



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

Maria Juliana Gomes Arandas

Ciclo reprodutivo dos machos de *Myotis lavalii* e *Molossus molossus* (Mammalia: Chiroptera) em um fragmento de Mata Atlântica, Nordeste do Brasil

**RECIFE
2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

MARIA JULIANA GOMES ARANDAS

CICLO REPRODUTIVO DOS MACHOS DE *Myotis lavalii* E *Molossus molossus* (MAMMALIA: CHIROPTERA) EM UM FRAGMENTO DE MATA ATLÂNTICA, NORDESTE DO BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. Área de concentração em Morfofisiologia.

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientadora:

Profa. Dra. Valéria Wanderley Teixeira

Co-orientadora:

Prof. Dra. Katharine Raquel Pereira dos Santos

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

A662c Arandas, Maria Juliana Gomes
Ciclo reprodutivo dos machos de *Myotis lavalii* e *Molossus molossus* (Mammalia: Chiroptera) em um fragmento de Mata Atlântica, Nordeste do Brasil / Maria Juliana Gomes Arandas. – 2018.
97 f. : il.

Orientador: **Álvaro Aguiar Coelho Teixeira**.
Coorientadora: Valéria Wanderley Teixeira.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências.

1. Condições ambientais 2. Epidídimo 3. Espemiogênese
4. Meses chuvosos 5. Morcego insetívoros I. Teixeira, **Álvaro Aguiar Coelho**, orient. II. Teixeira, Valéria Wanderley, coorient. III. Título

CDD 636.089

MARIA JULIANA GOMES ARANDAS

CICLO REPRODUTIVO DOS MACHOS DE *Myotis lavalii* E *Molossus molossus* (MAMMALIA: CHIROPTERA) EM UM FRAGMENTO DE MATA ATLÂNTICA, NORDESTE DO BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. Área de concentração em Morfofisiologia.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador) – UFRPE

Profa. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Profa. Dr^a. Katharine Raquel Pereira dos Santos – UFPE/CAV

Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior – UFPE/CAV

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza – UFRPE

“Dedico este trabalho a Deus e aos meus queridos avôs (*In memoriam*), que foram meus verdadeiros pais durante suas respectivas jornadas aqui na terra. Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a tríade divina, Pai, Filho e Espírito Santo. Muito obrigada pelo dom da vida, amor incondicional e por emanar a força que sempre preciso. Meu amigo fiel e soberano, que por diversas vezes senti sua presença ao meu lado e nunca estive só. A honra e a glória é toda tua, meu REI.

A minha amada irmã Janaina Arandas, que é meu maior exemplo acadêmico. Agradeço profundamente por todas as palavras de incentivo, e por ter sido luz em momentos difíceis em nossas vidas. Nosso amor é inenarrável, sagrado e digno. Amo-te!

Ao meu amado sobrinho Caio Arandas que me trouxe tantas alegrias, e sempre perguntava quando o doutorado iria terminar para que pudéssemos brincar mais. Você é muito mais que um sobrinho, é um filho. Amo-te.

A minha tia Célia Arandas que cuidou de mim como uma verdadeira mãe, e sempre mostrou a importância de estudar e entrar em uma universidade. Muito obrigada por todo amor dedicado. Sem você, nada disso seria possível! Guiastes meus passos pelos melhores caminhos. Gratidão, gratidão e gratidão!

Aos meus pais Socorro Oliveira e Carlos Arandas por todo amor, carinho e torcida. Sei que vossas orações foram recebidas por Deus. Agradeço por toda compreensão em todos os momentos que me ausentei. Amo vocês.

Aos meus queridos irmãos Anderson Arandas e Adrieli Arandas por todas as palavras de incentivo, apoio, oração e torcida. Amo vocês!

À minha amada Eduarda Santana, minha grande amiga e companheira por ter sido meu suporte na fase mais crítica da minha vida, quando perdi minha amada vó, nem consigo imaginar como seria passar por essa fase sem você. Gratidão pelo seu amor e cuidado para comigo durante todos esses anos, e por nunca ter soltado da minha mão. Agradeço também por tanto me ajudar com a Vanessinha, assim como as palavras de estímulo e perseverança a seguir firme no doutorado. Amo-te!

À minha prima querida, Vanessa Maria, que foi minha surpresa do finalzinho de 2017. Graças a você me tornei uma mulher mais forte para seguir adiante. Sou muito feliz em tê-la comigo. Agradeço todo carinho, oração e amor. Seremos inseparáveis.

Aos meus tios Telma Maria e Robério Santana, que me acolheram como uma verdadeira filha em sua casa em Vitória de Santo Antão, e facilitou todas as idas aos experimentos no laboratório da UFPE.

Aos meus queridos orientadores Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira e Dra. Valéria Wanderley Teixeira. Agradeço pela rica oportunidade que me foi dada, sou extremamente grata por lutarem pelo meu sonho e por não ter desistido de mim. Agradeço também pelas orientações, paciência, ensinamentos e as contribuições imprescindíveis na tese. Vocês são verdadeiros exemplos de cientistas. Obrigada por tudo!

À minha querida co-orientadora Dra. Katharine Raquel Pereira dos Santos, nenhuma palavra poderá ser suficiente para expressar o tamanho da minha gratidão, carinho e respeito. Foram 10 anos sendo sua aluna de pesquisa, e tudo que sou devo a você. Agradeço por toda sua disponibilidade em tirar dúvidas pessoalmente e virtualmente, por nunca ter desistido de mim, e principalmente por acreditar no meu potencial. Você foi meu grande divisor de águas em 2008, me apresentou os morcegos e a pesquisa científica, e aqui estou. Vou sentir saudades de ser sua aluna. Muito obrigada por tudo!

Ao Dr. Francisco Carlos Amanajás por todas as contribuições na histomorfometria, estatísticas e palavras de incentivo. Jamais me esquecerei do cuidado e preocupação em trazer um lanche quando passei o dia inteiro no laboratório sem me alimentar. São esses gestos que fazem toda uma diferença! Sou muito grata por tudo.

À Professora Dra. Neide Santos do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco pela parceria firmada no período de coleta, assim como ao Senhor Mário (*In memoriam*) que transmitiu tantos conhecimentos sobre a prática em campo.

Ao querido Nivaldo Bernardo por todas as críticas construtivas nos manuscritos. Agradeço por sua amizade, carinho e compreensão. Você faz parte da minha história. Obrigada por cada abraço! Amo-te!

As minhas amadas Ketsia Sabrina e Fabrycia Roberta, vocês foram fundamentais na minha carreira acadêmica. Muito obrigada por todas as palavras de incentivo, carinho e amor. Amo vocês.

Ao meu querido Erivaldo Alves por toda amizade, amor e cumplicidade. Você é muito especial para mim.

A minha querida amiga Wanessa Botelho por todo amor, carinho e palavras de estímulo. Agradeço por ter sido presente na fase mais crítica da minha vida, e sem falar dos momentos divertidos que vivenciamos ao longo desses anos. Muito obrigada! Amo-te!

A minha querida amiga Daniele Kelly, que se tornou uma verdadeira amiga! Sou muito grata por suas palavras amorosas, carinhosas e de incentivo. Sempre acreditei em anjos enviados por Deus, e você é um deles.

À Eveline Alves pela companhia durante o campo, atividades no laboratório e palavras de incentivo.

Aos colegas da “família biotecnologia” que se disponibilizaram a ajudar nas coletas dos morcegos. O trabalho no campo é árduo e difícil, mas a presença de vocês foi de suma importância.

À minha querida amiga Ilka Dayane por ter vivenciado comigo o desafio de cursar um doutorado. Obrigada pelo carinho e companheirismo.

À minha querida amiga Carolina Pazos por todas as conversas, desabafos e torcida! Muito obrigada.

Aos meus amigos Rafael Reinaldo, Izabel Lima, Renata Meireles, Nathalia Alves, David Henrique, Sarah Romini, Jaiurte Martins e Bruno Trajano por todas as palavras de suporte, carinho e atenção. Apesar da distância física, mas vocês sempre estiveram por perto.

Aos queridos Oscar Nascimento, Mércia Bezerra, Gilberto Claudino, Rose Andrade e Severino Ramos (Gena) por todas as oportunidades em lecionar, e cada vez mais me apaixonar pela docência. “*Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção.*” (FREIRE, 1996, p.47).

Aos queridos Diego Vinícius, Camila Priscila e Francileni Gomes, por todo suporte técnico, sobretudo a amizade e carinho. Gosto muito de vocês.

Aos meus alunos que roubaram sorrisos e gargalhadas em meio aos estresses cotidianos. Sou muito feliz dentro de uma sala de aula, e vocês fazem parte disso tudo.

À secretária do Programa de Pós Graduação em Biociência Animal, a querida Edna Cherias por todo afeto, suporte e torcida durante esses 4 anos de doutorado.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) e o Laboratório de Histologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), assim como ao Laboratório de Biotecnologia e Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória (UFPE-CAV) por todo suporte para execução desse projeto.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal- PPBGA, principalmente ao corpo docente por todos os compartilhamentos de saberes.

Aos colegas do grupo "Bolsistas CAPES" pelos momentos de suporte e descontração, bem como os compartilhamentos de experiências e vivências a respeito dos desafios de cursar uma pós graduação. Vocês são especiais!

Aos morcegos que além de objeto de pesquisa, se tornaram verdadeiros companheiros de uma vida.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*Ao único que é digno de receber a honra e a glória, a força e o poder. Ao **REI** eterno e imortal, invisível, mas real.*

RESUMO

Os morcegos apresentam aspectos reprodutivos peculiares que evoluíram a fim de se ajustar as diferentes condições ambientais e climáticas, e um dos critérios para o conhecimento da reprodução é a morfofisiologia testicular e epididimária. *Molossus molossus* e *Myotis lavalii* são espécies de morcegos insetívoros, e os estudos referentes a biologia reprodutiva são escassos, principalmente no Nordeste do Brasil. Assim, analisou-se a histomorfometria testicular e epididimária, assim como os níveis de testosterona de *M. molossus* e *M. lavalii* em um fragmento de Mata Atlântica localizado entre os Municípios de Tamandaré e Rio Formoso-PE. Um total de 23 machos adultos foi selecionado para *M. molossus*, sendo 10 em meses secos e 13 para meses chuvosos. Ao passo que foram utilizados 34 machos adultos para *M. lavalii*, sendo 22 em meses secos e 12 em meses chuvosos. Após anestesia, as amostras de sangue foram coletadas para a dosagem de testosterona. Os testículos e epidídimos foram removidos e fixados em formal 10% tamponado, e posteriormente submetidos à técnica histológica de rotina. Para o testículo, os seguintes parâmetros histomorfométricos foram avaliados: a área tubular, área intertubular, quantificação dos espermátides (arredondadas e alongadas), células de Sertoli e células de Leydig, enquanto que no epidídimo: as áreas tubular, luminal e epitelial da cabeça, corpo e cauda. Os resultados indicaram que *M. molossus* apresentou maiores médias para a área tubular, intertubular, espermátides (arredondadas e alongadas), células de Leydig e níveis de testosterona. No epidídimo, as áreas tubular, luminal e epitelial foram maiores em meses chuvosos. Ao passo que *M. lavalii* na estação chuvosa exibiu um aumento nas áreas tubular e intertubular, nas espermátides alongadas, células de Sertoli, células de Leydig e nos níveis de testosterona, assim como na área tubular, luminal e epitelial da cabeça e cauda do epidídimo. Fisiologicamente, os machos das duas espécies têm um alto investimento nas etapas finais da espermatogênese e na concentração de testosterona. Arelado a isso, nota-se uma maior capacidade de comportar os espermatozoides na região da cauda do epidídimo, que se relaciona a estratégia reprodutiva desenvolvida pelos morcegos para a estocagem. Embora as duas espécies apresentem um ciclo espermatogênico contínuo, nota-se que ajustam a reprodução para os meses chuvosos.

Palavras-chave: Condições ambientais, Epidídimo, Espemiogênese, meses chuvosos, morcego insetívoros.

ABSTRACT

Bats have peculiar reproductive aspects that evolved in order to adapt to different environmental and climatic conditions. One of the criteria for the understanding about the reproductive biology in bats is the testicular and epididymal morphophysiology. *Molossus molossus* and *Myotis lavalii* are insectivorous bats, and studies on the reproductive biology of these species are scarce, especially in the Northeast of Brazil. Therefore, it was analyzed the testicular and epididymal histomorphometry as well as testosterone levels of *M. molossus* and *M. lavalii* from a fragment of Atlantic Forest located between the cities of Tamandaré and Rio Formoso-PE. In total, 23 adult males of *M. molossus* were studied, being 10 for dry months and 13 for rainy months. Besides that, 34 adult males of *M. lavalii* were analyzed (22 in dry months and 12 in rainy months). After Anesthesia, blood samples were collected to testosterone dosage. Subsequently, the testicles and epididymides were fixed in 10% buffered formalin, and submitted to the routine histological techniques. For the testicles, the following histomorphometric parameters were evaluated: the tubular and intertubular areas, quantification of spermatocytes, rounded and elongated spermatids, Sertoli cells and Leydig cells, while in the epididymis: the tubular, luminal and epithelial areas from the head, body and tail. The results indicated that *M. molossus* presented higher averages for the tubular and intertubular areas, rounded and elongated spermatids, Leydig cells and testosterone levels. In the epididymis, the tubular, luminal and epithelial areas were larger in rainy months. On the other hand, *M. lavalii* exhibited increased tubular and intertubular areas, number of elongated spermatids, Sertoli cells, Leydig cells and testosterone levels as well as tubular, luminal and epithelial area of the head and tail of the epididymis during the rainy season. Physiologically, males of both species have a high investment in the final stages of spermatogenesis and in the concentration of testosterone. Furthermore, the two species have a greater capacity to store spermatozoa in the region of the tail of epididymis, which relates to the reproductive strategy developed by bats for storage. Although both species exhibit a continuous spermatogenic cycle, it is noted that they adjust their reproduction for the rainy months.

Keywords: Environmental conditions. Epididymis. Insectivorous bats. Rainy months. Spermogenesis.

SUMÁRIO

Capítulos

I	1. INTRODUÇÃO.....	22
	2. OBJETIVOS.....	23
	3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
	3.1 ORDEM CHIROPTERA.....	24
	3.2. HÁBITOS ALIMENTARES E IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA.....	27
	3.3 OS MORCEGOS E O VÍRUS RÁBICO.....	28
	3.4 FAMÍLIA VESPERTILIONIDAE E A ESPÉCIE <i>Myotis livali</i>	29
	3.5 FAMÍLIA MOLOSSIDAE E A ESPÉCIE <i>Molossus molossus</i>	32
	3.6. BIOLOGIA REPRODUTIVA DE MORCEGOS.....	34
	3.7. TESTÍCULOS.....	36
	3.8 ESPERMATOGÊNESE.....	37
	3.9 EPIDÍDIMOS E ESTOCAGEM DE ESPERMATOZOIDES EM MORCEGOS.....	41
	REFERÊNCIAS.....	43
II	Parâmetro hormonal e histomorfométricos dos testículos e epidídimos de <i>Myotis livali</i> (Chiroptera: Vespertilionidae) em um fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, Nordeste do Brasil	
	RESUMO.....	59
	ABSTRACT.....	60
	INTRODUÇÃO.....	61
	MATERIAL E MÉTODOS.....	62
	RESULTADOS.....	65
	DISCUSSÃO.....	67
	CONCLUSÕES.....	69

REFERÊNCIAS	70
-------------------	----

III **Ciclo reprodutivo sazonal dos machos de *Molossus molossus***
(Chiroptera: Molossidae) em um fragmento de Mata Atlântica,
Nordeste do Brasil

RESUMO.....	81
ABSTRACT.....	82
INTRODUÇÃO.....	83
MATERIAL E MÉTODOS.....	84
RESULTADOS.....	87
DISCUSSÃO	88
CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS	90

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- FIGURA 1:** Classificação filogenética da Ordem Chiroptera. A) Nova classificação filogenética, baseada em estudos moleculares. Duas novas subordens: Yinpterochiroptera e Yangochiroptera. B) Classificação filogenética tradicional, análises restritas as características morfológicas e fisiológicas. Duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera..... 26
- FIGURA 2:** Morcego da espécie *M. lavalii* macho coletado em áreas de Caatinga do Estado de Pernambuco..... 30
- FIGURA 3A e 3B:** Região dorsal e 3B região ventral de *Myotis lavalii*. Observar as tonalidades dos pelos..... 31
- FIGURA 4:** Morcego da espécie *Molossus molossus* 33

Capítulo II

- FIGURA 1:** Fotomicrografia do testículo de *M. lavalii*: A) meses secos e B) meses chuvosos. Observar as células de Sertoli (seta branca curta), espermatogônias (seta branca longa), espermatócitos (seta amarela), espermátides arredondadas (cabeça de seta), espermátides alongadas (setas de duas cabeças) e células de Leydig (asteriscos). H.E. Barras de escala = 20 µm. 74
- FIGURA 2:** Fotomicrografia das três regiões do epidídimo de *M. lavalii*: meses secos, A) Cabeça, B) Corpo, C) Cauda. Meses chuvosos, D) Cabeça, E)

Corpo, F) Cauda. Observar espermatozoides no lúmen (setas). Células basais (setas vermelhas), células principais (setas azuis) e células apicais (setas verdes). Coloração: H.E. Barras de escala = 20µm 74

FIGURA 3: Gráfico das médias mensais histomorfométricas do testículo e níveis de testosterona de *M. lavalii*. A) área tubular. B) área intertubular. C) quantificação dos espermatócitos, D) quantificação das espermátides arredondadas E) quantificação das espermátides alongadas, F) quantificação das células de Sertoli, G) quantificação das células de Leydig e H) níveis de testosterona..... 75

FIGURA 4: Gráfico evidenciando as médias mensais da área tubular (A), área do lúmen (B) e área epitelial (C) da cabeça, corpo e cauda do epidídimo de *M. lavalii* em um fragmento de Mata Atlântica, Pernambuco, 2015. 78

Capítulo III

FIGURA 1: Fotomicrografia do testículo de *M. molossus*: meses secos (A) e meses chuvosos (B) Células de Sertoli (seta vermelha), espermatogônias (seta azul), espermatócitos (seta amarela), espermátides arredondadas (cabeça de seta), espermátides alongadas (setas de duas cabeças) e células de Leydig (asteriscos). H.E. Barras de escala = 20µm..... 93

FIGURA 2: Fotomicrografia das regiões do epidídimo de *M. molossus*: meses secos, A) Cabeça, B) Corpo, C) Cauda. Meses chuvosos, D) Cabeça, E) Corpo, F) Cauda. Setas: espermatozoides no lúmen. H.E. Barras de escala = 20µm..... 93

FIGURA 3: Gráfico das médias mensais histomorfométricas do testículo e níveis de testosterona de *M. molossus*. A) área tubular, B) área intertubular, C) quantificação dos espermatócitos, D) quantificação das espermátides arredondadas, E) quantificação das espermátides alongadas, F) quantificação

das células de Sertoli, G) quantificação das células de Leydig e H) níveis de
testosterona.....

94

FIGURA 4: Gráfico evidenciando as médias mensais da área tubular (A), área
do lúmen (B) e área epitelial (C) da cabeça, corpo e cauda do epidídimo de *M.*
molossus em um fragmento de Mata Atlântica, Pernambuco, 2015.

.....

96

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

- TABELA 1:** Médias mensais referentes à precipitação e temperatura no ano de 2015. Seção de Observação e Meteorologia Aplicada, (SEOMA), Pernambuco, Mata Sul..... 73
- TABELA 2:** Média e desvio padrão da área tubular (AT), área intertubular (AIT), espermatócitos (Es), espermatídes arredondadas (Ear), espermatídes alongadas (Eal), células de Sertoli (CS), células de Leydig (CL) dos testículos e níveis plasmáticos de testosterona de *M. lavalii* coletados em meses secos e chuvosos em um fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, no ano de 2015. 76
- TABELA 3:** Correlação de Spearman entre a área tubular (AT), área intertubular (AI), número de espermatócitos (Es), número de espermatídes arredondadas (Ear), número de espermatídes alongadas (Eal), número de células de Sertoli (CS), número de células de Leydig (CL) e os níveis plasmáticos de testosterona de *M. lavalii* em um fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, 2015. 77
- TABELA 4:** Média e desvio padrão área tubular (AT), área do lúmen (AL) e área do epitélio (AE) em μm^2 , da cabeça, corpo e cauda do epidídimo de *Myotis lavalii* coletados em meses secos e chuvosos em um fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, no ano de 2015. 79

Capítulo III

- TABELA 1:** Médias mensais referentes à precipitação total e temperatura. Seção de Observação e Meteorologia aplicada, (SEOMA),

Pernambuco, Mata Sul.	92
----------------------------	----

TABELA 2: Média e desvio padrão da área tubular (AT), área intertubular (AI), espermatócitos (Es), espermatídes arredondadas (Ear), espermatídes alongadas (Eal), células de Sertoli (CS), células de Leydig (CL) dos testículos e níveis plasmáticos de testosterona de <i>Molossus molossus</i> coletados em meses secos e chuvosos em um fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, no ano de 2015.....	95
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

TABELA 3: Média e desvio padrão da área tubular (AT), área do lúmen (AL) e área do epitélio (AE) em μm^2 , da cabeça, corpo e cauda do epidídimo de <i>Molossus molossus</i> coletados em meses secos e chuvosos em um fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, no ano de 2015.....	97
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AE – Área do epitélio

AI – Área intertubular

AL – Área do lúmen

AT – Área tubular

CEUA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CL – Células de Leydig

CS – Células de Sertoli

Eal – Espermátides alongadas

Ear – Espermátides arredondadas

Es – Espermatócitos

HE – Hematoxilina e Eosina

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

NBF – Formalina neutra tamponada

NPT – Níveis plasmáticos de testosterona

SEOMA – Seção de Observação e Meteorologia Aplicada

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Os morcegos são mamíferos voadores que pertencem à Ordem Chiroptera, estão distribuídos em regiões tropicais e temperadas, e são reconhecidos pela grande diversidade de espécies e importância ecológica, sobretudo na dispersão de sementes, polinização, controle populacional de insetos e vertebrados de pequeno porte (MEDELLÍN; GAONA, 1999; GARCIA; REZENDE; AGUIAR, 2000; ESTRADA; COATES-ESTRADA, 2001; BRITO; GAZARINI; ZAWADZKI, 2010). Entretanto, estão associados à transmissão de zoonoses, como a raiva, que permanece um sério problema de saúde pública no Brasil (UIEDA et al., 1996; SOUZA et al., 2005). Apesar dessas particularidades, esse grupo ainda permanece pouco estudado, principalmente no que se relaciona às características morfológicas do aparelho reprodutor (MORAIS et al., 2012; MORAIS et al., 2013; LIMA JUNIOR et al., 2014).

