamente diferentes.

Os resultados referentes ao volume médio dos elementos do intertúbulo por parênquima testicular estão demonstrados na (Tabela 9). O volume das células de Leydig, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo não sofreram variações significativas quando foram comparados com o GC. Porém, o volume médio do espaço linfático apresentou diferença estatística entre os grupos, sendo maior no GES quando comparado com GC, GE I e GE II.

Tabela 9. Valor médio do volume total (mL) das células de Leydig (CL), vaso sanguíneo (VS), espaço linfático (EL), tecido conjuntivo (TC) e de intertúbulo (INT) dos elementos do compartimento intertubular por parênquima testicular de *Artibeus lituratus* em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II).

	GC	GES	GE I	GE II
CL (mL)	0,0219± 0,0094 ^a	0,0205±0,0108 ^a	0,0142±0,0097 ^a	0,0341±0,0150 ^a
VS (mL)	0,0004±0,0001 ^a	0,0003±0,0001 ^a	0,0003±0,0001 ^a	0,0010±0,0004 ^a
EL (mL)	0,0012±0,0007 ^b	0,0056±0,0021 ^a	0,0022±0,0016 ^b	0,0029±0,0014 ^b
TC (mL)	0,0014±0,0006 ^a	0,0022±0,0010 ^a	0,0016±0,0010 ^a	0,0019±0,0012 ^a

Letras diferentes na mesma linha estatisticamente diferentes.

Na Tabela 10 encontram-se as médias da morfometria das células de Leydig. Não houve alteração significativa no diâmetro do núcleo das células de Leydig, no volume nuclear e no volume de uma célula de Leydig. No entanto, o percentual nuclear

apresentou aumento nos grupos tratados, quando foi comparado com o GC. Por outro lado, o percentual representado pelo citoplasma foi menor nos grupos que receberam tratamentos. O volume do citoplasma da célula de Leydig reduziu no grupo GEII comparado aos outros grupos.

Tabela 10. Morfometria das células de Leydig: diâmetro nuclear (DNCL), percentuais (%) de núcleo (NCL) e citoplasma de CL (CCL), volumes (mL) de núcleo (VNCL) e citoplasma (VCCL) de CL e volume (mL) de CL (VCL) nos testículo de *Artibeus lituratus* em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II).

	GC	GES	GE I	GE II
DNCL (µm)	6,11±0,35 ^a	6,14±0,63 ^a	5,97±0,46 ^a	5,82±0,31 ^a
NCL (%)	22,43± 3,89 ^b	31,07± 4,34 ^a	28,92±2,08 ^a	34,76±6,07 ^a
CCL (%)	77,57± 3,89 ^b	68,93±5,28 ^a	71,08± 4,18 ^a	65,24±3,17 ^a
VNCL (µm³)	120,59±20,74 ^a	124,78±38,67 ^a	112,84±26,11 ^a	104,07±16,53 ^a
VCCL (µm³)	433,63±155,60 ^a	304,18±169,90 ^{ab}	286,64±100,46 ^{ab}	209,55±85,32 ^b
VCL (µm³)	560,22±173,41 ^a	428,96±208,63 ^a	399,47±124,15 ^a	313,62±96,79 ^a

Letras diferentes na mesma linha estatisticamente diferentes.

O número total de células de Leydig por testículo, por grama de testículo e o ILS (Tabela 11), não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com endossulfam.

Tabela 11. Número total de células de Leydig (NTL), número de CL por grama de testículo (NGT) e índice leydigossomático (ILS) em *Artibeus lituratus* em animais do grupo controle (GC), tratados com espalhante adesivo 0,015 g/L (GES), endossulfam 1,05 g/L (GE I) e endossulfam 2,1 g/L (GE II).

	GC	GES	GE I	GE II
NTL (%)	4,3x10 ⁷ ±2,5x10 ^{7a}	4,8x10 ⁷ ±2,3x10 ^{7a}	3,9x10 ⁷ ±2,2x10 ^{7a}	1,2x10 ⁸ ±9,9x10 ^{7a}
NGT (%)	2,1x10 ⁸ ±7,2x10 ^{7a}	2,4x10 ⁸ ±7,6x10 ^{7a}	2,1x10 ⁸ ±1,5x10 ^{8a}	3,6x10 ⁸ ±2,0x10 ^{8a}
ILS (%)	0,03±0,01 ^a	0,02±0,01 ^a	0,01±0,01 ^a	0,03±0,01 ^a

Letras diferentes na mesma linha estatisticamente diferentes.