Os ciclos reprodutivos dos morcegos estão fortemente associados às condições ambientais, fatores climáticos e a disponibilidade de recursos alimentares (ORTÊNCIO- FILHO et al., 2007; MORAIS et al., 2013; BEGUELINI et al., 2013). E assim, as fêmeas podem apresentar os mais variados padrões reprodutivos, desde a monoestria até a poliestria (FLEMING et al., 1972; PACHECO, 2001). Assim como os machos também apresentam características peculiares, como o armazenamento prolongado de espermatozóides viáveis na cauda do epidídimo, investimento espermatogênico ou hormonal em determinados períodos do ano, e a regressão testicular, na qual o epitélio seminífero encontra-se apenas espermatogônias e as células de Sertoli (SHARIFI; GHORBANI; AKMALI, 2004; SHARIFI; AKMALI; GHORBANI, 2008; MORAIS et al., 2012; MORAIS et al., 2013).

A maioria dos estudos relacionados à biologia reprodutiva dos morcegos está direcionada ao posicionamento testicular, atribuindo atividade sexual com testículos descendentes e inatividade sexual com testículos não descendentes, no entanto para a *Phyllostomus discolor* (Phyllostomidae) em áreas de Mata Atlântica de Pernambuco os animais apresentaram atividade espermatogênica, independente da posição testicular (LIMA JUNIOR et al., 2014). Entretanto, observou-se que *Artibeus lituratus* (Phyllostomidae) em áreas de mata Atlântica, exibiram dois estágios

reprodutivos distintos 1) animais com testículos pequenos e escrotais, com apenas espermatogônias, espermátocitos e células de Sertoli no túbulo seminífero e 2) animais com testículos grandes e escrotais, com todas as células da linhagem espermatogênica (DUARTE; TALAMONI, 2010). Diante disso, os estudos morfofisiológicos são de suma importância para compreender o ciclo reprodutivo anual e a capacidade reprodutiva das espécies de morcegos.

Nessa perspectiva, *Molossus molossus* consiste em espécie insetívora, e os trabalhos referentes a biologia reprodutiva tem sido direcionados aos aspectos morfofisiológicos, entretanto existem poucos estudos no Nordeste do Brasil. Os machos da espécie em questão apresentam oito fases no ciclo do epitélio seminífero, assim como menores índices gonadossomáticos, tubulossomáticos e do diâmetro tubular no verão, enquanto que no inverno ocorreu um maior investimento na espermatogênese em áreas de Mata Atlântica de Minas Gerais (MORAIS et al., 2012; MORAIS et al., 2013). *Myotis lavalii* apresenta o hábito alimentar insetívoro, e a espécie foi recentemente descrita através do complexo *Myotis nigricans*, e os estudos relacionados à reprodução são escassos. No Nordeste do Brasil, a atividade reprodutiva possivelmente é contínua, porém as pequenas amostras dos espécimes impossibilitaram a definição de um padrão reprodutivo (WILLIG, 1985; MORATELLI; WILSON, 2013).

Diante disso, como as características morfofisiológicas do aparelho reprodutor masculino variam com a sazonalidade, as espécies de morcegos podem desenvolver diferentes estratégias reprodutivas. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o ciclo reprodutivo anual de machos das espécies *Myotis lavalii* e *Molossus molossus* por meio de parâmetros histomorfométricos testiculares e epididimários, bem como os níveis plasmáticos de testosterona.

2. OBJETIVOS

Geral:

Avaliar a influência da sazonalidade nos estágios reprodutivos, a histomorfometria testicular e epididimária, assim como a dosagem de testosterona durante o ciclo reprodutivo anual dos morcegos *Molossus molossus* (Molossidae) e

Myotis lavalii (Vespertilionidae) em um fragmento de Mata Atlântica do Estado de Pernambuco.

Específicos:

- Verificar os estágios reprodutivos das espécies durante todo ciclo reprodutivo anual;
- Descrever histologicamente os testículos e epidídimos das espécies durante todo ciclo reprodutivo anual;
- Realizar a histomorfometria do epidídimo durante todo ciclo reprodutivo anual;
- No testículo, quantificar as células da linhagem espermatogênica e de Sertoli nos túbulos seminíferos, assim como as células de Leydig no compartimento intertubular durante todo ciclo reprodutivo anual;
- Analisar os níveis séricos de testosterona durante todo ciclo reprodutivo anual;
- Comparar os dados dos estágios reprodutivos, histológicos, histomorfométricos e hormonais entre as estações seca e chuvosa para verificar a influência da sazonalidade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ORDEM CHIROPTERA

Os morcegos são os únicos mamíferos que apresentam estruturas especializadas para o voo verdadeiro, razão essa por serem agrupados na Ordem Chiroptera, palavra proveniente do grego (“*Cheir*” = mão e “*Pteron*” = asa) (EMMONS; FEER, 1997; PERACCHI et al., 2006; PAGLIA et al., 2012). Existem aproximadamente mais de 1020 espécies de morcegos conhecidas no mundo, totalizando mais de 22% das espécies de mamíferos (GARDNER, 2008). Esses animais possuem particularidades, como o sistema de orientação, que captam reflexos dos ecos de ondas sonoras emitidos por eles. Em virtude da ecolocalização, os morcegos podem evitar obstáculos, bem como localizarem as suas presas, independente da ausência de luz, e por conseqüência, possibilitou um grande sucesso ecológico ao grupo (KALKO; AGUIRRE, 2006). Dentre os morcegos, a

família Pteropodidae não apresenta esse sistema de orientação (ecolocalização), exceto as espécies que pertencem ao gênero *Rousettus* que são capazes de utilizar um segundo tipo de ecolocalização, mais rudimentar, realizada por meio de estalidos produzidos pela língua (HOLLAND; WATERS; RAYNER, 2004).

Tradicionalmente a Ordem Chiroptera era classificada em duas subordens: Megachiroptera, que são conhecidos popularmente por “raposas voadoras”. Esses animais encontram-se exclusivamente no Velho mundo (GARDNER, 2008; REIS et al., 2011) e Microchiroptera que estão distribuídos amplamente por todo o globo terrestre (ALMEIDA et al., 2007). No entanto, a filogenia foi revista baseada em evidências morfológicas, comportamentais e moleculares, que demonstram a existência de duas novas subordens de morcegos: 1) Yinpterochiroptera que está representada pela família Pteropodidae e a superfamília Rhinolophoidea (composta pelas famílias Rhinolophidae, Hipposideridae, Megadermatidae, Craseonycteridae e Rhinopomatidae). Anteriormente acreditava-se que a superfamília Rhinolophoidea pertencia aos microquirópteros, entretanto após as análises das sequências de DNA nuclear e mitocondrial constatou-se que é um grupo mais próximo das raposas voadoras. 2) Yangochiroptera abrange as demais 12 famílias que estavam incluídas na subordem Microchiroptera (composta pelas famílias Nycteridae, Myzopodidae, Mystacinidae, Phyllostomidae, Mormoopidae, Noctilionidae, Furipteridae, Thyropteridae, Natalidae, Emballonuridae, Molossidae, Vespertilionidae) (TEELING et al., 2002; VAN DEN BUSSCHE; HOOFFER, 2004; TEELING et al., 2005; JONES; TEELING, 2006; TEELING, 2009), (FIGURA 1).

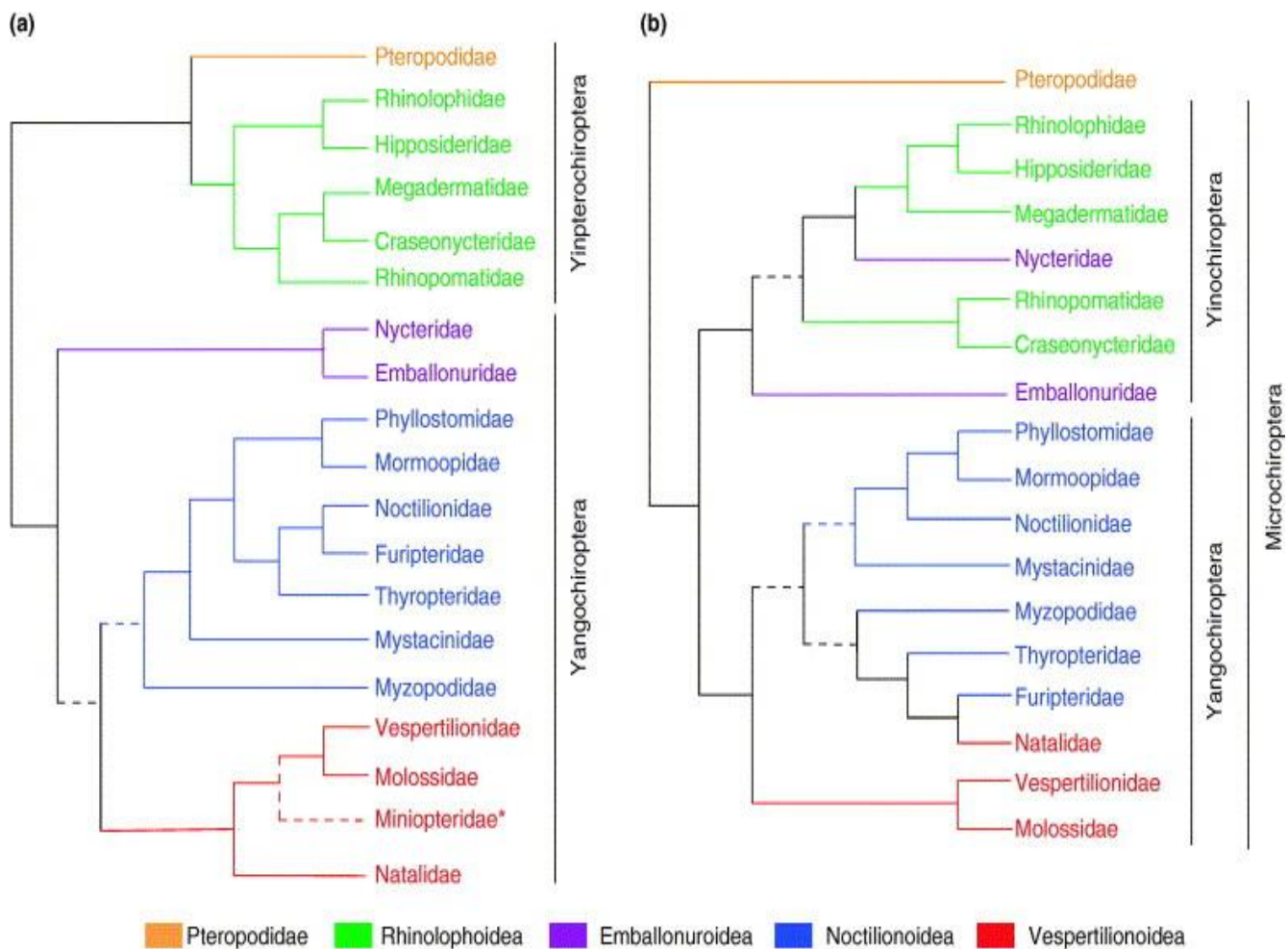


Figura 1: Classificação filogenética da Ordem Chiroptera. A) Nova classificação filogenética, baseada em estudos moleculares. Duas novas subordens: Yinpterochiroptera e Yangochiroptera. B) Classificação filogenética tradicional, análises restritas as características morfológicas e fisiológicas. Duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera. Fonte: (JONES; TEELING, 2006).

No Brasil, os morcegos apresentam uma grande riqueza de espécies, estima-se 174 espécies, inclusive uma das maiores ordens de mamíferos do país, sendo superada apenas pela Ordem Rodentia. A distribuição dos morcegos está classificada em 9 famílias: Emballonuridae (16 espécies), Furipteridae (1 espécie), Molossidae (28 espécies), Mormoopidae (4 espécies), Natalidae (1 espécie), Noctilionidae (2 espécie), Phyllostomidae (90 espécies), Thyropteridae (4 espécies) e Vespertilionidae (28 espécies), é válido salientar que algumas espécies encontram-se ameaçadas de extinção (PAGLIA et al., 2012). Os morcegos habitam diversas regiões fitogeográficas em todo território nacional, ocorrendo em áreas do Cerrado, Caatinga, Amazônia, Mata Atlântica, Pantanal, Pampas gaúchos, assim como em áreas urbanas (REIS et al., 2007).

Atrelado a essas informações, os morcegos apresentam outras particularidades, como o hábito noturno, em que a maioria das espécies inicia o forrageamento no crepúsculo, e posteriormente retornam ao abrigo antes do nascer do sol (ERKERT, 1982; REIS et al., 2007) e o hábito alimentar hematófago de algumas espécies. Essas características fazem com que esses animais sofram preconceito e repúdio pela sociedade, que são conhecidos como “seres malignos”, “vampiros”, etc, entretanto as importâncias ecológicas e biotecnológicas são pouco divulgadas (BIANCONI; MIKICH; PEDRO, 2004; SCAVRONI; PALEARI; UIEDA, 2008; MARQUES; ÔRTENCIO FILHO; MAGALHÃES, 2011).

3.2 HÁBITOS ALIMENTARES E IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA

As adaptações morfocomportamentais dos hábitos alimentares dos morcegos permitiram uma ampla plasticidade alimentar. As espécies pertencentes à subordem Yinpterochiroptera são predominantemente frugívoros e nectarívoros, e os que fazem parte da subordem Yangochiroptera apresentam diversos hábitos, como: onivoria, carnivoria, frugivoria, folivoria, piscivoria, insetivoria e hematofagia (FERRAREZI; GIMENEZ, 1996; NOGUEIRA; TAVARES; PERACCHI et al., 2003; PERACCHI et al., 2006; REIS et al., 2007; 2011).

Em virtude da diversidade de hábitos alimentares, os morcegos apresentam extrema importância para o meio ambiente, atuando como excelentes dispersores de sementes e polinizadores, o que contribui para a regeneração de fragmentos florestais, assim como no controle populacional de insetos e pragas (CHARLES-DOMINIQUE, 1991; FENTON et al., 1992; KUNZ; PIERSON, 1994; NOWAK, 1994). Atrelado a essas informações, este grupo é um excelente bioindicador de níveis de alterações ambientais e na identificação dos eventos biológicos envolvidos nas perdas e/ou transformações dos habitats naturais (FENTON et al., 1992; BIANCONI; MIKICH; PEDRO, 2004). Os morcegos ocupam uma variedade de habitats e ecossistemas, ambientes naturais conservados e degradados, estruturas construídas pelo homem, perímetro urbano ou em ambientes urbanos, podendo ocorrer espécies em parques, praças, frestas de residências, etc (PASSOS; PASSAMANI, 2003).

3.3 OS MORCEGOS E O VÍRUS RÁBICO

Apesar das importâncias ecológicas que os morcegos apresentam, esses animais podem ser reservatórios de diversas doenças, sobretudo a raiva (UIEDA; HARMANI; SILVA, 1995). A raiva é uma zoonose que atinge o sistema nervoso central, ocasionando uma encefalite aguda e fatal, que acomete diversos mamíferos. O vírus rábico pertence à família Rhabdoviridae e gênero *Lyssavirus* (TORDO, 1996; RUPPRECHT et al., 2002). Dentre as zoonoses, a raiva ainda permanece um sério problema de saúde pública, principalmente devido ao progresso letal da doença, assim como os registros de casos em humanos (RUPPRECHT et al., 2002; LIMA et al., 2005). Para a prevenção da raiva humana utiliza-se o tratamento profilático antirábico quando existe a suspeita da exposição ao vírus, podendo fazer uso da vacina antirábica ou o soro antirábico, sendo este último em casos considerados mais graves (RIGO; HONER, 2005).

Carini (1911) evidenciou pela primeira vez uma possível relação entre os morcegos e a raiva, a partir de um surto epizootico dessa doença em bovinos da Região Sul do Brasil, ao passo que o primeiro registro da positividade do vírus rábico em morcegos no Brasil ocorreu em 1921 (HAUPT; REHAAG, 1921). Dentre os mamíferos, o cão era o principal transmissor do vírus rábico em humanos, entretanto acarretou a diminuição de casos da doença após a inserção das campanhas de vacinação (SCHNEIDER; ALMEIDA; SOUZA, 1996). No entanto, no Brasil, atualmente os morcegos são considerados um dos mais importantes reservatórios silvestres, tornando-se o principal vetor de transmissão do vírus rábico em humanos (GOMES; UIEDA, 2004; LIMA et al., 2005; LIMA, 2008).

O hábito hematófago é um forrageamento altamente especializado, que exige adaptações morfofisiológicas e comportamentais. Dentre os morcegos, apenas 3 espécies se alimentam de sangue *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae), *Diaemus youngi* (Phyllostomidae) e *Diphylla ecaudata* (Phyllostomidae) (GREENHALL; SCHUTT 1996). *D. ecaudata* é reconhecida por se alimentar exclusivamente de sangue de aves, entretanto recentemente foi verificada a presença de sangue humano na dieta deste morcego (ITO; BERNARD; TORRES, 2016), o que torna preocupante essas mudanças de hábitos alimentares, considerando o risco eminente para a saúde pública.

Tradicionalmente, este vírus estava associado apenas aos morcegos hematófagos, entretanto existem inúmeros registros de positividade deste vírus em espécies insetívoras, frugívoras e onívoras (LIMA, 2008; SODRÉ; GAMA; ALMEIDA; 2010), inclusive em morcegos que habitam áreas antropomorfizadas (GERMANO et al., 1990; BARROS; BISAGGIO; BORGES, 2006; PACHECO et al., 2010).

No Brasil a raiva foi diagnosticada em aproximadamente 41 espécies de morcegos que pertencem às famílias Phyllostomidae, Vespertilionidae e Molossidae (SODRÉ; GAMA; ALMEIDA, 2010; SILVA et al., 2011). A maioria desses registros ocorre na Região Sudeste do Brasil. No Estado de São Paulo, 3 espécies de morcegos da família Molossidae (*Molossus molossus*, *Nyctinomops laticaudatus* e *N. macrotis*) foram diagnosticados com o vírus rábico, a princípio os comportamentos atípicos devem ser características cruciais para identificação de que os animais estejam doentes, sobretudo com raiva (UIEDA; HARMANI; SILVA, 1995). Em outros estudos na região supracitada, o vírus rábico foi isolado em *Lasiurus borealis* (Vespertilionidae) e *Myotis nigricans* (Vespertilionidae), *Artibeus lituratus* (Phyllostomidae) e *Artibeus fimbriatus* (Phyllostomidae) (MARTORELLI et al., 1995; MARTORELLI et al., 1996; PASSOS et al., 1999; CUNHA et al., 2005; CUNHA et al., 2006). Em uma área urbana do Rio de Janeiro foi constatada a raiva em morcego pertencente ao gênero *Artibeus sp* (Phyllostomidae) (MOUTINHO et al., 2015).

Na Paraíba, o relato da positividade do vírus rábico foi detectado para *M. molossus* (ARAÚJO et al., 2014), assim como no Estado de Pernambuco as espécies *M. nigricans*, *M. molossus*, *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae) (SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2012).

3.4 FAMÍLIA VESPERTILIONIDAE E A ESPÉCIE *Myotis lavalii*

A família Vespertilionidae compreende um grupo diverso de morcegos que ocorrem em áreas temperadas e tropicais, com aproximadamente 48 gêneros e 407 espécies e o hábito alimentar predominantemente insetívoro (CORBET; HILL, 1991; NOWAK, 1999; HOOFFER, 2003; SIMMONS, 2005; MARCHESIN et al., 2006;). Na América do Sul são reconhecidas mais 30 espécies, e especificamente para o Brasil, ocorrem 28 espécies (BIANCONI; PEDRO, 2007; GARDNER, 2008; PAGLIA et al., 2012). Os morcegos vespertilionídeos apresentam dimorfismo sexual, e as fêmeas

são maiores que os machos, principalmente no que se relacionam ao peso do corpo, medidas cranianas e comprimento do antebraço (BORNHOLDT et al., 2008).