5. DISCUSSÃO

Estudos relacionando à ação do inseticida organoclorado endossulfam sobre a biologia reprodutiva em machos são conhecidos somente em animais de laboratório (Edwards *et al.*, 1984), e estão relacionados principalmente à produção de andrógenos (Singh & Pandey, 1990; Chitra *et al.*, 1999). Portanto, torna-se necessário a realização de estudos experimentais para avaliar e identificar as possíveis consequências decorrentes da exposição aos agroquímicos, no que se refere a seus efeitos no sistema reprodutor masculino de animais silvestres, expostos a compostos organoclorados como o endossulfam. Não foram encontrados na literatura trabalhos que tenham avaliado os parâmetros morfométricos tubulares após exposição ao endossulfam em testículo de morcegos no tocante a este parâmetro.

O peso corporal médio dos morcegos neste trabalho (76 g) corrobora o encontrado por Miranda (2012) (77 g) quando tratou *A. lituratus* com mancozeb (2 g/L) e tebuconazol (1 mL/L), durante sete e/ou 30 dias consecutivamente, e também não registrou diferença entre os tratamentos.

O endossulfam não interferiu no peso testicular, que é diretamente relacionado com a produção espermática segundo França & Russell (1998). Morcegos da mesma espécie que receberam com mancozeb (2g/L) e tebuconazol (1mL/L) (Miranda, 2102), também não mostraram diferença nesse parâmetro. As mesmas considerações podem ser aplicadas com relação ao IGS, ao peso do parênquima testicular e à proporção de albugínea, que não sofreram alterações com a aplicação de endossulfam (neste trabalho), e de mancozeb e tebuconazol (Miranda, 2012). Porém, ratos submetidos à ação do tebuconazol na concentração de 175 mg/kg/dia apresentaram redução no peso testicular (Joshi & Gulati, 2005).

O aumento da albugínea testicular observado neste trabalho não foi visto por em *A. lituratus* que receberam mancozeb e tebuconazol (Miranda, 2012). Johnson *et al.*, (1981) descreveram que a albugínea compõe a morfofisiologia do testículo, embora não participe diretamente da função espermatogênica ou androgênica. Assim, entende-se que, apesar de aumentada, a albugínea não interferiu no funcionamento normal do testículo, mesmo porque o peso do parênquima testicular não mostrou alterações.

A proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular de mamíferos varia bastante entre as espécies, principalmente os percentuais referentes aos túbulos seminíferos e às células de Leydig (França & Russell, 1998). Os valores médios

referentes à túnica própria, ao epitélio seminífero e ao lumem e intertúbulo não variaram no presente trabalho. Porém, Miranda (2012), trabalhando com *A. lituratus* submetidos a dois tipos de fungicidas, observou redução da proporção volumétrica de túbulos seminíferos e aumento na proporção de intertúbulo, nos animais que receberam tebuconazol.

Os morcegos deste trabalho não apresentaram alterações na volumetria do parênquima testicular. Este achado corrobora aquele encontrado por Miranda (2012), utilizando a mesma espécie de morcegos que receberam tratamento com fungicidas. O índice tubulossomático, que depende do percentual de túbulos seminíferos, não sofreu variação neste trabalho. Porém, morcegos que receberam tebuconazol apresentaram redução do ITS (Miranda, 2012).

A ausência de alterações na morfometria tubular observada neste trabalho também foi registrada por Miranda (2012), trabalhando com a mesma espécie de morcego ofertando dois tipos de fungicida. Porém, esta autora observou redução no diâmetro tubular em animais que receberam tebuconazol. Pelo exposto, entendemos não ter havido prejuízo para o processo espermatogênico.

Animais tratados com endossulfam no presente trabalho não apresentaram variações nas proporções volumétricas e no volume de túbulos seminíferos e de intertúbulo. Porém, morcegos que receberam tebuconazol por 30 dias apresentaram redução no percentual de túbulos seminíferos e aumento no intertúbulo (Miranda, 2012). A ação do endossulfam não comprometeu os compartimentos testiculares de forma global, neste estudo.