Dentre as famílias de morcegos, os vespertilionídeos necessitam uma reavaliação taxonômica (MILLER, 1907; SIMMONS, 1998; GREGORIN; TAVARES, 2008). Relações filogenéticas foram propostas, mas ainda não existem caracteres conclusivos (VOLLETH; HELLER, 1994; SIMMONS, 1998). O gênero *Myotis*, pertence à subfamília Myotinae, e fazem-se necessárias revisões taxonômicas e filogenéticas para melhor elucidar as classificações em nível de espécie (GREGORIN; TAVARES, 2008), principalmente por apresentar um grande número de espécies e distribuição mundial, inclusive em ambientes urbanizados (MORATELLI et al., 2011). Esse gênero é o terceiro maior entre os mamíferos, e aproximadamente 103 espécies são reconhecidas (RUEDI; MAYER, 2001; SIMMONS, 2005).

Myotis lavalii (Figura 2) é uma espécie descrita recentemente, e poucos são os dados referentes à sua história natural, existem ocorrência nas áreas de Caatinga de Pernambuco e Ceará (MORATELLI; WILSON, 2013) e Mata Atlântica de Pernambuco (MORATELLI; WILSON, 2013; BARBIER et al., 2017).



Figura 2: Morcego da espécie *M. lavalii* macho coletado em áreas de Caatinga do Estado de Pernambuco. Fonte: (MORATELLI; WILSON, 2013).

As espécies identificadas como *M. nigricans* necessitam de revisão, pois podem se tratar de *M. lavalii*, inclusive os espécimes dos artigos publicados, principalmente no Nordeste do Brasil (MORATELLI; WILSON, 2013).

Os caracteres diagnósticos são orelhas médias, pelos longos e sedosos. A base do pelo tem sido uma característica específica para a identificação taxonômica, visto que as medidas cranianas se sobrepõem entre algumas espécies do gênero *Myotis*. Na região dorsal, os pelos são fortemente bicolor, com a base castanho médio, e as pontas marrom claro, ao passo que na região ventral também segue o padrão fortemente bicolor, com a base castanho-preto e as pontas castanho em tons de canela (Figura 3) (MORATELLI et al., 2011).



Figura 3A: região dorsal e 3B região ventral de *Myotis lavalii*. Observar as tonalidades dos pelos. Fonte: MORATELLI et al., 2011.

Assim como diversas espécies recém descritas, existem limites no conhecimento da sua biologia, principalmente em dados relacionados a reprodução. No Brasil, *M. lavalii* segue um padrão contínuo de atividade sexual, entretanto o

número de espécies foi reduzido, o que impediu delimitar o padrão reprodutivo anual (WILLIG, 1985; MORATELLI; WILSON, 2013).

3.5 FAMÍLIA MOLOSSIDAE e a espécie *Molossus molossus*

Os morcegos de cauda livre pertencem à família Molossidae, que ocorrem no Velho Mundo, do Sul da Europa e Ásia até a África, Malásia, Indonésia, Austrália e no Novo Mundo, do Sul e Oeste dos Estados Unidos, México e as Américas Central de do Sul (NOWAK, 1994). A família Molossidae é composta por aproximadamente 16 gêneros e 86 espécies distribuídos em diversos países (SIMMONS, 1998; SIMMONS, 2005; GARDNER, 2008). No Brasil, ocorrem aproximadamente 7 gêneros e 28 espécies (FABIÁN, GREGORIN, 2007; PAGLIA et al., 2012). Os molossídeos são morcegos insetívoros de hábito crepuscular. Em regiões temperadas podem utilizar as cavernas como abrigo, e formar colônias compostas por milhões de indivíduos (FENTON, 1992). Em áreas da região tropical, as colônias são menores, e contêm dezenas e centenas, ocasionalmente milhares de morcegos, que podem utilizar ocos de árvores como abrigo. No Brasil, a espécie encontra-se amplamente distribuída (MARINHO-FILHO; SAZIMA, 1998). Dentre os abrigos, destacam-se as áreas urbanas, como os edifícios, forros de residências, e por consequência um maior contato com a população humana, o que pode ocasionar a transmissão de zoonoses (BREDET et al., 1996; BREDET; UIEDA, 1996).

Os morcegos representantes dessa família apresentam o hábito alimentar exclusivamente insetívoro, e geralmente se alimentam em ambientes abertos, em virtude da ecolocalização de alta frequência, que alterna entre constante e modulada, estes animais conseguem capturar itens alimentares com sucesso (FREEMAN, 1981; BOGDANOWICZ et al., 1999; VAN DEN BUSSCHE; HOOFFER, 2004; ECK et al., 2005; GREGORIN; CIRRANELL, 2015).

O gênero *Molossus* pertence à subfamília Molossinae, com ocorrência do Sul dos Estados Unidos ao Sul da Argentina (LOPÉZ-GONZÁLEZ; PRESLEY, 2001). A espécie *M. Molossus* apresenta características em relação à pelagem dorsal mais aveludada, a base do pelo é mais clara, e a região ventral mais clara quando comparada a dorsal (Figura 4) (FÁBIAN; GREGORIN, 2007). No que se relaciona

ao dimorfismo sexual, em algumas regiões podem ocorrer prioritariamente machos maiores que as fêmeas.



Figura 4: Morcego da espécie *Molossus molossus*. Fonte: NOVAES, R.L.M. Disponível em: <http://morcegosdobrasil.blogspot.com.br/2011/12/molossus-molossus.html>

As espécies do gênero *Molossus* apresentam hábitos diversos, tanto em áreas florestais quanto áreas urbanas, podem ser encontradas em colônias debaixo de folhas, forros de casa, galpões (FREEMAN, 1981). Por apresentar ocorrência em ambientes antropomórficos, conseqüentemente acarreta uma maior proximidade com os seres humanos, fornecendo um potencial risco epidemiológico (ALMEIDA et al.1994; UIEDA et al., 1995; ALTRINGHAM, 1996).

No que se relaciona a atividade sexual, machos adultos apresentam uma glândula gular, situada na posição episternal, que possivelmente tem função hedônica, relacionado à demarcação de território e atração sexual, no entanto são especulações, e não se sabe com exatidão a funcionalidade (TADDEI et al., 2001). No Estado do Ceará, as fêmeas de *M. molossus* apresentam um padrão poliétrico,

bem como apenas um filhote por gestação, ao passo que os machos apresentaram dois padrões: machos sexualmente ativos (espermatozoides no epidídimo), e machos inativos (sem espermatozoides no epidídimo), no entanto é válido salientar que machos sexualmente ativos foram coletados durante quase todo o ano, o que sugere o armazenamento de espermatozoides fora do período de acasalamento (FABIÁN; MARQUES, 1989). Em contraste, Morais et al., (2013) verificaram que os machos dessa espécie no Estado de Minas Gerais apresentam o ciclo reprodutivo contínuo, sem evidências de regressão testicular, e os picos de atividade espermatogênica ocorreram durante o outono e o inverno, assim como uma menor capacidade de suporte das células de Sertoli. Morais et al., (2012) verificaram que o ciclo do epitélio seminífero de *M. molossus* apresenta oito estágios e dez etapas para a formação acrosomal, ao passo que a espermiogênese pode ser agrupada em 12 etapas, bem como a formação do acrossoma apresenta similaridade as demais espécies de mamíferos, contudo as análises ultraestruturais dos espermatozoides indicaram características peculiares, como diversas projeções acrossomais onduladas (BEGUELINI; TABOGA; VERSUTE, 2012).

3.6 BIOLOGIA REPRODUTIVA DE MORCEGOS

Dentre os mamíferos, os morcegos compreendem a segunda Ordem mais diversa em espécies, bem como apresentam uma ampla importância ecológica e epidemiológica (GARDNER, 2008). E no que se relacionam à biologia reprodutiva, os estudos ainda permanecem escassos (BEGUELINI, 2008; BEGUELINI et al., 2011). Os morcegos, em sua maioria, apresentam um sistema de acasalamento poligínico, com formação de haréns, assim, um macho adulto dominante pode copular com diversas fêmeas, ao passo que a minoria apresenta um sistema de acasalamento monogâmico, com a proporção de um macho para uma fêmea (MCCRACKEN; WILKINSON, 2000; ZORTÉA, 2003, MELLO et al. 2009).

Os ciclos reprodutivos estão intensamente associados à disponibilidade de alimentos e fatores climáticos, assim as estratégias reprodutivas são diversas dentro de uma família, gênero, inclusive dentro de uma mesma espécie, atreladas a isso, evolutivamente os morcegos desenvolveram características reprodutivas peculiares que necessitam de adaptações morfofisiológicas, como: a regressão dos túbulos seminíferos, o armazenamento prolongado de espermatozoides viáveis na cauda do

epidídimo e nos cornos uterinos, sincronia entre a espermatogênese e o período de cópula, bem como os atrasos na ovulação, fertilização, implantação e no desenvolvimento embrionário (ANAND-KUMAR, 1965; RACEY; TAM, 1974; GUSTAFSON, 1979; RACEY, 1979; RASWEILER, 1993; KRUTZSCH; CRICHTON, 2000; VOIGT, 2003; ENCARNAÇÃO; DIETZ; KIERDORF, 2004; SHARIFI; GHORBANI; AKMALI, 2004; SHARIFI; AKMALI; GHORBANI, 2008).

A reprodução dos morcegos pode ser do tipo sazonal ou assazonal, e assim acreditava-se que os padrões reprodutivos estavam restritos a quatro tipos básicos: monoestria sazonal (um pico reprodutivo anual), poliestria sazonal (diversos picos reprodutivos anual, porém apresenta um período de inatividade sexual), poliestria assazonal (picos reprodutivos anual) e poliestria sazonal biomodal (dois picos reprodutivos anual) (FLEMING et al., 1972; WILLIG, 1985). Entretanto, em morcegos africanos foram constatados 10 padrões reprodutivos com base na morfologia externa das gônadas das fêmeas: a) monoestria sazonal restrita (um pico reprodutivo anual, e um longo período de inatividade sexual, implantação tardia e desenvolvimento embrionário retardado), b) monoestria sazonal prolongada (um pico reprodutivo anual, o desenvolvimento embrionário e o parto podem ocorrer em mais de uma estação climática, enquanto que a lactação ocorre principalmente em uma estação climática), c) monoestria assazonal (um pico reprodutivo anual, as fêmeas não apresentam sincronia entre a reprodução e as estações climáticas), d) poliestria bimodal do tipo I (dois picos reprodutivos anuais, as fêmeas apresentam sincronia entre a reprodução e as estações climáticas, e, portanto a prole nasce em períodos distintos. Ainda sendo possível evidenciar o estro pós-parto, com fêmeas grávidas e lactantes simultaneamente), e) poliestria biomodal do tipo II (dois picos reprodutivos ao ano, a prole nasce em duas estações climáticas distintas, sem estro pós-parto), f) poliestria bimodal contínua (os dois picos reprodutivos estão em sincronia com as estações climáticas, assim as proles nascem em dois períodos distintos, com aproximadamente seis meses de intervalo), g) poliestria multimodal sazonal (três ou mais picos reprodutivos por ano relacionados às estações climáticas, com estro pós-parto, posteriormente um período de inatividade sexual, que antecede a próxima temporada reprodutiva), h) poliestria multimodal contínua tipo I (três ou mais picos reprodutivos, com estro pós-parto após cada nascimento, e os partos não se restringem apenas a uma única estação climática, i) poliestria multimodal contínua

tipo II (três ou mais picos reprodutivos durante o ano, sem nenhuma evidência de estro pós-parto, e os partos não se restringem apenas a uma única estação climática) e j) poliestria assazonal (dois ou mais picos reprodutivos por ano em todas as estações climáticas) (HAPPOLD; HAPPOLD, 1990).

Essa diversidade de padrões demonstra a necessidade de ampliar os estudos relacionados à biologia reprodutiva, principalmente no Brasil, visto que possivelmente outras estratégias reprodutivas ainda não foram descritas, principalmente relacionadas à sazonalidade.

3.7 TESTÍCULOS

Os testículos dos morcegos são órgãos pares de formato oval a arredondados localizados na região escrotal, apresentando função endócrina (produção hormonal) e exócrina (produção de espermatozoides) (BORDIGNON; FRANÇA, 2012; BEGUELINI et al., 2013a; BEGUELINI et al., 2013b; BEGUELINI et al., 2013c). Externamente são envolvidos por uma cápsula de tecido conjuntivo, denominada túnica albugínea, ao passo que os septos testiculares convergem para o interior do órgão, e assim dividindo-o em lóbulos, que estão inseridos os túbulos seminíferos (MORAIS et al., 2013; BEGUELINI et al., 2013d; BEGUELINI et al., 2013e). Os testículos podem migrar entre a região escrotal e a cavidade abdominal, principalmente quando submetidos a estresse ou por influência da sazonalidade, e assim promovem a proteção dos espermatozoides (KRUTZSCH, 2000; LIMA JUNIOR et al., 2014).

Histologicamente, os testículos são organizados por dois compartimentos, o tubular, que representa grande parte do órgão, entre 70% a 90%. Nesse compartimento, encontram-se os túbulos seminíferos que são constituídos pelo epitélio seminífero e a luz e/ou lúmen do túbulo. Neste epitélio encontram-se as células espermatogênicas em diversos estágios de maturação, como: espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozóides, assim como as células de Sertoli. Enquanto que o compartimento intertubular, constitui-se pelas células de Leydig (sínteses de testosterona e estradiol), fibroblastos, vasos sanguíneos e linfáticos (CRICHTON, 2000; MORAIS et al., 2014).

Assim como nos demais mamíferos, as células de Sertoli são responsáveis pelo suporte das células espermatogênicas, bem como na formação da barreira hemato-testicular, visto que as junções de oclusão dividem o epitélio germinativo em duas regiões, a basal, que se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários (fase pré-leptóteno), e no adluminal, que se encontram os espermatócitos secundários e as espermatídes, de tal forma que fornecem o máximo de proteção ao epitélio seminífero, impedindo que substâncias atinjam as células espermatogênicas (RUSSELL et al., 1990; SETCHELL, 1991; POCCIA, 1994; SHARPE, 1994; MORAIS et al., 2013; MORAIS et. al., 2014). Estudos também refletem que as células de Sertoli apresentam fatores necessários para estimular a esteroidogênese (CRICHTON, 2000; GRISWOLD; SKINNER, 2004). Ao passo que existem fortes evidências que apontam as células de Leydig como a principal fonte de síntese de testosterona. As mudanças no tamanho, número e ultraestrutura dessas células são fontes indicadoras de atividade esteroidogênica, no entanto durante o período não reprodutivo, as glândulas adrenais podem produzir baixos níveis plasmáticos de testosterona (MCGUCKIN; BLACKSHAW, 1991). Essas células apresentam morfologia irregular, podendo ser encontradas de forma isolada ou agrupadas, estando separadas por um tecido extracelular tênue e a estrutura do núcleo é proeminente, desde a morfologia circular a oval (BEGUELINI et al., 2011).

A capacidade reprodutiva dos machos está associada diretamente na atividade testicular, tanto na produção de grande número de espermatozóides viáveis, como nas concentrações hormonais adequadas para estimular a libido e a maturação dos órgãos reprodutivos (GIER; MARION, 1970).

3.8 ESPERMATOGÊNESE

O hormônio folículo estimulante (FSH) influencia diretamente o início e a manutenção da espermatogênese dos túbulos seminíferos, assim como o hormônio luteinizante (LH) regula a produção de testosterona pelas células de Leydig, que é responsável por fornecer suporte a espermatogênese e as características masculinas secundárias (BEGUELINI et al., 2011; MORAIS et. al., 2014).

A espermatogênese consiste em um processo complexo, que ocorre nos túbulos seminíferos, e posteriormente resulta na produção dos espermatozoides,

através de um processo denominado espermiogênese (RACEY; TAM, 1974). As células presentes no epitélio germinativo são classificadas de acordo com a morfologia nuclear, as divisões meióticas, etc. A princípio, ocorre a fase proliferativa ou espermatogonial, e as espermatogônias passam por sucessivas mitoses para uma maior produção de espermatogônias do tipo A e espermatogônias do tipo B entrarão em diferenciação de espermatócitos (COSTA; PAULA, 2003; FRANÇA; GODINHO, 2003; BEGUELINI et al., 2011; MORAIS et. al., 2014). Posteriormente, os espermatócitos seguem as divisões meióticas, formando as espermátides (RUSSELL et al., 1990), enquanto que a última fase da espermatogênese, denomina-se espermiogênese, evento longo que ocorrem diversas mudanças morfológicas, e resulta na diferenciação das espermátides arredondadas em espermátides alongadas, e posteriormente em espermatozóides que serão liberados no lúmen do túbulo seminífero (CLERMONT, 1972; HESS; FRANÇA, 2008; BEGUELINI et al., 2011; MORAIS et. al., 2014).

No Estado de São Paulo, os estudos sobre a espermatogênese dos morcegos têm sido realizados. Beguelini et al., (2009) estudaram a espermatogênese de 6 espécies de morcegos, 5 pertencentes a família Phyllostomidae (*Artibeus lituratus*, *A. planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Platyrrhinus lineatus* e *Sturnira lilium*) e 1 a família Vespertilionidae (*M. nigricans*), verificando três tipos distintos de espermatogônias (tipo escuro A, tipo claro A e B), sendo o ciclo espermatogênico contínuo similar para a maioria dos mamíferos, no entanto *M. nigricans* apresentou características peculiares, como os ciclos não definidos e sobreposição de fases no epitélio seminífero, essas divergências, possivelmente estão relacionadas a distância filogenética entre as famílias Phyllostomidae e Vespertilionidae. Beguelini et al., (2013c) verificaram que *M. nigricans* regula a reprodução com dois picos de investimento espermatogênico, ao passo que a regressão testicular foi evidenciada em dois períodos distintos, visto que apenas espermatogônias e células de Sertoli foram observadas no epitélio seminífero, neste período observa-se que ocorre uma diminuição na expressão dos receptores de andrógenos. Em outros estudos, Beguelini et al., (2011), Beguelini et al., (2013e) e Beguelini et al., (2013d) analisaram a ultraestrutura da atividade espermatogênica de *P. lineatus*, constatando as células da linhagem espermatogênica, as células de Sertoli e de Leydig, bem como os espermatozoides, características estas similares aos primatas,

ao passo que *C. perspicillata* apresenta uma espermatogênese semelhante aos demais morcegos, sobretudo a existência de 12 fases para espermiogênese. Através de análises ultraestruturais, a espermatogênese de *M. nigricans* apresentou recrudescência testicular na estação da primavera, entretanto quando encontram-se em atividade espermática, as características morfológicas são similares as outras espécies de morcegos.

A biologia reprodutiva de machos de *A. planirostris* na região supracitada foi investigada por Beguelini et al., (2013b), verificaram a biologia reprodutiva de machos dessa espécie, evidenciando dois picos espermatogênicos acentuados, entretanto a produção de espermatozoides permanece contínua durante o ciclo anual. Beguelini et al., (2013a) realizou um intenso estudo com machos de 18 espécies de morcegos (*Peropteryx macrotis*, *Rhynchonycteris naso*, *Eumops glaucinus*, *Molossops temminckii*, *M. molossus*, *M. rufus*, *A. lituratus*, *A. planirostris*, *C. perspicillata*, *Glossophaga soricina*, *Phyllostomus discolor*, *P. lineatus*, *Noctilio albiventris*, *Eptesicus furinalis*, *Histiotus velatus*, *Lasiurus blossevillii*, *M. albescens* e *M. nigricans*), que pertencem a 5 famílias (Emballonuridae, Molossidae, Phyllostomidae, Noctilionidae e Vespertilionidae), os testículos de Phyllostomidae e Noctilionidae estavam presentes na região inguinal, possivelmente não ocorre oscilações entre a região inguinal e abdominal em morcegos destas famílias. Os vespertilionídeos exibiram testículos escrotais, no entanto as espécies das famílias Emballonuridae e Molossidae apresentaram testículos que oscilavam entre a cavidade abdominal e o escroto. Tais migrações testiculares podem ocorrer por diversos fatores, inclusive em momentos de estresse animal. Outro fator observado nesse estudo foi a recrudescência testicular (apenas espermatogônias e células de Sertoli no epitélio seminífero) e a estocagem de espermatozoides viáveis na cauda do epidídimo em 5 espécies da família Vespertilionidae (*E. furinalis*, *H. velatus*, *L. blossevillii*, *M. albescens* e *M. nigricans*).

A espermatogênese de *M. levis* em uma área de transição entre a Mata Atlântica e o Cerrado do Estado de Minas Gerais foi estudada por Araújo et al., (2013), que verificaram 4 períodos diferentes, a) repouso, na qual ocorreu uma redução do diâmetro dos túbulos seminíferos, e o epitélio continha apenas espermatogônias e células de Sertoli, b) maturação, nessa fase o diâmetro ainda permaneceu reduzido, porém maiores que a fase de repouso. No epitélio seminífero,

além das espermatogônias e as células de Sertoli, foi possível observar os espermatócitos primários, c) maturidade, foi possível observar um maior diâmetro e altura do epitélio seminífero, e por consequência todas as células espermatogênicas e as células de Sertoli. Farias et al., (2014) constataram que durante a estação seca a espécie supracitada apresentou testículos em regressão durante o período seco, entretanto a sazonalidade não influencia no diâmetro do núcleo das células de Leydig.

Na Mata Atlântica do Estado de Minas Gerais, *A. lituratus* apresentou a maioria dos espécimes possuíam grandes testículos escrotais e com todas as células da linhagem espermatogênica, assim apresentaram atividade espermática ao longo do ciclo anual, no entanto alguns animais seguiram um padrão de testículos menores e escrotais, e apenas espermatogônias, espermatócitos e células de Sertoli estavam presentes no epitélio seminífero (DUARTE; TALAMONI, 2010). Nessa mesma área, *A. lituratus* não apresentou diferenças significativa para as variáveis: diâmetros dos túbulos seminíferos e nuclear das células de Leydig, assim como o índice gonadossomático entre as estações seca e chuvosa, assim todos os animais apresentaram atividade espermática ao longo do ano (NOTINI et al., 2015).

Morais et al., (2013b), Moraes et al., (2014a), Moraes et al., (2014b) e Moraes et al., (2017) em pesquisas no mesmo Bioma e Estado, constataram que *Sturnira lilium* (Phyllostomidae) exibiu um ciclo do epitélio seminífero constituído por 8 fases distintas, similar aos demais mamíferos, no entanto uma característica peculiar foi observada, uma menor duração da espermatogênese, constatando também diferenças significativas entre os componentes testiculares durante as estações seca e chuvosa, a medida que as análises histológicas e ultraestruturais indicaram uma atividade espermatogênica contínua, entretanto a sazonalidade influenciou na concentração de espermatozoides do testículo no período chuvoso, e uma menor capacidade de suporte das células de Sertoli. Entretanto no compartimento intertubular não houve diferenças entre as estações em relação aos níveis séricos de testosterona, número de células de Leydig e índice leydigossomático. Ao passo que o morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae) apresentaram um maior investimento no índice gonadossomático (0,54%), sobretudo quando comparado aos demais mamíferos, no compartimento intertubular 51,20% foi constituído pelas células de Leydig. O processo espermatogênico tem um

rendimento em torno de 60%, o que demonstra uma elevada produção de espermatozoides.

O morcego *Noctilio leporinus* (Noctilionidae) em áreas de Mata Atlântica do Estado do Paraná apresentou atividade espermatogênica durante todo o ano, e existe uma sincronia entre o aumento da massa corporal, da massa testicular e do diâmetro dos túbulos seminíferos (BORDIGNON; FRANÇA, 2012).

3.9 EPIDÍDIMOS E ESTOCAGEM DE ESPERMATOZOIDES EM MORCEGOS

Os epidídimos consistem em túbulos enovelados e contorcidos, com basicamente três regiões distintas: cabeça, corpo e cauda, entretanto existem espécies de morcegos que apresentam mais uma região, o segmento inicial, que é anterior a cabeça (BEGUELINI et al., 2010). O processo de maturação espermática tem início nas primeiras regiões do epidídimo (segmento inicial e cabeça), ao passo que os processos avançados de maturação ocorrem no corpo, e os espermatozoides se tornam maduros e funcionais na cauda (HERMO; ROBAIRE, 2002; BELLEANNÉE; THIMON; SULLIVAN, 2012; ARAÚJO et al., 2013). Existem diferentes células nos túbulos do epidídimo, que tem por funcionalidade a absorção e secreção, dentre estas, destacam as células principais, basais, estreitas, claras, halo e apicais. Essas células apresentam funções importantes, como a secreção, absorção, proteção, barreira imunológica, etc (HERMO; ROBAIRE, 1994; ADAMALI; HERMO, 1996; SERRE; ROBAIRE, 1998; CRICHTON, 2000; KRUTZSCH, 2000; ARAÚJO et al., 2013).

Os espermatozoides produzidos nos testículos são direcionados aos epidídimos, que é um órgão andrógeno-dependente, assim os gametas masculinos apresentam progressiva motilidade e capacidade fecundante, principalmente pela interação com as proteínas secretadas pelo epitélio, e posteriormente ficam armazenados até a ejaculação (AGUILERA-MERLO et al., 2005; AHMED et al., 2009; BEU; ORSI; DOMENICONI, 2009).

Durante o processo evolutivo, os morcegos desenvolveram estratégias para otimizar o sucesso reprodutivo, como a regressão testicular, que os espermatozoides ficam estocados na cauda do epidídimo, assim existe uma sincronia entre a espermatogênese e o período de acasalamento (CRICHTON,

2000; ARAÚJO et al., 2013). Diversas espécies de morcegos têm demonstrado esse comportamento reprodutivo, no Estado de São Paulo *M. nigricans* apresentou armazenamento de espermatozoides na cauda do epidídimo nos meses de maio e junho (BEGUELINI et al., 2013c). Em outro estudo, Beguelini et al., (2015) evidenciaram que a espécie em questão apresenta uma atividade morfofisiológica epididimária contínua regulada pela testosterona.

Farias et al., (2014) constataram que *M. levis* apresentaram a estocagem de espermatozoides na cauda do epidídimo, sobretudo no período de recrudescência testicular em áreas de transição entre a Mata Atlântica e o Cerrado de Minas Gerais. Outros estudos na mesma região e espécie demonstraram 4 tipos de estratégias reprodutivas: a) fase de repouso, que ocorreu ausência total de espermatozoides, b) fase de maturação, a cabeça e a cauda do epidídimo tiveram ocasionalmente poucos espermatozoides, c) fase de maturidade, a cabeça e a cauda do epidídimo apresentaram uma grande concentração de espermatozoides, d) fase de acasalamento, a cabeça do epidídimo não tinha espermatozoides, ao passo que a cauda apresentou grande concentração, que resultou em um maior diâmetro dos túbulos epididimários (ARAÚJO et al., 2013). Esses achados demonstram que uma mesma espécie pode desenvolver diversas estratégias reprodutivas, que depende das condições ambientais e climáticas que predominam na região.

CASTRO et al., (2017) analisaram a ultraestrutura e morfometria do epidídimo de *D. rotundus*, sendo este constituído por túbulos que foi o principal componente das 4 regiões, segmento inicial (83%), cabeça (90%), corpo (88%) e cauda (80%). O epitélio epididimal diminuiu progressivamente da cabeça até a cauda, assim como as células principais e basais foram mais frequentes na cauda do epidídimo, enquanto que o número das células claras não teve aumento.

Dentro dessa perspectiva, a biologia reprodutiva de diversas espécies de morcegos permanece pouco investigada, principalmente sobre a influência das variações sazonais nos parâmetros histomorfométricos dos testículos e epidídimos, bem como nas concentrações plasmáticas de testosterona.

REFERÊNCIAS

- ADAMALI, H.I.; HERMO, L. Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis, **Journal of Andrology**, v.17, p.208-222, 1996.
- AKER, R. J., MCDONOUGH, M. M., SWIER, V. J., LARSEN, P. A., CARRERA, J. P.; AMMERMAN, L. K. New species of bonneted bat, genus *Eumops* (Chiroptera: Molossidae) from the lowlands of western Ecuador and Peru. **Acta Chiropterologica**, v.11, p.1–13, 2009.
- ALBUQUERQUE, P.; SILVA, L.A.M.; CUNHA, M.C.C.; SILVA, C.J.; MACHADO, L.M.M.; MELO, M.L.; ALENCAR, V.I.B. Vigilância epidemiológica da raiva em morcegos no Município de Moreno, Pernambuco, Brasil, **Revista Biociências**, v. 18, n.2, p. 5 - 13, 2012.
- ALMEIDA, M. H.; DITCHFIELD, D. A.; TUKUMARU, R. S. Atividade de morcegos e preferência por habitat na zona da Grande Vitória, ES, Brasil. **Revista Brasileira de Zociências**, v.9, n.1, p.13-18, 2007.
- ALTRINGHAM, J.D. Bats. **Biology and behavior**. Oxford Univ. Press, Oxford, 1996.
- AMMERMAN, L. K.; LEE, D. N.; TIPPS, T. M. First molecular phylogenetic insights into the evolution of free-tailed bats in the subfamily Molossinae (Molossidae, Chiroptera). **Journal of Mammalogy**, v.93, n.1, p.12–28, 2012.
- ARAÚJO, J.L.; NASCIMENTO, M.E.; DANTAS, A.F.; GALIZA, G.J.N.; PEDROSO, P.M.O; SILVA, M.L.C.R.; RIET-CORREA, F. Rabies in the insectivorous Pallas's Mastiff bat (*Molossus molossus*) in northeastern Brazil, **Journal of Wildlife Diseases**, v.50, p.883–886, 2014.
- ARAÚJO, R. A.; AMARO, B. D.; TALAMONI, S. A.; GODINHO, H. P. Seasonal reproduction of Yellowish Myotis, *Myotis levis* (Chiroptera: Vespertilionidae), from a Neotropical Highland, **Journal of Morphology**, v.274, p. 1230-1238, 2013.
- BARHLEY, L. J. 1984. Evolutionary relationships and natural history of *Tomopeas ravus* (Mammalia: Chiroptera). M.Sci. Thesis, **Louisiana State University**, Baton Rouge, p.100, 1984.
- BARROS, R.S.M.; BISAGGIO, E.L.; BORGES, R.C. Morcegos (Mammalia, Chiroptera) em fragmentos florestais urbanos no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v.6, n.1, p.1-6, 2006.

- BAUD, F.J.; MENU, H. Paraguayan bats of the genus *Myotis*, with a redefinition of *M. simus* (Thomas, 1901). **Revue Suisse De Zoologie.**, v. 100, n. 3, p. 595-607, 1993.
- BEGUELINI, M. R.; PUGA, C. C. I.; MARTINS, F. F.; BETOLI, A. H. S.; TABOGA, S. R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Morphological Variation of Primary Reproductive Structures in Males of Five Families of Neotropical Bats. **The Anatomical Record**, v. 296, p.156–167, 2013a.
- BEGUELINI, M. R.; PUGA, C. C. I.; TABOGA, S. R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Annual reproductive cycle of males of the flat-faced fruit-eating bat, *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). **General and Comparative Endocrinology**, v.185, p.80–89, 2013b.
- BEGUELINI, M. R.; GOES, R. M.; TABOGA, S. R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Two periods of total testicular regression are peculiar events of the annual reproductive cycle of the black *Myotis* bat, *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). **Reproduction, Fertility and Development**, v.26, p.834–846, 2013c.
- BEGUELINI, M. R.; TABOGA, S. R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Ultrastructural characteristics of the spermatogenesis during the four phases of the annual reproductive cycle of the black *Myotis* bat, *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). **Microscopy Research and Technique**, v.76, p.1035–1049, 2013d.
- BEGUELINI, M. R.; BUENO, L. M.; CAUN, D. L.; TABOGA, S. R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Ultrastructure of Spermatogenesis in the Short-Tailed Fruit Bat, *Carollia perspicillata* (Chiroptera: Phyllostomidae: Carollinae), **Journal of Morphology**, v. 275, n. 1, p. 111-123, 2013e.
- BEGUELINI, M. R.; GOES, R. M.; RAHAL, P.; MORIELLE-VERSUTE, E., TABOGA, S. R. Impact of the Processes of Total Testicular Regression and Recrudescence on the Epididymal Physiology of the Bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). **PLOS One**, p.1-18, 2015.
- BEGUELINI, M. R.; MOREIRA, P. R. L.; FARIA, K. C.; MARCHESIN, S. R.C.; MORIELLE-VERSUTE, E. Morphological Characterization of the Testicular Cells and Seminiferous Epithelium Cycle in Six Species of Neotropical Bats. **Journal of Morphology**, v. 270, p.943–953, 2009.
- BEGUELINI, M. R.; PUGA, C. C. I.; TABOGA, S. R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Ultrastructure of spermatogenesis in the white-lined broad-nosed bat, *Platyrrhinus lineatus* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Micron**, v.42, p.586–599, 2011.
- BEGUELINI, M. R.; SERGIO, B. F. S.; LEME, F. L. J.; TABOGA, S. R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Morphological and morphometric characteristics of the epididymis in the Neotropical bats *Eumops glaucinus* and *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). **Chiroptera Neotropical**, v.16, n.2,p. 769 – 779, 2010.

BELLEANNÉE, C.; THIMON, V.; SULLIVAN, R. Region-specific gene expression in the epididymis. **Cell and Tissue Research**, v.349, 717–731, 2012.

BEU, C. C.; ORSI, A.M. DOMENICONI, R. F. Structure of the lining epithelium of the cauda epididymis of the golden hamster. **Anatomia, Histologia and Embryologia**, v. 38, n.1, p.49-57, 2009.

BIANCONI, G. V.; MIKICH, S. B.; PEDRO, W. A. Diversidade de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em remanescentes florestais do município de Fênix, noroeste do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.2, n.4, p. 943-954, 2004.

BIANCONI, G. V.; PEDRO, W. A. Família Vespertilionidae. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Eds.). *Morcegos do Brasil*. Londrina, 2007. p. 167-195.

BORDIGNON, M. O.; FRANÇA, A. O. Reproduction of the greater bulldog bat *Noctilio leporinus* (Chiroptera: Noctilionidae) in a mangrove area in southern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 12, n. 4, 2012.

BORNHOLT, R, OLIVEIRA LR, FABIÁN ME. Sexual size dimorphism in *Myotis nigricans* (Schinz, 1821) (Chiroptera: Vespertilionidae) from south Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.68, n.4, p.897-904, 2008.

BREDT, A.; ARAÚJO, F.A.A.; CAETANO-JUNIOR, J.; RODRIGUES, M.G.R.; YOSHIZAWA, M.; SILVA, M.M.S.; HARMANI, N.M.S.; P.N.T. MASSUNAGA; S.P. BURER; V.A.R PORTO; UIEDA, W. **Morcegos de áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle**. Brasília, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, p.117, 1996.

BREDT, A.; UIEDA, W. Bats from urban and rural environments of the Distrito Federal, Mid-western Brazil. **Chiroptera Neotropical**, v.2, n.2, p.54-57, 1996.

BRITO, J.E.C.; GAZARINI, J.; ZAWADZKI, C.H. Abundância e frugivoria da quiropterofauna (Mammalia, chiroptera) de um fragmento no noroeste do Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.32, p.265-271, 2010.

CARINI, A. Sur une grande epizootie de rage. **Ann. Inst. Pasteur.**, v.25, p.843-846. 1911.

CASTRO, M.M.; GONÇALVES, W.G.; TEIXEIRA, S.A.M.V.; FIALHO, M.D.C.Q.; SANTOS, F.C.; OLIVEIRA, J.M.; SERRÃO, J.E.; MACHADO-NEVES, M. Ultrastructure and morphometric features of epididymal epithelium in *Desmodus rotundus*. **Micron**, v.102, p. 35-43, 2017.

COOPER, T.G. Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. **Asian Journal of Andrology**, v.9, p. 533-539, 2007.

CORBET, G. B.; J. E. HILL. A world list of mammalian species. Third edition. **Natural History Museum Publications**. Oxford University Press, New York, p. 243, 1991.

COSTA, D.S.; PAULA, T.A.R. Espermatogênese em mamíferos. **Scientia**, v.4, p. 53-72, 2003.

CRICHTON, E. G. Sperm storage and fertilization. In: *Reproductive Biology of Bats*. (E. G. Crichton and P. H. Krutzsch, eds). London: **Academic Press**. p. 295-320, 2000.

CRICHTON, E.G.; KRUTZSCH, P.H. **Reproductive Biology of Bats**. Academic Press, p.510, 2000.

CUNHA, E. M. S.; SILVA, L. H. Q.; SOUZA, M. C. C.; LARA, H.; NASSAR, A. F. C.; ALBAS, A.; SODRÉ, M. M.; PEDRO, W. A. Bat rabies in the northnorthwestern regions of the state of São Paulo, Brazil: 1997-2002. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 6, p.1082-1086, 2006.

CUNHA, E.M.S.; LARA, M. C.C.S.H.; NASSAR, A.F.C.; SODRÉ, M.M.; AMARAL, L.F.V. Isolamento do vírus da raiva em *Artibeus fimbriatus* no Estado de São Paulo, **Revista de Saúde Pública**, v.39, n.4, p. 683-684, 2005.

DOLAN, P. G. Systematics of Middle American mastiff bats of the genus *Molossus*. Special Publications, **Texas Tech Museum University**, v.29, p.1-71, 1989.

DUARTE, A. P. G.; TALAMONI, S. A. Reproduction of the large fruit-eating bat *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae) in a Brazilian Atlantic forest area **Mammalian Biology**, v.75. p.320–325, 2010.

EGER, J. L. 2008. Family Molossidae P. Gervais. In: *Mammals of South America* (A. L. Gardner, ed.). University of Chicago Press, Chicago, Illinois, p.399-440, 1856.

EGER, J. L. Systematics of the genus *Eumops* (Chiroptera: Molossidae). **Life Science Contributions, Royal Ontario Museum**, v.110, p. 1-69, 1982.

EMMONS, L. H.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals: a field guide**. Chicago, The University of Chicago Press, 1997.

ERKERT, H.G.. Ecological aspects of bat activity rhythms, In: T.H. KUNZ (Ed.). **Ecology of bats**. New York, Plenum Press, v.18. p. 201-242, 1982.

ESTRADA, A.; COATES-ESTRADA, R. Species composition and reproductive phenology of bats in a tropical landscape at Los Tuxtlas, México. **Journal of Tropical Ecology**, v.17, p. 672-646, 2001.

FARIAS, T. O.; NOTINI, A. A., TALAMONI, S. A.; GODINHO, H. P. Testis Morphometry and Stages of the Seminiferous Epithelium Cycle in an Epididymal Sperm-storing Neotropical Vespertilionid, *Myotis levis* (Chiroptera). **Journal of Veterinary Medicine**, 2014.

FERRAREZI, H.; GIMENEZ, E. A. Systematic patterns and the evolution of feeding habits in Chiroptera (Archonta: Mammalia). **Journal of Computational Biology**, v.1, p.75-94, 1996.

FLEMING, T.H.; HOOPER, E.T.; WILSON, D.E. Three central American bat communities: structure, reproductive cycles and movement patterns. **Ecology**, v. 53, p. 555 – 569, 1972.

FRANÇA, L.R, GODINHO, C.L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1554-1561, 2003.

FREEMAN, P. W. 1981. A multivariate study of the family Molossidae (Mammalia: Chiroptera): morphology, ecology, evolution. **Fieldiana: Zoology (New Series)**, v.7, p.1–173.

GARCIA, Q.S; REZENDE, J.L.P.; AGUIAR, L.M.S. Seed dispersal by bats in a disturbed area of Southeastern Brazil. **Revista De Biologia Tropical**, v.48, p.125-128, 2000.

GARDNER, A.L. Order Chiroptera. In: GARDNER A.L. (eds) **Mammals of South America (Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats)**. Chicago and London: The University of Chicago Press, v.1, p.669, 2008.

GERMANO, P.M.L.; SILVA, E.V.; CORDEIRO, C.F.; PRETO, A.A. Vacina anti-rábica PV/BHK com avridine como adjuvante: avaliação da eficácia em camundongos, **Arquivo de Biologia Tecnológica**, v.33, p. 865-878, 1990.

GIER, H.T.; MARION, G.B. Development of the mammalian testis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. The testis. New York: **Academic Press**. v.1, p. 2-43, 1970.

GONZALEZ-RUIZ, N.; J. RAMÍREZ-PULIDO.; J. ARROYO-CABRALES. A new species of mastiff bat (Chiroptera: Molossidae: Molossus) from Mexico. **Mammalian Biology**, v.76, p. 461-461, 2011.

GOODMAN, S. M.; CARDIFF, S. G.. A new species of Chaerephon (Molossidae) from Madagascar with notes on other members of the family. **Acta Chiropterologica**, v.6, p.227–248, 2004.

GOODMAN, S. M.; JANSEN VAN VUUREN, B.; RATRIMOMANARIVO, F.; PROBST, J.-M.; BOWIE, R. C. K. Specific status of populations in the Mascarene Islands referred to *Momopterus acetabulosus* (Chiroptera: Molossidae), with description of a new species. **Journal of Mammalogy**, v. 89, p.1316–1327, 2008.

GREENHALL, A.M. & W.A. SCHUTT JR. *Diaemus youngi*. **Mammalian Species**, v.533, p.1-7, 1996.

GREGORIN, R. & V. A. TADDEI. New records of *Molossus* and *Promops* from Brazil (Chiroptera: Molossidae). **Mammalia**, v.64, p.471–476, 2000.

GREGORIN, R.; A. CIRRANELLO. Phylogeny of Molossidae Gervais (Mammalia: Chiroptera) inferred by morphological data. **Cladistics**, v.32, n.1, p. 2–35, 2016.

GREGORIN; TAVARES, In book: Morcegos do Brasil: Biologia, Ecologia e Conservação, Chapter: **Sistemática de Morcegos no Brasil: história e perspectivas**, Editors: Armazém Digital, 2008.

GRISWOLD M.D.; SKINNER M.K. *Sertoli Cell Biology*. Academic Press, San Diego, p.512, 2004.

HAUPT H.; REHAAG H., Raiva epizoótica nos rebanhos de Santa Catarina, transmitida por morcegos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**. v.2, p.17-47, 1921.