As células de Leydig usualmente constituem os componentes mais abundantes do intertúbulo, e sua população varia de acordo com a espécie e idade. Tais células são responsáveis pela síntese de testosterona, manutenção da libido, do processo espermatogênico, funcionamento das glândulas acessórias e características sexuais secundárias (Payne *et al.*, 1996). Neste trabalho houve redução do percentual de célula de Leydig, com relação ao intertúbulo, no grupo GEII. O aumento do espaço linfático em todos os tratamentos pode indicar maior fluxo de líquidos nesse local, podendo interferir na função parácrina do intertúbulo. Em *A. lituratus* que receberam tebuconazol, houve redução do espaço linfático, acompanhada de aumento nos vasos sanguíneos que, neste trabalho não demonstraram alterações (Miranda, 2012).

O aumento do espaço linfático com relação ao intertúbulo foi acompanhado do aumento deste local quando avaliamos sua distribuição por testículo. Miranda (2012) observou aumento nas células de Leydig e vasos sanguíneos em animais que receberam

tebuconazol. O presente trabalho esses parâmetros não demonstraram alteração. O aumento do volume do espaço linfático em GES refletiu o mesmo aumento observado nesse parâmetro com relação ao testículo e ao intertúbulo, nesse mesmo grupo. O mesmo não ocorreu para os grupos GEI e GEII. Animais que receberam mancozeb e tebuconazol não mostraram alterações na volumetria dos elementos intertubulares (Miranda, 2012), à semelhança do presente estudo para todos os parâmetros, exceto para espaço linfático.

O aumento do percentual de núcleo das células de Leydig foi acompanhado da redução de citoplasma em todos os grupos tratados. O menor percentual de citoplasma em GEII refletiu na diminuição do volume citoplasmático das células de Leydig nesse grupo. Apesar dessas alterações, não houve redução no volume das células de Leydig, o que implica na não interferência do endossulfam no principal componente do intertúbulo. Miranda (2012), trabalhando com morcegos, observou redução do diâmetro nuclear, volume nuclear, volume citoplasmático e volume de células de Leydig em animais tratados com tebuconazol.

O número total de células de Leydig, número de células de Leydig por grama de testículo e índice Leydigossomático em *A. lituratus*, que representa o percentual de massa corporal alocado em células de Leydig, não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Miranda (2012), utilizando a mesma espécie de morcegos, observou aumento no número de célula de Leydig por grama de testículo em animais que receberam tebuconazol (1 ml/L).

O endossulfam tem sido classificado como um desregulador endócrino, estando associado a diversas alterações súbitas ou permanentes, nas vias de sinalização endócrina, atividade reprodutiva, síntese e secreção de diversos hormônios (Singh & Pandey, 1989; Singh & Pandey, 1990; Vos *et al.*, 2000; De Falco *et al.*, 2007; Eustache *et al.*, 2009). Brinati (2011) avaliou as concentrações totais de testosterona em morcegos tratados com o organoclorado endossulfam, nas mesmas doses deste trabalho, não encontrando alterações nos níveis de testosterona plasmática. Assim, entendemos que as pequenas alterações ocorridas nos elementos constituintes do intertúbulo não tenham sido suficientes para interferir efetivamente na função desse compartimento testicular.

6. CONCLUSÕES

Contrariando nossa hipótese, a ausência de alterações na morfometria tubular e intertubular nos permitiu inferir que o endossulfam, nas concentrações da calda 1,05 e 2,1 gramas por litro, durante 35 dias e na forma de oferecimento, não interfere nos padrões espermatogênicos de *Artibeus lituratus*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Attal, J.; Courot, M. 1963. Développement testiculaire et établissement de la spermatogemèse chez le taureau. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**. 3: 219-241.

Beguelini, M. R. **Estudo da espermatogênese e nucleogênese de morcegos**. 2008. 144p. Tese (Mestrado em Genética). Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto - SP, 2008.

Brinati, A. **Efeitos toxicológicos do inseticida endossulfan sobre o metabolismo de morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*) e análise do bioacúmulo no tecido adiposo e hepático**. 2011. 54p. Tese (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2011.