HERMO, L.; ROBAIRE, B. Epididymal cell types and their functions. In *The epididymis: from molecular to clinical practice. A comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens*. New York. Kluwer Academic Plenum Publishers; p. 81-102, 2002.

HERMO, L.; ROBAIRE, P.S. Developmental expression. Of the Yf subunit of glutathione S-transferase P in epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the rat, **The Anatomical Record**, v. 239, p.421-440, 1994.

HILL, J. E., and J. D. SMITH. **Bats: a natural history**. University of Texas Press, Austin, 1984.

HOLLAND, R. A.; WATERS, D. A.; RAYNER, J. M. Echolocation signal structure in the Megachiropteran bat *Rousettus aegyptiacus* Geoffroy 1810. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 25, p. 4361-4369, 2004.

HOOFER, S.R.; Van Den Bussche, R.A. Molecular phylogenetics of the chiropteran family Vespertilionidae. **Acta Chiropterologica**, v. 5(supplement): p,1-63, 2003.

HOOPMAN, H. F. 1970. Zoogeography of bats., in About bats: a chiropteran biology symposium (B. H. SLAUGHTER and D. W. WALTON, eds.). **Southern Methodist University Press**, Dallas, v.339, p.29-50, 1970.

HOOPMAN, H. F. 1993. Order Chiroptera., in Mammal species of the World, a taxonomic and geographic reference, second edition (D. E. WILSON and D. M. REEDER, eds.) Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 1207. p. 137–241, 1993.

HOOPMAN, H. F. A synopsis of the families of bats, part VII. **Bat Research News**, v. 25, p. 25–27, 1985.

HOOPMAN, H. F. Chiroptera: systematics. Hand-book of Zoology.: **Mamalia**. Walter de Gruyter, Berlin, v.8, p 224, 1994.

HOOPMAN, H. F.. Bats. Pp. 145–186, in Orders and families of Recent mammals of the World (S. ANDERSON and J. H. JONES, JR., eds.).**John Wiley and Sons**, New York, p.686, 1984.

HOOPMAN, H. F.; E. L. COCHRUM. 1967. Bats. Pp. 109–150, in Recent mammals of the world. Synopsis of families (S. ANDERSON and J. H. JONES, JR., eds.). The Ronald Press Company, New York, p. 453, 1967.

HUZJAHIN, A. P. 1950. Letucije myši. Sovetskaja nauka, Moskva, p.444, 1950.

ITO, F.; BERNARD, E.; TORRES, R.A. What is for dinner? First report of human blood in the diet of the hairy-legged vampire bat *Diphylla ecaudata*. **Acta Chiropterologica**, v.18, p. 509–515, 2016.

JONES, G.; TEELING, E. C. The evolution of echolocation in bats. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 21, n. 3, p. 149-156, 2006.

KALKO, ELISABETH K V, E AGUIRRE, L. F. Comportamiento de Ecolocación para la Identificación de Especies y Evaluación de la Estructura de Comunidades de Murciélagos Insectívoros en Bolivia. In L. Aguirre (Ed.), Historia Natural, Distribución y Conservación de los murciélagos de la Bolivia. Santa Cruz: **Ecologia Simón I. Patiño**, p. 41-52, 2006.

KRUTZSCH, P. H. Anatomy, physiology and cyclicity of the male reproductive tract. In: **Reproductive Biology of Bats**. (E. G. Crichton and P. H. Krutzsch, eds). San Diego: Academic Press. p. 91-155, 2000.

LIMA JUNIOR, N.B.; ARANDAS, M.J.G.; MARINHO, K.S.N.; AGUIAR JÚNIOR, F.C.A.; PONTES, A.R.M.; SANTOS, K.R.P. Histomorfometria testicular do morcego *Phyllostomus discolor* (Chiroptera: Phyllostomidae) em áreas de Mata Atlântica de Pernambuco, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 51, n. 3, p. 263-270, 2014.

LIMA, I. P. Espécies de morcegos (Mammalia: Chiroptera) registradas em parques nas áreas urbanas do Brasil e suas implicações no uso deste ambiente. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L. E.; SANTOS, G. A. S. D (Ed.). **Ecologia de Morcegos**. Londrina: Technical Books, p. 71-86, 2008.

LÓPEZ-GONZÁLEZ C. & PRESLEY S. J. Taxonomic status of *Molossus bondae* J. A. Allen, 1904 (Chiroptera: Molossidae), with description of a new subspecies. **Journal of Mammalogy**, v.82, n.3, p. 760–774, 2001.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, C.; PRESLEY, S.J.; OWEN, R.D.; WILLIG, M.R. Taxonomic status of *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae) in Paraguay. **Journal of Mammalogy**, v. 82, n. 1, p. 138-160, 2001.

MARCHESIN, S.R.C. **Divergência genética e relacionamento filogenético em espécies de morcegos das famílias Molossidae e Phyllostomidae baseado em análises de PCR-RFLP**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2006.

MARINHO-FILHO, J.S.; SAZIMA, I. Brazilian bats and conservation biology: a first survey. In: Kunz, T.; Racey, P.A. (Eds). **Bat Biology and Conservation**. Washington: Smithsonian Institution Press, p.282-294, 1998.

MARTORELLI, L.F.A.; AGUIAR, E.A.C.; ALMEIDA, M.F.; SILVA, M.M.S.; NOVAES, E.C.R. Isolamento do vírus rábico de morcego insetívoro *Myotis nigricans*. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n.2, p. 140-141, 1995.

MARTORELLI, L.F.A.; AGUIAR, E.A.C.; ALMEIDA, M.F.; SILVA, M.M.S.; NUNES, V.F.P. Isolamento do vírus rábico de morcego insetívoro, *Lasiurus borealis*. **Revista de Saúde Pública**, v.30, p.101-102, 1996.

MCGUCKIN, M.A; BLACKSHAW, A.W. Seasonal changes in testicular size, plasma testosterone concentration and body weight in captive flying-foxes, *Pteropus poliocephalus* and *P. scapulatus*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.92, p.339–346, 1991.

MEDELLIN, R. A; GAONA, O. Seed dispersal bats and birds in forests and disturbed habitats of Chiapas, Mexico. **Biotropica**,v. 31, p.478-485, 1999.

MILLER, G. S., JR. The families and genera of bats. Bulletin of the United States National Museum, 57: 1–282, 1907.

MORAIS DB, OLIVEIRA LC, CUPERTINO MC, FREITAS KM, FREITAS MBD, PAULA TAR AND MATTA SLP. Organization and Seasonal Quantification of the Intertubular Compartment in the Bat *Molossus molossus* (Pallas, 1776) Testis. **Microscopy res techniq** v.76, p.94-101, 2013a.

MORAIS, D. B.; BARROS, M. S.; FREITAS, M.B.D.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S. L. P. Histomorphometric characterization of the intertubular compartment in the testes of the bat *Sturnira lilium*. **Animal Reproduction Science**, 2014a.

MORAIS, D. B.; BARROS, M. S.; PAULA, T. A. R.; FREITAS, M. B. D.; GOMES, M. L. M.; MATTA, S. L. P. Evaluation of the Cell Population of the Seminiferous Epithelium and Spermatocytic Indexes of the Bat *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae). **PLOS ONE**, v. 9, n.7, p. 1-9. 2014b.

MORAIS, D. B.; CUPERTINO, M. C.; GOULART, L. S.; FREITAS, K. M.; FREITAS, M. B. D.; PAULA, T. A.R.; MATTA, S. L. P. Histomorphometric evaluation of the *Molossus molossus* (Chiroptera, Molossidae) testis: The tubular compartment and indices of sperm production. **Animal Reproduction Science**, p. 01-11, 2013c.

MORAIS, D. B.; OLIVEIRA, L. C.; CUPERTINO, M. C.; FREITAS, K. M.; FREITAS, M. B. D.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P. Organization and Seasonal

Quantification of the Intertubular Compartment in the Bat *Molossus molossus* (Pallas, 1776) Testis. **Microscopy research and technique**, v. 76, p.94–101, 2013a.

MORAIS, D. B.; PAULA, T. A. R.; BARROS, M. S.; BALARINI, M. K.; FREITAS, M. B. D.; MATTA, S. L. P. Stages and duration of the seminiferous epithelium cycle in the bat *Sturnira lilium*. **Journal of Anatomy**, v.222, p. 372 - 379, 2013b.

MORAIS, D.B.; PUGA, L.C.H.P.; PAULA, T.A.R.; FREITAS, M.B.D.; MATTA, S.L.P. The spermatogenic process of the common vampire bat *Desmodus rotundus* under a histomorphometric view. **PLoS One**, v.12, p.1-18, 2017.

MORATELLI R, WILSON D. Distribution and natural history of *Myotis lavalii* (Chiroptera, Vespertilionidae), **Journal of Mammalogy**, v.94, n.3, p.650-656, 2013.

MORATELLI, R.; A. L. PERACCHI.; DIAS, D.; OLIVEIRA, J. A. Geographic variation in South American populations of *Myotis nigricans* (Schinz, 1821) (Chiroptera, Vespertilionidae), with the description of two new species. **Mammalian Biology**, n.76, p. 592–607, 2011.

MOUTINHO, F. F. B.; BORGES, F.V.B.; FERNANDES, P.M.; NUNES, V.M.A.; ROCHA, M. R. D.; SANTOS, C.S.; NETO, F.F. Raiva em morcego não hematófago em área urbana do Município de Niterói-RJ, **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 99-102, 2015.

NOGUEIRA, M.R.; TAVARES, V.C.; PERACCHI, A.L. New records of *Uroderma magnirostrum* Davis (Mammalia, Chiroptera) from southeastern Brazil, with comments on its natural history. **Revista Brasileira de Zoologia** v.20, p. 691-697, 2003.

NOTINI, A. A.; FARIAS, T. O.; TALAMONI, S. A.; GODINHO, H. P. Annual male reproductive activity and stages of the seminiferous epithelium cycle of the large fruit-eating *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Zoologia**, v.32, n.3, p.195-200, 2015.

NOWAH, R. M. Walker's mammals of the World. Sixth edition, Vol. 1, The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, p.836. 1999.

NOWAK, R.M. 1994. *Walker's Bats of the World*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA.

ORTÊNCIO FILHO, H; REIS, N.R; PINTO, D; VIEIRA, D.C. Aspectos reprodutivos de *Artibeus lituratus* (Phyllostomidae) em fragmentos florestais na região de Porto Rico, Paraná, Brasil. **Chiroptera Neotropical**, v.13, n.2, p.313-318, 2007.

PACHECO, S.M.; M. SODRÉ, A.R.; GAMA, A.; BREDT, E.M.; CAVALLINI SANCHES, R.V.; MARQUES, M.M. GUIMARÃES.; G. BIANCONI. Morcegos urbanos: status do conhecimento e plano de ação para a conservação no Brasil, **Chiroptera Neotropical**, v.16, n.1, p.630-647, 2010.

PAGLIA, A.P.; FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L.M.S.; CHIARELLO, A.G.; LEITE, Y.L.R.; COSTA, L.P.; SICILIANO. S.; KIERULFF, M.C.M.; MENDES, S.L.; TAVARES, V.C.; MITTERMEIER, R.A.; PATTON, J.L. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. **Occasional Papers in Conservation Biology**, Conservation International, Arlington, VA, n.6, 2ª ed, p. 76, 2012.

PALLAS, P. S. Miscellanea zoologica quibus novae imprimis atque obscurae animalium species describuntur et observationibus iconibusque illustrantur. **Hague Comitum**, p.12-224, 1766.

PASSOS, E.C.; CARRIERI, M.L.; SILVA, M.M.S.; PEREIRA, R.G. JR.; MELO, J.A.T.S.; MAULE, L.J. Vírus rábico isolado de morcego frugívoro (*Artibeus lituratus*) capturado em 1997 no município de Rio Claro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, n.1, p. 40-42, 1999.

PASSOS, J.G.; PASSAMANI, M. *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae): biologia e dispersão de sementes no Parque do Museu de biologia Prof. Mello Leitão, Santa Teresa (ES). **Natureza online.**, v. 1, n.1, p. 1-6, 2003.

PERACCHI, A.L.; LIMA, I.P.; REIS, N.R.; NOGUEIRA, M.R.; ORTÊNCIO-FILHO, H. Ordem Chiroptera. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. (Eds). **Mamíferos do Brasil**. Londrina, p. 153-230, 2006.

PIERSON, E. D. 1986. Molecular systematics of the Microchiroptera: higher taxon relationships and biogeography. Ph.D. Thesis, University of California, Berkeley, p.262, 1986.

POCCIA, D. Molecules of the somatic cells. Em: **Molecular biology intelligence unit, molecular aspects of spermatogenesis**. p.75-90, 1994.

REARDON, T. B.; ADAMS, M.; MCKENZIE, N.; JENKINS, P. A new species of Australian free tail bat *Mormopterus eleryi* sp. Nov (Chiroptera: Molossidae) and a taxonomic reappraisal of *M. norfolkensis* (Gray). **Zootaxa**, v.1875, p.1–31, 2008.

REIS, N. R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P (Eds). **Mamíferos do Brasil**. 2. ed., Londrina, p.439, 2011.

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

RIGO, L. HONER, M. R. Análise da profilaxia da raiva humana em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, em 2002, **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1939-1945, 2005.

ROSEVEAR, D. R. 1965. The bats of West Africa. Trustees of the British Museum (Natural History), London, p.418, 1965.

RUEDI, M.; MAYER, F. Molecular systematics of bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) suggests deterministic ecomorphological convergences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, New York, v. 21, p. 436- 448, 2001.

RUSSELL LD, ETTLIN RA, SINHA HIKIM AP AND CLEGG ED. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL LD, ETTLIN RA, SINHA HIKIM AP, CLEGG ED (Eds). **Histological and histopathological evaluation of the testis Cache River Press**, Clearwater, Florida, p. 1-40. 1990.

RUSSELL, L.D; ETTLIN, R.A; SINHA HIKIM, A.P; CLEGG, E.D. Mammalian spermatogenesis. Em: **Histological and histopathological evaluation of the testis**, p. 1-40, 1990.

SCANLON, V.C; SANDERS, T. **Essentials of anatomy and physiology**. 5ª edição, 2007.

SCAVRONI, J.; PALEARI, L.M.; UIEDA, W. Morcegos: realidade e fantasia na concepção de crianças de área rural e urbana de Botucatu, SP. **Simbio-Logias**, Botucatu, v. 1, n. 2, p. 118, 2008.

SCHNEIDER, M.C.; ALMEIDA, G.A.; SOUZA, L.M. Controle da raiva no Brasil de 1980 a 1990. **Revista de Saúde Pública**, v.30, p.193-203, 1996.

SERRE, V.; B. ROBAIRE. Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis, **Biology of Reproduction**, v.58, p. 497-513, 1998.

SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. Em: **Reproduction in Domestic Animals**. p. 221-250, 1991.

SHARIFI, M.; AKMALI, V.; ROSTAM GHORBANI, R. Evidence of sperm storage in *Myotis capaccinii* (Chiroptera: Vespertilionidae) in western Iran, **Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 2, p. 47–61, 2008.

SILVA, L. A. M.; SILVA, R.R.; SILVA, E.M.V.G.; GOMES, E.S.; FILHO, J.T.A.; MACHADO, J.L.M. Primeiro relato de raiva em *Myotis nigricans* no Nordeste do Brasil, **Chiroptera Neotropical**, v.17, n.1, p. 193-196, 2011.

SILVA, L.A.M.; MACHADO, J.L.M.; MELO, M.L.; ALENCAR, V.I.B.; MELO, R.S.; ANDRADE, L.P.; SILVA, M.V.G. Rabies virus in *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae) in the State of Pernambuco, Northeastern Brazil, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p. 526-527, 2011.

SIMMONS, N. B. A reappraisal of interfamilial relationships of bats. 3–26 in *Bat biology and conservation* (T. H. Kunz and P. A. Racey, eds.). Smithsonian Institution Press, Washington, p.3-26, 1998.

SIMMONS, N. B. Ordem Chiroptera. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. 3° ed. Baltimore: **Johns Hopkins University Press**, v.1, p. 312-529, 2005.

SIMMONS, N. B.; J. H. GEISLER. Phylogenetic relationships of Icaronycteris, Archaeonycteris, Hassianycteris, and Palaeochiropteryx to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocation and foraging strategies in Microchiroptera. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v.235, p. 1-182, 1998.

SIMMONS, N.B. Order Chiroptera, in: D.E. WILSON.; D.M. REEDER (eds.). *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, v. 1, p. 312–529, 2005.

SIMMONS, N.B.; R.S. VOSS. The mammals of Paracou, French Guiana: a Neotropical lowland rainforest fauna-Part 1: Bats. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v.237, p.1-219. 1998.

SIMPSON, G. G. 1945. The principles of classification and a classification of mammals. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v.85, p.1–350.

SODRÉ, M. M.; GAMA, A. R.; ALMEIDA, M. F. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 75-81, 2010.

SOUZA, L.C.; LANGONI H.; SILVA, R.C.; LUCHEIS. S. Vigilância epidemiológica da raiva na região de Botucatu-SP: importância dos quirópteros na manutenção do vírus na natureza. **Ars Veterinaria**, v. 21, n.1, p. 62-68, 2005.

SUDMAN, P.D.; L. J. BARHLEY.; M. S. HAFNER. Familial affinity of *Tomopeas ravus* (Chiroptera) based on protein electrophoretic and cytochrome b sequence data. **Journal of Mammalogy**, v.75, p.365–377, 1994.

SULLIVAN, R.; SAEZ, F. 2013. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in the mammalian male reproductive physiology. **Reproduction**, v.146, p. 21-35, 2013.

TATE, G. H. H. Results of the Archbold expeditions. No. 47. Review of the vespertilionine bats, with special attention to genera and species of the Archbold collections. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v.80, p.221–297, 1942.

TATE, G. H. H. Results of the Archbold expeditions. No. 39. A review of the genus *Myotis* (Chiroptera) of Eurasia, with special reference to species occurring in the East Indies. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v.78, p.537–565, 1941a.

TATE, G. H. H. Results of the Archbold expeditions. No. 40. Notes on vespertilionid bats of the subfamilies *Miniopterinae*, *Murinae*, *Hesperulininae*, and *Nyctophylinae*. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v.80, p.567-597, 1941.

TEELING, E. C.; MADSEN, O.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; DE JONG, W. W.; STANHOPE, M. J.; SPRINGER, M. S. Microbat paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in Old World rhinolophoid bats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 1431-1436, 2002.

TEELING, E. C.; SPRINGER, M. S.; MADSEN, O.; BATES, P.; O'BRIEN, S. J.; MURPHY, W. J. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. **Science**, v. 307, p. 580-584, 2005.
TEELING, E.C. Chiroptera. In: HEDGES, S.B.; KUMAR, S. (Editors). *The Time Tree of life*, **Oxford University Press**, p.499 -503. 2009.

TIMM, R. M.; GENOWAYS, H. H. The Florida bonneted bat, *Eumops floridanus* (Chiroptera: Molossidae): distribution, morphometrics, systematics, and ecology. **Journal of Mammalogy**, v.85, p.852–865, 2004.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (eds.). *Laboratory techniques in rabies*. Geneva, World Health Organization, p. 28-51, 1996.

UIEDA, W.; HARMANI, N. M.; SILVA, M. M. Rabies in insectivorous (Molossidae) bats of southeastern Brazil. **Revista da Saúde Pública**, v. 29, n. 5, p. 393-397, 1995.

VAN DEN BUSSCHE, R. A.; HOOFFER, S. R. Phylogenetic relationships among recent chiropteran families and the importance of choosing appropriate out-group taxa. **Journal of Mammalogy**, v. 85, n. 2, p. 321-330, 2004.

VOLLETH, M.; H.-G. HELLER. Phylogenetic relationships of vespertilionid genera (Mammalia: Chiroptera) as revealed by karyological analysis. **Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung**, v. 32: 11–34, 1994.

WILLIG, M.R. Reproductive patterns of bats from Caatingas and Cerrado biomes in northeastern Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 66, p. 668-681, 1985.

ZORTÉA, M. Reproductive patterns and feeding habits of three nectarivorous bats (Phyllostomidae: Glossophaginae) from the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, n.1, p.159-168, 2003.

CAPÍTULO II

Estágios reprodutivos, níveis plasmáticos de testosterona e histomorfometria dos testículos e epidídimos de *Myotis lavalii* (Chiroptera: Vespertilionidae) em um fragmento de Mata Atlântica, Nordeste do Brasil

Maria Juliana Gomes Arandas¹, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹, Valeria Wanderley Teixeira¹, Nivaldo Bernardo de Lima Junior¹, Fabricya Roberta da Silva¹, Camila Priscila Oliveira da Cruz Melo¹, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior² e Katharine Raquel Pereira dos Santos²

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia, R. Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil. CEP: 52171-900.

²Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Núcleo de Biologia, R. Alto do Reservatório S/N Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil. CEP: 55.608-680.

Autor para correspondência: Maria Juliana Gomes Arandas

UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 1738 Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil. CEP 52171-900.

E-mail: julianaarandas@hotmail.com

RESUMO

Morcegos da família Vespertilionidae apresentam variadas estratégias reprodutivas influenciadas pelas condições ambientais, tais como: armazenamento de espermatozoides por longos períodos na cauda do epidídimo, regressão dos túbulos seminíferos e atividade espermática durante todo o ano. *Myotis lavalii*, apresenta pouca informação sobre a sua biologia reprodutiva por se tratar de uma espécie recentemente descrita. Assim, avaliaram-se parâmetros histomorfométricos testiculares e epididimários, além dos níveis de testosterona desta espécie. Foram utilizados 34 machos adultos, sendo (n=22) em meses secos e (n=12) em meses chuvosos. Após anestesia, amostras de sangue foram coletadas para a dosagem de testosterona. Posteriormente, os testículos e epidídimos foram removidos, fixados em formal 10% tamponado e submetidos a técnica histológica de rotina. Nos testículos foram analisados: a área tubular, área intertubular, quantificação dos espermátócitos, espermátides (arredondadas e alongadas), células de Sertoli e células de Leydig. No epidídimo: as áreas tubular, luminal e epitelial da cabeça, corpo e cauda. *M. lavalii* apresentou aumento nas áreas tubular e intertubular, no número espermátides alongadas, células de Sertoli, células de Leydig e nos níveis plasmáticos de testosterona, bem como na área tubular, luminal e epitelial da cabeça e cauda do epidídimo, durante a estação chuvosa em comparação a estação seca. Embora *M. lavalii* tenha apresentado ciclo espermatogênico contínuo durante todo ano, nossos achados indicam que há um investimento reprodutivo maior na espermiogênese em meses chuvosos.

Palavras-chave: Andrógenos. Epidídimo. Fatores climáticos. Morcego. Testículo.

ABSTRACT

Vespertilionid bats exhibit several reproductive strategies influenced by environmental conditions, such as: storage of spermatozoa for long periods in the tail of the epididymis, regression of the seminiferous tubules and sperm activity throughout the year. Information on the reproductive biology of *Myotis lavalis* rare due to it is a recently described species. Thus, testicular and epididymal histomorphometric parameters were evaluated, as well as testosterone levels of this species. 34 adult males were studied, being (n = 22) in dry months and (n = 12) in rainy months. After anesthesia, blood samples were collected to testosterone dosage. Subsequently, the testicles and epididymides were fixed in 10% buffered formalin, and submitted to the routine histological techniques. In the testicles were evaluated the tubular and intertubular areas, quantification of spermatocytes, rounded and elongated spermatids, Sertoli cells and Leydig cells. On the other hand, in the epididymides the tubular, luminal and epithelial areas of the head, body and tail were measured. *M. lavalis* showed increased tubular and intertubular areas, number of elongated spermatids, Sertoli cells, Leydig cells and plasma testosterone levels, as well as tubular, luminal and epithelial area of the head and tail of the epididymis during the rainy season compared to the dry months. Although *M. lavalis* has shown continuous spermatogenic cycle throughout the year, our findings indicate that there is a greater reproductive investment in spermiogenesis during rainy months.

Keywords: Androgens. Bat. Climatic factors. Epididymis. Testicle.

1. Introdução

A família Vespertilionidae apresenta ampla diversidade de espécies e distribuição geográfica, atrelado a isso, evoluíram uma variedade de estratégias reprodutivas, principalmente no que se relaciona a morfofisiologia dos órgãos sexuais (SIMMONS, 2005; SHARIFI et al., 2008). Os ciclos reprodutivos dos morcegos insetívoros estão associados às condições ambientais, disponibilidade de recursos alimentares e as flutuações sazonais (RACEY, 1982; ARAÚJO et al., 2013). Diante das variedades desses fatores, os machos desenvolveram estratégias reprodutivas específicas, como o armazenamento de espermatozoides por longos períodos na cauda do epidídimo, regressão dos túbulos seminíferos e atividade espermática durante todo o ano (SHARIFI et al., 2008; ARAÚJO et al., 2013; FARIAS et al., 2014; BEGUELINI et al., 2015). Todavia, essas estratégias podem variar, uma vez que uma mesma espécie pode apresentar os mais variados padrões reprodutivos, dependendo da região de ocorrência e época do ano (WILSON, 1979; CRICHTON; KRUTZSCH, 2000; NEUWEILER, 2000).

O gênero *Myotis* (Vespertilionidae, Myotinae) apresenta distribuição mundial, e um grande número de espécies, que variam de pequeno a grande porte (MORATELLI et al., 2011). As espécies desse gênero são de grande interesse para os estudos relacionados à reprodução, principalmente por ocorrer em diversos habitats (FARIAS et al., 2014). Dentro dessa perspectiva, *Myotis lavalii* (MORATELLI et al., 2011) é uma espécie com hábito alimentar insetívoro, e recentemente descrita a partir do complexo de *M. nigricans*, com registros para a Caatinga de Pernambuco e Ceará (MORATELLI; WILSON, 2013), assim como na Mata Atlântica de Pernambuco (MORATELLI; WILSON, 2013; BARBIER et al., 2017), e no que se diz respeito a biologia

reprodutiva, os dados permanecem limitados ou inexistentes, principalmente por ser tratar de uma espécie recém identificada. No Nordeste Brasileiro, a reprodução segue um padrão contínuo, entretanto as pequenas amostras de espécimes em determinados meses impediram delinear com confiança o padrão reprodutivo anual (WILLIG, 1985; MORATELLI; WILSON, 2013).

Neste sentido, as inferências mais precisas sobre o padrão de atividade sexual em machos abordam parâmetros morfométricos do testículo e epidídimo, assim como os níveis de testosterona, por meio dos quais é possível determinar com exatidão a capacidade reprodutiva dos quirópteros (BEGUELINI et al., 2010; BEGUELINI et al., 2011; BEGUELINI et al., 2013b; LIMA JUNIOR et al., 2014). Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade reprodutiva de machos da espécie *M. lavalii* durante o ciclo anual por meio de parâmetros histomorfométricos testiculares e epididimários, bem como os níveis plasmáticos de testosterona.

2. Material e Métodos

2.1. Área de Estudo

O estudo foi conduzido em um fragmento de Mata Atlântica (08° 44'13" e 08°43'09" - Latitude Sul, 35°10'11" e 35°11'02" - Longitude Oeste), no Município de Tamandaré e Rio Formoso, Pernambuco.

2.2. Coleta de dados

As coletas dos espécimes foram devidamente autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, nº 26531-3 e aprovada no Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da UFPE, nº 23076.037360/2014-92. Para a coleta dos espécimes, utilizou-se 10 redes de neblina (12m x 3m) no período de janeiro a dezembro do ano de 2015 (com exceção dos meses de junho e julho onde não

houve captura) durante dois dias consecutivos de cada mês, das 17:00 h às 00:00 h. Os animais foram capturados, e posteriormente identificados com base nas características descritas para *M. lavalis* (MORATELLI; WILSON, 2013).

2.3. Dados meteorológicos e períodos sazonais

Os períodos climáticos foram agrupados com base nas informações meteorológicas de precipitação pluviométricas fornecidas pela Seção de Observação e Meteorologia aplicada. Assim, estabeleceram-se dois agrupamentos, meses secos (janeiro, fevereiro, setembro, outubro, novembro e dezembro) e meses chuvosos (março, abril, maio e agosto) do ano de 2015 (Tabela 1).

2.4. Estágios reprodutivos

Os estágios reprodutivos foram classificados a partir das características da morfologia externa das gônadas: 1) machos descendentes (testículos localizados no escroto) e 2) machos não descendentes (testículos localizados na região abdominal) (GANNON; WILLIG 1992).

2.5. Eutanásia dos animais

Foram selecionados aleatoriamente 34 machos adultos, sendo (n=22) em meses secos e (n=12) em meses chuvosos. Os espécimes foram anestesiados na região intraperitoneal com o fármaco pentobarbital sódico em uma concentração de 40mg kg⁻¹, em seguida realizada punção cardíaca (MORAIS et al., 2013a).

2.6. Dosagem hormonal

As amostras de sangue de cada animal foram coletadas através de punção cardíaca via ventrículo esquerdo, e enviadas para análises dos níveis plasmáticos de testosterona

(NPT) em pg/mL pelo método de quimioluminescência em um laboratório comercial de análises clínicas.

2.7. Análises histológicas

Os testículos e epidídimos foram removidos mediante a uma incisão da pele e fâscias da região abdominal direcionando-se à região inguinal. Após remoção, os tecidos foram fixados em formalina a 10% neutra tamponada (NBF), processados seguindo as técnicas histológicas de rotina, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina. Os blocos obtidos foram cortados no micrótomo em espessura de 4 µm. As lâminas histológicas obtidas foram coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) e analisadas em microscopia óptica.

2.8. Análises histomorfométricas

As lâminas histológicas dos testículos e epidídimos foram fotografadas no programa *Motic Images Plus 2.0*. Para tanto, foi acoplada a câmara ao microscópio óptico, projetando a lâmina no aumento estabelecido, obtendo assim, 10 fotomicrografias por animal. Para as devidas mensurações histomorfométricas, utilizou-se o software *ImageJ* versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

No testículo, foram mensuradas em porcentagens a área tubular (AT) e a área intertubular (AI) em aumento total de 100x. No compartimento tubular, foram quantificadas em 10 túbulos seminíferos diferentes de cada animal, as células de Sertoli (CS) e da linhagem espermatogênica, os espermatócitos (Es), espermátides arredondadas (Ear), espermátides alongadas (Eal), bem como no compartimento intertubular, as células de Leydig (CL) no aumento total de 400x.

No epidídimo, foram mensuradas em micrômetros quadrado (μm^2) a área tubular (AT), a área do lúmen (AL) e a área do epitélio (AE) das três regiões desse órgão (cabeça, corpo e cauda) no aumento total de 100x.

2.9. Análises estatísticas

Os dados histomorfométricos foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, e não foi encontrada distribuição normal. Assim, foram utilizados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$). O teste de correlação de Spearman foi utilizado para testar a correlação entre a testosterona e os parâmetros histomorfométricos testiculares ($p < 0,05$). no programa computacional GraphPad Prism[®]

3. Resultados

No período estudado foram coletados 34 machos adultos, ($n=22$) para os meses secos, destes, 77,27% ($n=17$) apresentavam testículos não descendentes e 22,73% ($n=5$) com testículos descendentes. Entretanto, em meses chuvosos evidenciaram-se 12 machos, 83,33% ($n=10$) com testículos descendentes e 16,67% ($n=2$) com testículos não descendentes.

As análises histológicas dos testículos indicaram que os machos de *M. lavalis* com testículos descendentes e não descendentes em ambos os períodos apresentaram o compartimento tubular constituído por diferentes tipos celulares: espermatogônias, espermatócitos, espermátides arredondadas, espermátides alongadas e células de Sertoli. No epitélio seminífero, as espermatogônias localizam-se no compartimento basal, os espermatócitos e as espermátides arredondadas no compartimento adluminal e as espermátides alongadas em fases finais estão intrinsecamente relacionadas ao lúmen

tubular. O compartimento intertubular é constituído por células de Leydig, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (Fig. 1A-B).

No epidídimo, foi possível observar um epitélio de revestimento do tipo pseudo-estratificado colunar com estereocílios, e constituído por células principais, basais e apicais. Foram identificadas ainda, três regiões distintas: cabeça, corpo e cauda, sendo a concentração maior de espermatozóides nas duas últimas regiões (Figura 2A-F).

A histomorfometria testicular indicou diferenças significativas entre os meses secos e chuvosos para as variáveis correspondentes a AT, AI, números de Eal, CS e CL (Figura 3A-G), sendo as maiores médias observadas durante os meses de alta precipitação (Tabela 2).

Com relação aos níveis de testosterona, os animais exibiram um aumento nos dois primeiros meses da estação seca do ano (janeiro e fevereiro) que continuou nos meses subsequentes na estação chuvosa (março, abril e maio), com exceção do mês de agosto onde houve uma queda significativa desse hormônio que persistiu pelos meses restantes da estação seca (setembro, outubro, novembro e dezembro). As maiores concentrações foram observadas em março e maio (Figura 3H). Na Tabela 3 observa-se que todas as correlações foram positivas entre as variáveis testiculares e a testosterona para todos os animais desse estudo, entretanto Ear, Eal e CL apresentaram alta correlação.

No epidídimo, a histomorfometria demonstrou variações sazonais entre os parâmetros analisados. Nota-se que área tubular, luminal e epitelial da cabeça e cauda apresentaram maiores médias para os meses chuvosos (Fig. 4A-C). No corpo não houve diferenças significativas para nenhum parâmetro analisado (Tabela 4).

4. Discussão

Histologicamente, os testículos e epidídimos do morcego *M. lavalis*, apresentaram-se similares aos descritos para outras espécies de morcegos (MORAIS et al., 2013a). A presença das células espermatogênicas em diferentes fases de maturação encontradas nos túbulos seminíferos, bem como espermatozóides no epidídimo de machos com testículos descendentes e não descendentes encontram-se férteis ao longo de todo ano. Em contraste a esses dados, outras espécies de morcegos vespertilionídeos têm demonstrado um padrão diferente ao encontrado nesse estudo, No Brasil, Araújo et al. (2013) verificaram que *M. levis* em áreas de transição entre os domínios de Mata Atlântica e Cerrado no Estado de Minas Gerais apresentou um período de repouso durante o ciclo espermatogênico anual, visto que não foi observada a espermatogênese e presença de espermatozóides no lúmen do epidídimo. Beguelini et al., (2013) observaram em áreas de Cerrado do Estado de São Paulo que *M. nigricans* apresenta dois períodos de regressão testicular total, e somente as células de Sertoli e as espermatogônias foram evidenciadas. A atividade espermatogênica em machos com testículos descendentes e não descendentes indica que cada espécie apresenta particularidades, visto que Lima Junior et al.(2014) constatou que *Phyllostomus discolor* em áreas de Mata Atlântica do Estado de Pernambuco encontravam-se aptos para a reprodução independente da posição testicular, ao passo que Duarte e Talamoni (2010) verificaram para *Artibeus lituratus* em uma área de floresta Atlântica de Minas Gerais que os machos apresentavam dois modelos reprodutivos, testículos grande com todas as células da espermatogênese e testículos pequenos com espermatogônias e alguns espermátócitos. Essas divergências observadas fortalecem as evidências de que os eventos reprodutivos podem ser variados de acordo com a área de ocorrência, dentro da mesma família, gênero e espécie (WILSON, 1979; ZORTÉA, 2003), principalmente entre os morcegos do gênero *Myotis* que representa um dos exemplos mais excepcionais

de radiação adaptativa entre mamíferos (STADELMANN et al., 2007; ARAÚJO et al., 2013).

Morais et al. (2013) mencionam que o maior investimento esteroidogênico ocorre em períodos que antecedem a reprodução, visto que há necessidade de uma preparação fisiológica para o período de acasalamento. Assim como nos demais mamíferos, as células de Leydig são a principal fonte de testosterona, de tal modo que as alterações no número, tamanho e ultraestrutura são indicadores confiáveis da atividade esteroidogênica, entretanto existem exceções, como as espécies *Taphozous georgianus* e *Molossus fortis* que as modificações na ultraestrutura das células de Leydig não refletem nos níveis plasmáticos de testosterona (MARTIN; BERNARD, 2000). Na espécie desse estudo, o aumento do número das células de Leydig coincide com os picos de níveis plasmáticos de testosterona, o que reflete na importância das avaliações morfométricas dessas células para inferir na atividade hormonal. Esse padrão de maior concentração de testosterona em meses chuvosos possivelmente relaciona-se a um suporte aos estágios envolvidos na espermiogênese, o que coincide com a correlação forte e positiva entre a testosterona e as espermatídes arredondadas e espermatídes alongadas, enfatizando a importância da influência hormonal na manutenção da atividade espermática, assim como a atividade das células de Sertoli, que são responsáveis pela formação da barreira hemato-testicular, visto que as junções de oclusão proporcionam o máximo de proteção aos espermatozóides em desenvolvimento (CRICHTON, 2000; GRISWOLD; SKINNER, 2004). Associado a isso, os padrões reprodutivos de morcegos insetívoros estão estreitamente relacionados com as chuvas, visto os picos de disponibilidade insetos coincidem com o período de alta precipitação (RACEY; ENTWISTLE, 2000). Um fator interessante a ser observado em *M. lavalis* é

que os testículos permaneceram com atividade espermatogênica, sem nenhum indício de regressão testicular, mesmo com baixos níveis de testosterona.

No epidídimo, as maiores médias dos parâmetros para a cabeça e cauda, atreladas ao aumento dos níveis plasmáticos de testosterona, indicam um maior investimento no armazenamento de espermatozoide. Essa ampliação das áreas tubular, luminal pode ser justificada pela necessidade de comportar uma maior quantidade de espermatozoide durante o armazenamento, e uma maior atividade epitelial na região da cauda. O epidídimo é um órgão responsável pela motilidade, maturação, capacidade de fertilização dos espermatozoides. Em morcegos, a capacidade de armazenar espermatozoides na cauda do epidídimo é reconhecida para algumas espécies (BEGUELINI et al., 2013a; ARAÚJO et al., 2013; FARIAS et al., 2014). Essas estratégias reprodutivas permitem que os machos sincronizem a atividade espermática com o período de ovulação das fêmeas para que a fertilização e toda a gestação ocorram em uma temporada com adequadas condições ambiental e de disponibilidade alimentar (ZORTÉA, 2003; BEGUELINI et al., 2013a), o que enfatiza um possível armazenamento de esperma na cauda do epidídimo na reprodução de *M. lavalii* em áreas de Mata Atlântica do Nordeste do Brasil.

Conclusão

Embora *M. lavalii* tenha apresentado ciclo espermatogênico contínuo durante todo ano, nossos achados indicam que há um investimento reprodutivo maior na espermatogênese, capacidade de suporte das células de Sertoli, níveis de testosterona e armazenamento de espermatozoides em meses chuvosos.

Referências

- ARAÚJO, R.A.; AMARO, B.D.; TALAMONI, S.A.; GODINHO, H.G. Seasonal reproduction of Yellowish Myotis, *Myotis levis* (Chiroptera: Vespertilionidae), from a Neotropical Highland, **Journal of Morphology**, v. 274, p. 1230-1238, 2013.
- BARBIER, E.; SOUZA, A.Q.S.; PEREIRA, J.P.; SANTOS, J.O.F.; TELINO JÚNIOR, W.R. New Record, New Host, and Geographic Distribution of *Basilisa hughscotti* Guimarães, 1946 (Diptera: Nycteribiidae), **Entomological News**, v. 126, n. 5, p. 394-399, 2017.
- BEGUELINI, M.R.; GOES, R.M.; RAHAL, P.; MORIELLE-VERSUTE, E., TABOGA, S.R. Impact of the processes of total testicular regression and recrudescence on the epididymal physiology of the bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). **PLOS One**, p.1-18, 2015.
- BEGUELINI, M.R.; MOREIRA, P.R.L.; FARIA, K.C.; MARCHESIN, S.R.C.; MORIELLE-VERSUTE, E. Morphological characterization of the testicular cells and seminiferous epithelium cycle in six species of neotropical bats. **Journal of Morphology**, v. 270, p.943–953, 2009.
- BEGUELINI, M.R.; PUGA, C.C.I.; MARTINS, F.F.; BETOLI, A.H.S.; TABOGA, S.R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Morphological variation of primary reproductive structures in males of five families of neotropical bats. **The Anatomical Record**, v. 296, p. 156–167, 2013a.
- BEGUELINI, M.R.; PUGA, C.C.I.; TABOGA, S.R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Annual reproductive cycle of males of the flat-faced fruit-eating bat, *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). **General and Comparative Endocrinology**, v.185, p.80–89, 2013b.
- BEGUELINI, M.R.; PUGA, C.C.I.; TABOGA, S.R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Ultrastructure of spermatogenesis in the white-lined broad-nosed bat, *Platyrrhinus lineatus* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Micron**, v.42, p.586–599, 2011c.
- BEGUELINI, M.R.; SERGIO, B.F.S.; LEME, F.L.J.; TABOGA, S.R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Morphological and morphometric characteristics of the epididymis in the Neotropical bats *Eumops glaucinus* and *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). **Chiroptera Neotropical**, v. 16, n. 2, p. 769-779, 2010.
- CRICHTON, E. G. Sperm storage and fertilization. In CRICHTON, E.G. and KRUTZSCH, P.H. **Reproductive biology of bats**. Boston: Academic Press. p. 295-320, 2000.
- CRICHTON, E.G.; KRUTZSCH, P.H. **Reproductive Biology of Bats**. Academic Press, p.510, 2000.

FARIAS, T.O.; NOTINI, A.A.; TALAMONI, S. A.; GODINHO, H.P. Testis morphometry and stages of the seminiferous epithelium cycle in an epididymal sperm-storing neotropical vespertilionid, *Myotis levis* (Chiroptera). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.44, n. 5, p. 361–369, 2014.

FENTON, M. B.; ACHARYA, L.; AUDET, D.; HICKEY, M. B. C.; MERRIMAN, C.; OBRIST, M. K.; SYME, D. M. Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the neotropics. **Biotropica**, v.24, n.3, p.440 - 446, 1992.

GANNON M.R; WILLIG M.R. Bat reproduction in the Luquillo Experimental Forest of Puerto Rico. **The Southwestern Naturalist**, v.37 n.4, p. 414-419, 1992.

GARDNER A.L. Order Chiroptera. In: GARDNER AL (eds) Mammals of South America (Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats). Chicago and London: **The University of Chicago Press**, v.1, 669 p., 2008.