Brusco, A. R.; Tozato, H. C. 2009. Frugivoria na dieta de *Artibeus lituratus* Olfers, 1818 (CHIROPTERA, PHYLLOSTOMIDAE) no Parque do Ingá, Maringá / PR. **FAP Ciência**. Apucarana-PR. 2(3): 19-29.

Chitra, K. C.; Latchoumycandane, C., Mathur, P. P. 1999. Chronic effect of endosulfan on the testicular functions of rat. **Asian Journal of Andrology**. 1: 203-206.

De Falco, M.; Sciarrillo, R.; Capaldo, A.; Laforgia, V. L.; Cottone, G. A. 2007. The Effects of the Fungicide Methyl Thiophanate on Adrenal Gland Morphophysiology of the Lizard, *Podarcis sicula*. **Environmental Contamination and Toxicology**. 53(2): 241-248.

Dorts, V. J.; Sajonski, H. 1974. Morphometric studies into tubular system of swine testes during postnatal development. **Monatsh Verinarmed**. 29(17): 650-652.

Edwards, J.A.; Reid, Y.L.; Offer, J. M.; Almond, R.H.; Gibson, W.A. 1984. Effects of endosulfan-technical on reproductive function of multiple generations in the rat. Submitted to Who by Hoechst AG. England. Huntingdon Research Centre, (Unpublished report N. A29428; Huntingdon Report N. HST 204/83768).

Eustache, F. ; Mondon, F.; Canivenc- Lavier, M. C.; Lesaffre, C.; Fulla, Y. Berges, R.; Cravedi, J. P.; Vaiman, D.; Auger, J. 2009. **Chronic** Dietary Exposure to a Low-Dose Mixture of Genistein and Vinclozolin Modifies the Reproductive Axis, Testis Transcriptome, and Fertility. **Environmental Health Perspectives**. 8 (117): 1272–1279.

França, L.R.; Russell, L. D. 1998. The testis of domestic mammals. In: Regadera, J. and Martinez-Garcia, F. (Eds.). **Male Reproduction: A Multidisciplinary Overview**. Churchill Livingstone, Madrid. 197-219.

Joshi, S.C.; Gulati, N. 2005. Effects of tebuconazole on reproductive function of male rat. **Journal of Cell and Tissue Research**. 5(2): 457-460.

Johnson, L.; Neaves, W. B. 1981. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. **Biology of Reproduction**. 24: 703- 712.

Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for

use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**. 27:137.

Miranda, D. C. **Efeito dos fungicidas mancozeb e tebuconazol sobre parâmetros testiculares do morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (OLFERS, 1818)**. 2012. 54p. Tese (Mestrado de Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2012.

Nowac, R. M.; Paradiso, L. J. 1983. Walker's Mammals of the World. Baltimore. **The Johns Hopkins University Press**. 1 (4): 568.

Payne, A.H.; Hardy, M. P.; Russell L.D. 1996. The Leydig cell. **Cache River Press, Vienna**. p. 734.

Tae, H. J.; Jang, B. G.; ahn, D. C.; Choi, E. Y.; Kang, H. S.; Kim, N. S.; Lee, J. H.; Park, S. Y.; Yang, H. H.; Kim, I. S. 2005. Morphometric studies on the testis of korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus Karpowi*) during the breeding and non-breeding seasons. **Veterinary Research Communications**. 29: 629-643.

Vos, J.; Dybing, E.; Greim, H. A.; Ladefoged, O.; Lambré, C.; Tarazona, J. V.; Brandt I, Vethaak A. D. 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. **Critical Reviews in Toxicology**. 1(30) 71-1.

Simmons, N. B. 2005. Order Chiroptera in: Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference, Third Edition, (D.E. Wilson and D. M Reeder, eds.). **Johns Hopkins University Press, Baltimore**.1(3): 312-529.

Singh, S. K.; Pandey, R. S. 1990. Effect of sub-chronic endosulfan exposures on plasma gonadotrophins, testosterone, testicular testosterone and enzymes of androgen biosynthesis in rat. Indian j. **The Journal of Experimental Biology**. 28: 953-956.

Singh, S. K.; Pandey, R.S. 1989. Gonadal toxicity of short term chronic endosulfan exposure to male rats. **Indian Journal of Experimental Biology**. 27 (4): 341-346.

Toxicological profile. 2000. Endosulfan. U.S. Department Of Health and Human Services. **Us Department of Health and Public Services**. p. 323.