GRISWOLD M.D.; SKINNER M.K. *Sertoli Cell Biology*. **Academic Press**, San Diego, 512p. 2004.

KUNZ, T.H.; PIERSON, E.D. 1994. Bats of the World: an introduction. In: R.W. NOWAK (Eds). **Walker's bats of the World**. Baltimore, The Johns Hopkins University Press. p. 1-46, 1994.

LIMA JUNIOR, N.B.; ARANDAS, M.J.G.; MARINHO, K.S.N.; AGUIAR JÚNIOR, F.C.A.; PONTES, A.R.M.; SANTOS, K.R.P. Histomorfometria testicular do morcego *Phyllostomus discolor* (Chiroptera: Phyllostomidae) em áreas de Mata Atlântica de Pernambuco, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 51, n. 3, p. 263-270, 2014.

MARTIN, L; BERNARD, R.T.F. Endocrine regulation of reproduction in bats: the role of circulating gonadal hormones. In CRICHTON, EG. and KRUTZSCH, FP. **Reproductive biology of bats**. Boston: Academic Press. p. 27-64, 2000.

MORAIS, D. B.; CUPERTINO, M. C.; GOULART, L. S.; FREITAS, K. M.; FREITAS, M. B. D.; PAULA, T. A.R.; MATTA, S. L. P. Histomorphometric evaluation of the *Molossus molossus* (Chiroptera, Molossidae) testis: The tubular compartment and indices of sperm production. **Animal Reproduction Science**, p. 01-11, 2013b.

MORAIS, D.B.; OLIVEIRA, L.C.; CUPERTINO, M.C.; FREITAS, K.M.; FREITAS, M.B.D.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P. Organization and Seasonal Quantification of the Intertubular Compartment in the Bat *Molossus molossus* (Pallas, 1776) Testis. **Microscopy research and technique**, v. 76, p. 94–101, 2013a.

MORATELLI R, WILSON D. Distribution and natural history of *Myotis lavalii* (Chiroptera, Vespertilionidae), **Journal of Mammalogy**, v.94, n.3, p.650-656, 2013.

MORATELLI, R.; A. L. PERACCHI.; DIAS, D.; OLIVEIRA, J. A. Geographic variation in South American populations of *Myotis nigricans* (Schinz, 1821) (Chiroptera, Vespertilionidae), with the description of two new species, **Mammalian Biology**, n.76, p. 592–607, 2011.

NEUWEILER, G. **The biology of bats**. Oxford University Press, 2000. 310p.
NOWAK, R.M. **Walker's bats of the world**. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1994.

RACEY, PA. and ENTWISTLE, AC. Life-history and reproductive strategies of bats. In: CRICHTON EG AND KRUTZSCH FP. (Eds), **Reproductive biology of bats**, Boston, Academic Press. p.363-414, 2000.

RACEY, PA. Ecology of bat reproduction. In: TH Kunz. **Ecology of bats**. Plenum Press, New York and London, v. 425, p. 57- 104, 1982.

SHARIFI, M.; AKMALI, V.; ROSTAM GHORBANI, R. Evidence of sperm storage in *Myotis capaccinii* (Chiroptera: Vespertilionidae) in western Iran, **Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 2, p. 47–61, 2008.

SIMMONS, N. B. Ordem Chiroptera. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference**. 3° ed. Baltimore: **Johns Hopkins University Press**, v.1, p. 312-529, 2005.

STADELMANN, B.; LIN L.-K, KUNZ, T.H.; RUEDI, M. Molecular phylogeny of New World *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 43, p.32-48, 2007.

WILLIG, M.R. Reproductive patterns of bats from Caatingas and Cerrado biomes in northeastern Brazil. **Journal of Mammalogy**., v. 66, p. 668-681, 1985.

WILSON, D. E. Reproductive patterns, p.317-318. In: BAKER, R.J.; JONES, J. K; CARTER D. C. (Ed.). **Biology of Bats of the New World – Family Phyllostomidae**. Special Publications Museum, Texas Tech University. p. 441, 1979.

ZORTÉA, M. Reproductive patterns and feeding habits of three nectarivorous bats (Phyllostomidae: Glossophaginae) from the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, n.1, p.159-168, 2003.

Tabela 1. Médias mensais referentes à precipitação e temperatura no ano de 2015.
Seção de Observação e Meteorologia Aplicada, (SEOMA), Pernambuco, Mata Sul

Mês	Ano	Precipitação (mm)	Temperatura (°C)
Janeiro	2015	65,4	26,9
Fevereiro	2015	56,2	27,4
Março	2015	341,2	26,8
Abril	2015	74,6	27,2
Mai	2015	182,2	26,4
Agosto	2015	115,4	24,6
Setembro	2015	35,1	25,7
Outubro	2015	16,6	26,4
Novembro	2015	30,6	27,0
Dezembro	2015	91,8	27,2

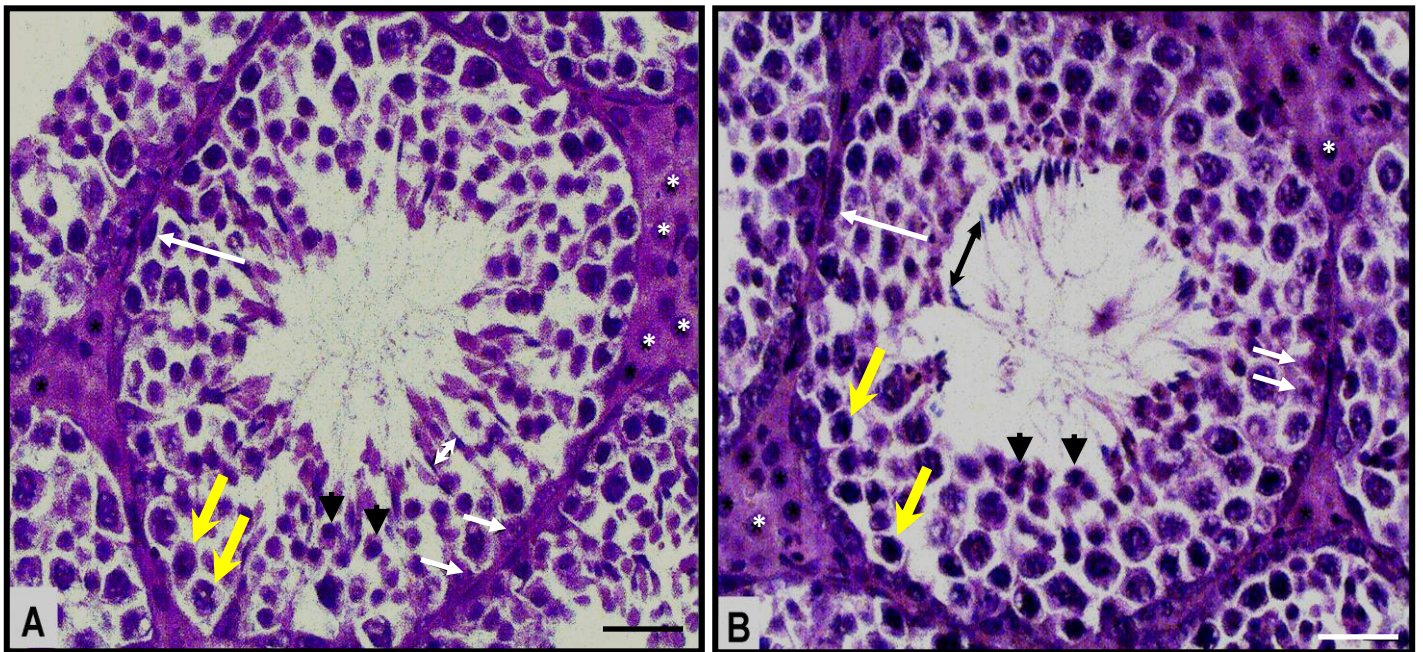


Figura 1: Fotomicrografia do testículo de *M. lavalii*: A) meses secos e B) meses chuvosos. Observar as células de Sertoli (seta branca curta), espermatogônias (seta branca longa), espermatócitos (seta amarela), espermátides arredondadas (cabeça de seta), espermátides alongadas (setas de duas cabeças) e células de Leydig (asteriscos). H.E. Barras de escala = 20 μ m.

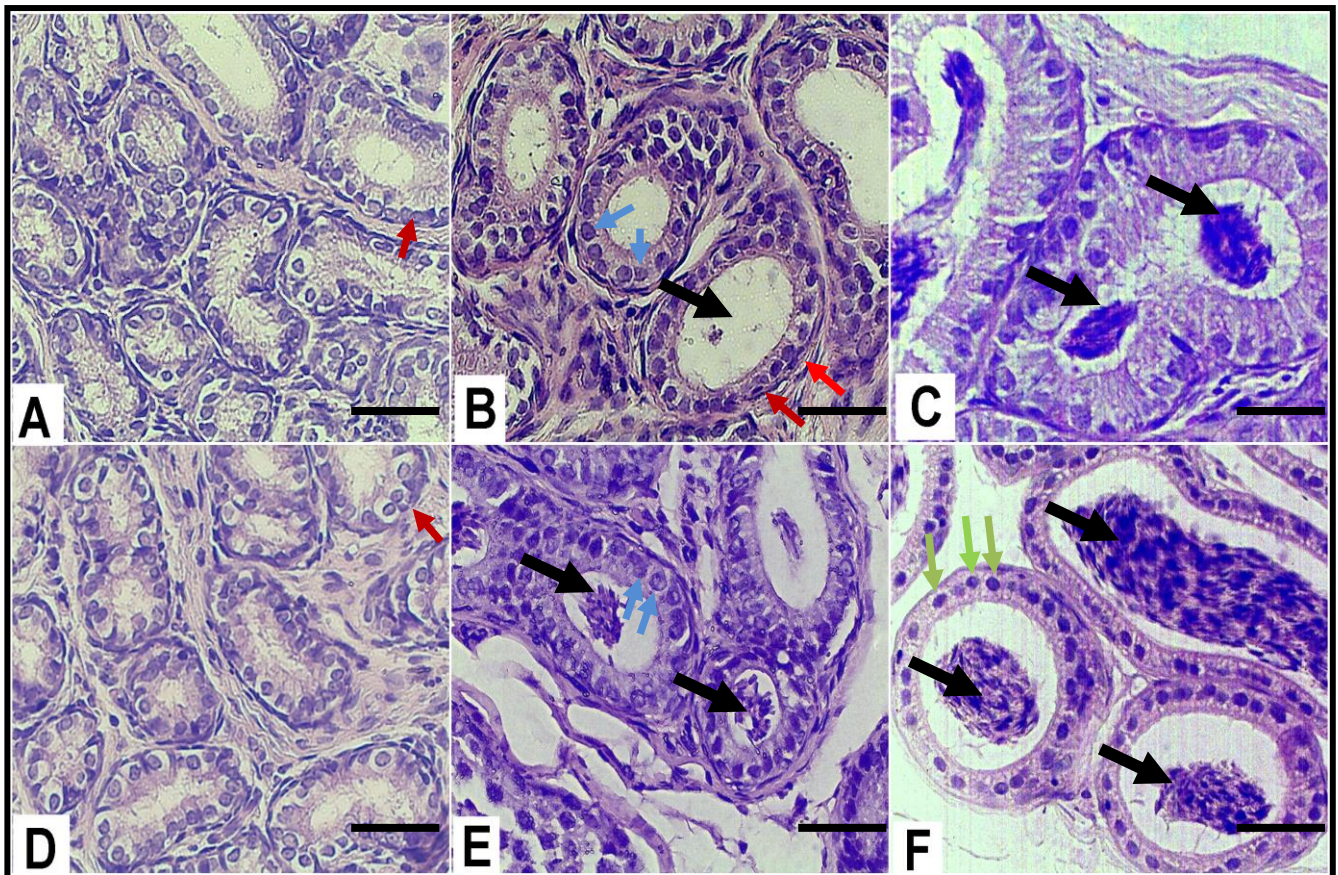


Figura 2: Fotomicrografia das três regiões do epidídimo de *M. lavalii*: meses secos, A) Cabeça, B) Corpo, C) Cauda. Meses chuvosos, D) Cabeça, E) Corpo, F) Cauda. Observar espermatozoides no lúmen (setas). Células basais (setas vermelhas), células principais (setas azuis) e células apicais (setas verdes). Coloração: H.E. Barras de escala = 20 μ m.

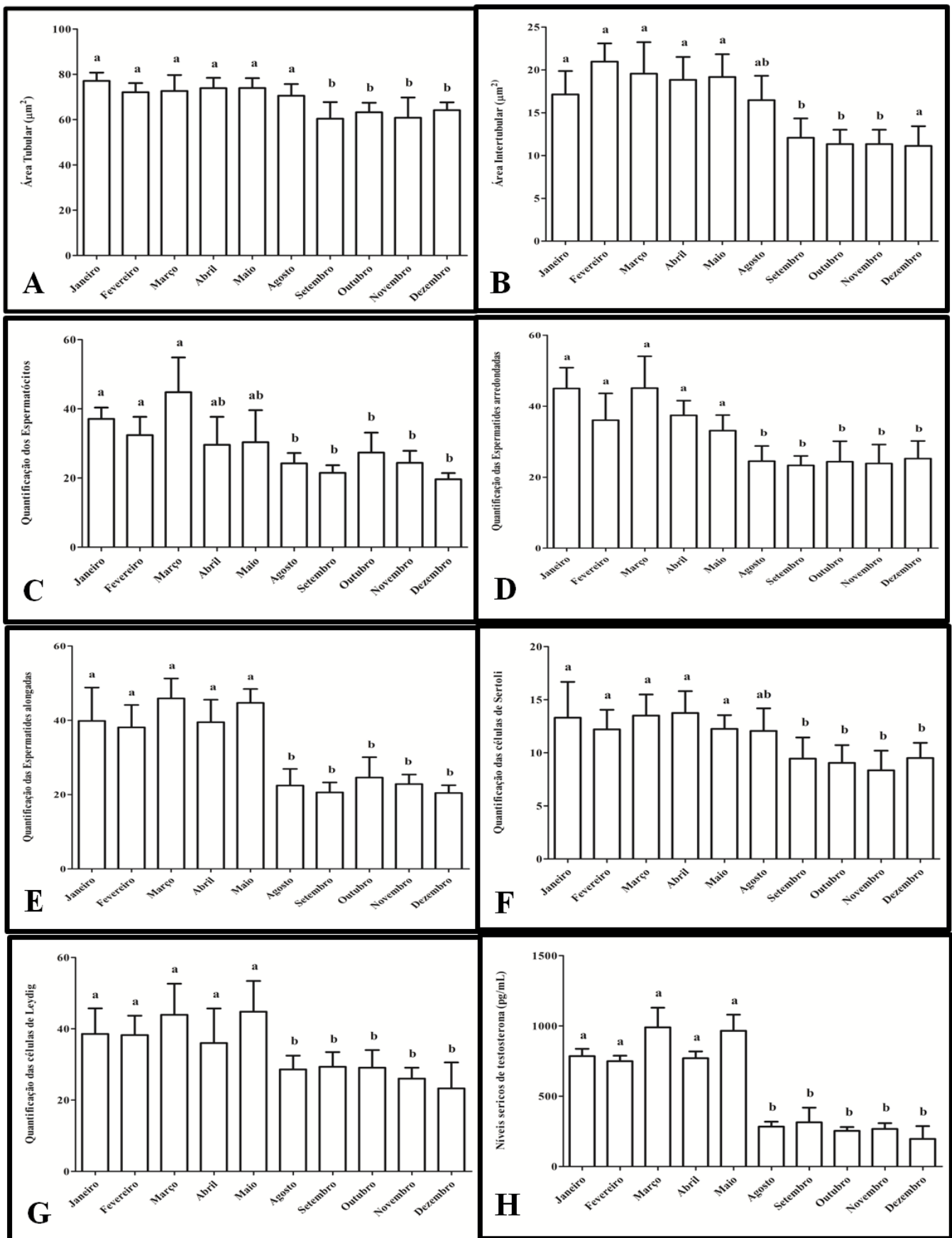


Figura 3: Gráfico das médias mensais histomorfométricas do testículo e níveis de testosterona de *M. lavalii*. A) área tubular. B) área intertubular. C) quantificação dos espermatozóitos, D) quantificação das espermátides arredondadas E) quantificação das espermátides alongadas, F) quantificação das células de Sertoli, G) quantificação das células de Leydig e H) níveis de testosterona.

Tabela 2. Média e desvio padrão da área tubular (AT), área intertubular (AIT), espermátócitos (Es), espermátides arredondadas (Ear), espermátides alongadas (Eal), células de Sertoli (CS), células de Leydig (CL) dos testículos e níveis plasmáticos de testosterona de *M. lavalis* coletados em meses secos e chuvosos em um fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, no ano de 2015.

Parâmetros	Meses secos	Meses chuvosos	P
AT	70,70 ± 3,65b	79,47 ± 5,04a	<0,001
AIT	13,97 ± 2,61b	19,76 ± 3,10a	<0,001
Es	30,51 ± 7,49a	27,22 ± 6,56a	0,1158
Ear	38,68 ± 7,56a	39,07 ± 8,71a	0,7670
Eal	37,44 ± 8,92b	54,11 ± 7,41a	<0,001
CS	9,67 ± 2,16b	14,72 ± 2,78a	<0,001
CL	33,28 ± 4,90b	48,17 ± 9,85a	<0,001
Testosterona (pg/mL)	447,60 ± 191,60b	890,00 ± 133,60a	0,0039

*Médias seguidas pela mesma letra nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Mann Whitney ($p < 0,05$).

Tabela 3. Correlação de Spearman entre a área tubular (AT), área intertubular (AI), número de espermatócitos (Es), número de espermátides arredondadas (Ear), número de espermátides alongadas (Eal), número de células de Sertoli (CS), número de células de Leydig (CL) e os níveis plasmáticos de testosterona de *M. lavalis* em um fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, 2015.

Parâmetros	R	Valores de p
AT e Testosterona	0,685	<0,001
AI e Testosterona	0,518	0,001
Es e Testosterona	0,428	0,011
Ear e Testosterona	0,751	<0,001
Eal e Testosterona	0,794	<0,001
CS e Testosterona	0,557	0,006
CL e Testosterona	0,714	<0,001

*Teste de correlação de Spearman, significativo a um nível de 5%.

R = Coeficiente de correlação.

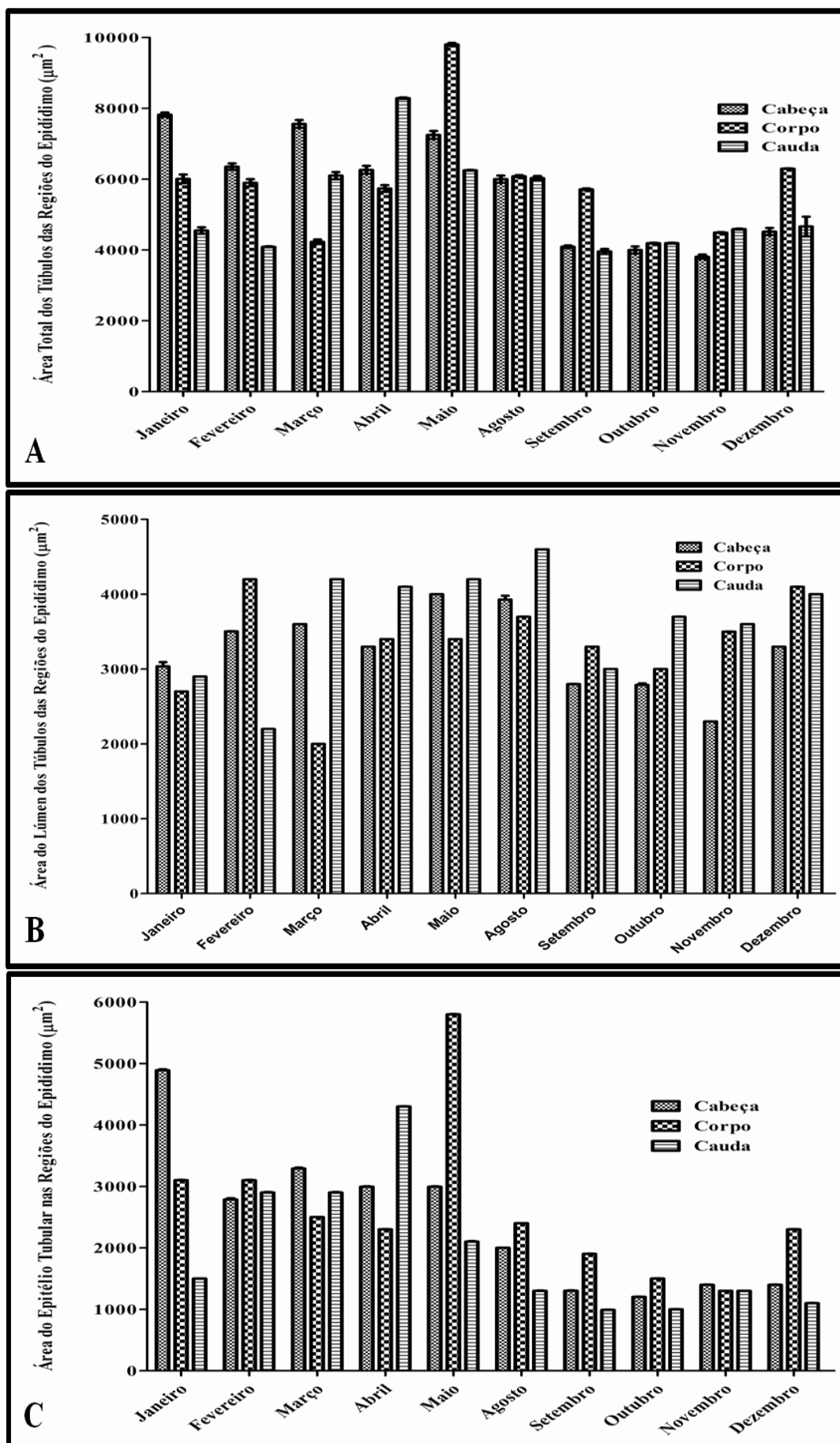


Figura 4: Gráfico evidenciando as médias mensais da área tubular (A), área do lúmen (B) e área epitelial (C) da cabeça, corpo e cauda do epidídimo de *M. lavalii* em um fragmento de Mata Atlântica, Pernambuco, 2015.

Tabela 4. Média e desvio padrão área tubular (AT), área do lúmen (AL) e área do epitélio (AE) em μm^2 , da cabeça, corpo e cauda do epidídimo de *Myotis lavalii* coletados em meses secos e chuvosos em um fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, no ano de 2015.

Parâmetros	Meses secos	Meses chuvosos	P
AT CABEÇA	5571 \pm 409,60b	6583 \pm 565,70a	<0,001
AL CABEÇA	3163 \pm 532,20b	4297 \pm 533,80a	<0,001
AE CABEÇA	2524 \pm 249,50b	2868 \pm 91,10a	<0,001
AT CORPO	5513 \pm 566,30a	6539 \pm 711,30a	0,0654
AL CORPO	3428 \pm 253,40a	3531 \pm 296,40a	0,0805
AE CORPO	2710 \pm 645,00a	3118 \pm 466,50a	0,2104
AT CAUDA	4423 \pm 266,09b	6486 \pm 314,20a	<0,001
AL CAUDA	3476 \pm 271,00b	4601 \pm 261,30a	<0,001
AE CAUDA	1540 \pm 37,79b	2683 \pm 639,10a	<0,001

*Médias seguidas pela mesma letra nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Mann Whitney ($p < 0,05$).

CAPÍTULO III

Ciclo reprodutivo sazonal dos machos de *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae) em um fragmento de Mata Atlântica, Nordeste do Brasil

Maria Juliana Gomes Arandas¹, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹, Valeria Wanderley Teixeira¹, Nivaldo Bernardo de Lima Junior¹, Fabricya Roberta da Silva¹, Diêgo Vinícius da Silva¹, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior² e Katharine Raquel Pereira dos Santos²

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia, R. Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil. CEP: 52171-900.

²Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Núcleo de Biologia, R. Alto do Reservatório S/N Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil. CEP: 55.608-680.

Autor para correspondência: Maria Juliana Gomes Arandas

UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 1738 Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil. CEP 52171-900.

E-mail: julianaarandas@hotmail.com

RESUMO

Um dos critérios para a compreensão da biologia reprodutiva em morcegos é a morfofisiologia testicular e epididimária. A biologia reprodutiva de *Molossus molossus*, tem sido estudada em diversas regiões do Brasil, como per exemplo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Entretanto, no Nordeste as informações são escassas. Assim, analisou-se a histomorfometria testicular e epididimária, bem como níveis de testosterona de *M. molossus*, coletado em fragmento de Mata Atlântica situado entre os Municípios de Tamandaré e Rio Formoso-PE. Foram selecionados 23 machos adultos, 10 nos meses secos e 13 nos meses chuvosos. Após eutanásia, amostras de sangue foram coletadas para dosagem de testosterona. Posteriormente, os testículos e epidídimos foram fixados em formol 10% tamponado, e submetidos à técnica histológica de rotina. No testículo foram avaliados as áreas tubular e intertubular, quantificação dos espermátócitos, espermátides (arredondadas e alongadas), células de Sertoli e células de Leydig, e no epidídimo, as áreas tubular, luminal e epitelial da cabeça, corpo e cauda. Na estação chuvosa os testículos apresentaram aumento na área tubular e intertubular, espermátides (arredondadas e alongadas), células de Leydig e nos níveis de testosterona. O mesmo resultado foi observado apenas na cauda do epidídimo para os parâmetros áreas tubular, luminal e epitelial. Assim, concluímos que machos de *M. molossus* ajustam a reprodução com a sazonalidade para os meses de alta precipitação.

Palavras-chave: Condições ambientais, Epidídimo, Espermatogênese, Morcego, Precipitação.

ABSTRACT

One of the criteria for the understanding about the reproductive biology in bats is the testicular and epididymal morphophysiology. The reproductive biology of *Molossus molossus* has been studied in several regions of Brazil, such as Minas Gerais and Rio Grande do Sul. However, in the Northeast the data are scarce. Therefore, the testicular and epididymal histomorphometry were analyzed as well as testosterone levels of *M. molossus* from a fragment of Atlantic Forest located between the cities of Tamandaré and Rio Formoso-PE. 23 adult males were selected, 10 for the dry months and 13 for the rainy months. After euthanasia, blood samples were collected to testosterone dosage. Subsequently, the testicles and epididymides were fixed in 10% buffered formalin, and submitted to the routine histological techniques. In the testicles were evaluated the tubular and intertubular areas, quantification of spermatocytes, rounded and elongated spermatids, Sertoli cells and Leydig cells. On the other hand, in the epididymides the tubular, luminal and epithelial areas of the head, body and tail were verified. In the rainy season the testicles showed increase in tubular and intertubular area, rounded and elongated spermatids, Leydig cells and testosterone levels. The same result was observed only in the tail of the epididymis which exhibited increased tubular, luminal and epithelial areas. In conclusion, males of *M. molossus* adjust the reproduction according to the seasonality for the months of high precipitation.

Keywords: Bat, Environmental conditions, Epididymis, Precipitation, Spermatogenesis.

1. Introdução

Na região tropical, os morcegos apresentam diversos padrões reprodutivos, que estão sincronizadas à temperatura, fotoperíodo, precipitação e a disponibilidade de recursos alimentares, de tal modo que determinados períodos do ano são mais favoráveis, visto que a reprodução é energeticamente dispendiosa (THOMPSON, 1992; MELLO et al., 2004; LIMA-JÚNIOR et al., 2014).

Em ambientes com mudanças sazonais, a disponibilidade alimentar varia paralelamente, assim determinados períodos do ano são mais adequados para a reprodução (ZÓRTEA, 2003; BEGUELINI et al., 2013; LIMA JUNIOR et al., 2014). Em resposta a todos esses fatores, os morcegos evoluíram estratégias reprodutivas morfofisiológicas para garantir o sucesso reprodutivo (BEGUELINI et al., 2012; MORAIS et al., 2013a, MORAIS et al., 2013b). Assim, cada espécie apresenta características reprodutivas peculiares, que podem variar dependendo da região de ocorrência (ZÓRTEA, 2003; BEGUELINI et al., 2013).

Molossus molossus pertence a família Molossidae, morcegos de hábito alimentar insetívoro, desempenham um importante papel ecológico no controle populacional de insetos, principalmente em ambientes antropomórficos, o que acarreta uma proximidade com os seres humanos, e por conseqüência um potencial risco epidemiológico (ALMEIDA et al.1994; UIEDA et al., 1995; ALTRINGHAM, 1996). Relacionado à biologia reprodutiva dessa espécie no Brasil, Fabián; Marques (1989) constataram no Estado do Ceará, que os machos apresentaram testículos ativos durante todo ano, ao passo que as fêmeas exibiram um padrão reprodutivo poliétrico com a presença de ovários assimétricos. No Rio Grande do Sul, Pacheco (2001) verificou espermatozoides no epidídimo durante todas as estações do ano. Moraes et al. (2013a) e Moraes et al. (2013b) evidenciaram características peculiares para a espécie, visto que os machos

apresentaram o ciclo espermatogênico anual contínuo, com maior atividade durante o outono e inverno, assim como um maior investimento esteroidogênico no verão quando comparado ao inverno. As análises ultraestruturais da espermatogênese indicaram que as divisões meióticas são similares aos demais mamíferos, ao passo que a espermiogênese é representada em 12 etapas, entretanto os espermatozoides apresentam características peculiares, como diversas projeções acrossomais onduladas (BEGUELINI et al., 2012).

O conhecimento da morfofisiologia testicular e epididimária são de suma importância para a compreensão das estratégias envolvidas no processo da reprodução de morcegos (BEGUELINI et al., 2010; MORAIS et al., 2012). Entretanto as informações referentes aos processos reprodutivos durante o ciclo anual dos machos de *M. molossus* permanecem escassas, principalmente no Nordeste do Brasil. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros histomorfométricos testiculares e epididimários, assim como as concentrações de testosterona de *M. molossus* em um fragmento de Mata Atlântica do Nordeste do Brasil.

2. Material e Métodos

2.1. Área de Estudo

As coletas foram realizadas em um fragmento de Mata Atlântica, localizado entre os Municípios de Tamandaré e Rio Formoso (08° 44'13" e 08°43'09" - Latitude Sul, 35°10'11" e 35°11'02" - Longitude Oeste), no Estado de Pernambuco.

2.2. Coleta dos animais

Os machos adultos foram coletados por 10 redes de neblina (12m x 3m) entre os meses de janeiro a dezembro de 2015 (com exceção do mês de julho onde não houve captura), durante dois dias consecutivos de cada mês, das 17:00 h às 00:00 h. Para

análise, foram selecionados aleatoriamente 23 espécimes, sendo 10 para meses secos e 13 para meses chuvosos.

Esse estudo teve a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da UFPE, nº 23076.037360/2014-92 e as coletas dos animais foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, nº 26531-3.

2.3. Dados meteorológicos e estações climáticas

As estações climáticas foram agrupadas de acordo com as informações meteorológicas de precipitação pluviométricas fornecidas pela Seção de Observação e Meteorologia aplicada. De tal modo, organizaram-se dois agrupamentos, meses secos (janeiro, fevereiro, setembro, outubro, novembro e dezembro) e meses chuvosos (março, abril, maio junho e agosto) do ano de 2015 (Tabela 1).

2.4. Estágios reprodutivos

Os animais foram avaliados com base nas características da morfologia externa das gônadas: 1) machos com testículos descendentes (testículos escrotais) e 2) machos com testículos não descendentes (testículos abdominais) (GANNON; WILLIG, 1992).

2.5. Eutanásia dos animais

Os animais foram submetidos à eutanásia, sendo anestesiados na região intraperitoneal utilizando-se pentobarbital sódico em uma concentração de 40 mg kg⁻¹, posteriormente realizada punção cardíaca (MORAIS et al., 2013).

2.6. Dosagem hormonal

As dosagens de testosterona foram realizadas mediante a coleta de sangue em cada animal através de punção cardíaca via ventrículo esquerdo, e posteriormente, as amostras foram enviadas para análises das concentrações séricas de testosterona em picograma por mililitro [pg/ml] pelo método de quimioluminescência em um laboratório comercial de análises clínicas.

2.7. Análises histológicas

Para a coleta dos testículos e epidídimos, foi realizado o rebatimento das fâscias da região abdominal, seguindo à região inguinal. As amostras foram fixadas em formalina a 10% neutra tamponada, desidratadas em sucessivas concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol, infiltradas e incluídas em parafina. Posteriormente, os blocos submetidos a microtomia em 4 µm de espessura, corados por Hematoxilina e Eosina, e avaliadas em microscopia óptica.

2.8. Análises histomorfométricas

A histomorfometria dos testículos e epidídimos foi realizada a partir de fotomicrografias obtidas no programa *Motic Images Plus 2.0*. Uma câmera foi acoplada ao microscópio óptico, assim projetou-se a lâmina no aumento estabelecido, e foram utilizadas 10 fotomicrografias por lâmina/animal. Para histomorfometria, utilizou-se o software *ImageJ* versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

No testículo, foram mensuradas a área de ocupação do compartimento tubular (AT) e a área de ocupação do compartimento intertubular (AI) expressos em porcentagem em aumento total de 100x. Foram quantificados em 10 túbulos seminíferos de cada animal, os espermátócitos (Es), espermátides arredondadas (Ear), espermátides alongadas (Eal), células de Sertoli (CS) e de Leydig (CL) em aumento total de 400x.

No epidídimo, foram mensuradas, a área tubular (AT), a área do lúmen (AL), e a área do epitélio (AE) desse órgão (cabeça, corpo e cauda) em micrômetros quadrado (µm²), no aumento total de 100x.

2.9. Análises estatísticas

Os padrões de normalidade e homogeneidade foram avaliados através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Assim, os parâmetros histomorfométricos foram submetidas aos

testes não paramétricos de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$) no programa computacional GraphPad Prism[®], sendo considerado significativo.

3. Resultados

Um total de 23 espécimes foi coletado, sendo (n=10) para meses secos, destes, 70% (n=7) apresentavam testículos descendentes e 30% (n=3) testículos não descendentes. Ao passo que (n=13) para meses chuvosos, 69,23% (n=9) com testículos descendentes e 30,77% (n=4) com testículos não descendentes.

Histologicamente, os testículos descendentes e não descendentes demonstraram atividade espermatogênica tanto nos meses secos como chuvosos, sem nenhuma evidência de regressão testicular. No compartimento tubular foi possível observar as diferentes células espermatogênicas: espermatogônias, espermatócitos, espermatídes arredondadas e espermatídes alongadas, bem como as células de Sertoli, enquanto que no compartimento intertubular, notou-se a presença das células de Leydig, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (Fig. 1A-B).

O epidídimo apresentou epitélio de revestimento é pseudo-estratificado colunar com estereocílios, com a presença de células principais, basais e apicais. Os espermatozoides gradativamente apresentaram uma maior concentração no corpo e na cauda (Fig. 2A-F).

As análises histomorfométricas do testículo indicaram um aumento significativo dos parâmetros AT, AI, Ear, Eal e CL nos meses chuvosos quando comparados aos meses secos (Fig. 3A-G e Tabela 2). Os níveis séricos de testosterona foram elevados nos meses chuvosos com exceção de abril, que mesmo sendo inferior aos demais, foi significativamente elevado em relação aos meses secos (Fig. 3H).

Na histomorfometria do epidídimo foi possível constatar que a região da cauda apresentou maiores médias significativas para os parâmetros AT, AL e AE durante os

meses chuvosos. Nos demais parâmetros não houve diferenças significativas (Fig. 4A-C e Tabela 3).

4. Discussão

Os machos com testículos descendentes e não descendentes do presente estudo apresentaram diferentes células da linhagem espermatogênica, assim como a presença de espermatozoides no epidídimo. Esses resultados enfatizam a importância de estudos morfológicos para avaliar com exatidão a atividade sexual, sobretudo das gônadas (LIMA JUNIOR et al., 2014).

A presença de maior concentração de espermatozoides no corpo e na cauda do epidídimo também foi verificada por Beguelini et al., (2010) para *M. molossus*. Tais inferências indicam que os machos permanecem aptos sexualmente durante todo o ano para ajustar ao período de receptividade das fêmeas, e associado à estratégia de armazenamento dos espermatozoides no epidídimo fora do período de acasalamento (FABIÁN; MARQUES, 1989). Os morcegos apresentam diferentes estratégias reprodutivas, que dependem de fatores ambientais e climáticos, por tal razão que uma mesma espécie pode desenvolver os mais variados padrões reprodutivos (ZÓRTEA, 2003). Essas características peculiares podem ser verificadas em estudos realizados com *M. molossus*, visto que no Estado do Ceará, Fabián e Marques (1989) constataram que os machos de *M. molossus* apresentavam testículos com atividade espermatogênica e espermatozoides no epidídimo durante todo o ano, entretanto alguns machos apresentaram ausência de espermatozóides no epidídimo.

Relacionado à histomorfometria testicular, apesar dos machos estarem aptos sexualmente durante todo ano, nota-se um forte investimento na espermiogênese e nas concentrações de testosterona em meses chuvosos. Essas estratégias reprodutivas dos machos em meses de alta precipitação estão associadas a um período de grande

disponibilidade de recursos alimentares, por tal razão é imprescindível a sincronia entre o pico de atividade espermática e a receptividade das fêmeas, e por consequência o nascimento dos filhotes na estação seguinte (FLEMING et al., 1972). Em Minas Gerais, Morais et al., (2013a) e Morais et al., (2013b) observaram que *M. molossus* apresenta atividade espermatogênica durante todo o ano, com picos concentrados durante as estações do outono e inverno, observando ainda uma maior demanda hormonal no verão. Essas características tornam-se interessantes, visto que no presente estudo *M. molossus* não apresenta nenhum investimento na reprodução direcionada para meses secos.

Os parâmetros histomorfométricos epididimários indicaram forte influência da estação chuvosa na região da cauda para todos os parâmetros avaliados. Os morcegos apresentam a capacidade de armazenar espermatozoides durante meses, e para tal há necessidade de adaptações morfofisiológicas (CRICHTON et al., 1994), como é possível observar através das maiores áreas tubular, luminal e epitelial demonstram uma necessidade dessa região em armazenar espermatozoides, uma vez que também foi observado um maior investimento na espermiogênese e esteroidogênese. Uma maior atividade epitelial na cauda indica que é no período de altas precipitações que ocorrem maiores condições fisiológicas para os espermatozoides viáveis através da absorção, secreção e metabolismo (AGUILERA-MERLO et al., 2005; BEGUELINI et al., 2010).

Conclusão

Os machos de *M. molossus* ajustam a reprodução com a sazonalidade para os meses de alta precipitação, apresentando um maior investimento na espermatogênese, níveis de testosterona e armazenamento de espermatozoides na cauda do epidídimo.

Referências

AGUILERA-MERLO C.; MUÑOZ E.; DOMINGUEZ S.; SCARDAPANE L.; PIEZZI R. Epididymis of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): Morphological changes during the annual reproductive cycle. **Anatomical Record**, v. 282, p.83-92, 2005.

ALMEIDA M.F.; AMATUZZI E.; MARTORELLI L.F.A.; SILVA M.M.S. Diagnóstico laboratorial de raiva em quirópteros realizado em área metropolitana na região sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, p. 341-344, 1994.

ALTRINGHAM, J.D. 1996. **Bats: Biology and Behavior**. University Press, Oxford.
BEGUELINI, M. R.; SERGIO, B. F. S.; LEME, F. L. J.; TABOGA, S. R.; MORIELLEVERSUTE, E. Morphological and morphometric characteristics of the epididymis in the Neotropical bats *Eumops glaucinus* and *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). **Chiroptera Neotropical**, v.16, n.2, p.769-779, 2010.

BEGUELINI MR, TABOGA SR, MORIELLE-VERSUTE E. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in Pallas's Mastiff bat, *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). **Microscopy Research and Technique**, v 75, p.856-868, 2012.

BEGUELINI, M. R.; GOES, R. M.; RAHAL, P.; MORIELLE-VERSUTE, E., TABOGA, S. R. Impact of the Processes of Total Testicular Regression and Recrudescence on the Epididymal Physiology of the Bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). **PLOS One**, p.1-18, 2015.

CRICHTON, E. G.; HINTON, B. T.; PALLONE, T.L.; HAMMERSTEDT, R. H. Hyperosmolality and sperm storage in hibernating bats: prolongation of sperm life by dehydration. **The American Journal of Physiology**, v.267 n.5, p.1363-1370, 1994.

EMMONS, L.H.; FEER, F. **Neotropical Rainforest Mammals**. 2 ed. University of Chicago Press, Chicago, USA. p.380, 1997.

FABIÁN MF E MARQUES RV. Contribuição ao conhecimento da biologia reprodutiva de *Molossus molossus* (Pallas, 1766) (Chiroptera, Molossidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.6, n.4, p. 603-610, 1989.

FLEMING, T.H.; HOOPER, E.T.; WILSON, D.E. Three central American bat communities: structure, reproductive cycles and movement patterns. **Ecology**, v. 53, p. 555 – 569, 1972.

GANNON M.R; WILLIG M.R. Bat reproduction in the Luquillo Experimental Forest of Puerto Rico. **The Southwestern Naturalist**, v.37 n.4, p. 414-419, 1992.

LIMA JUNIOR, N. B.; ARANDAS, M. J. G.; MARINHO, K. S. N.; AGUIAR JÚNIOR, F. C. A.; PONTES, A. R. M.; SANTOS, K. R. P. Histomorfometria testicular do morcego *Phyllostomus discolor* (Chiroptera: Phyllostomidae) em áreas de Mata Atlântica de Pernambuco. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 51, n. 3, p. 263-270, 2014.

MELLO, MAR., SCHITTINI, G., SELIG, P. and BERGALLO, HG. A test of the effects of climate and fruiting of Piper species (Piperaceae) on reproductive patterns of the bat *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae). **Acta Chiropterologica**, v. 6, n. 2, p.309-318, 2004.

MORAIS, D. B.; PAULA, T. A. R.; FREITAS, K. M.; MATTA, S. L. P. Cycle of the seminiferous epithelium of the bat *Molossus molossus*, characterized by tubular morphology and acrosomal development. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v.1, n.4, p.303-307, 2012.

MORAIS, D. B.; OLIVEIRA, L. C.; CUPERTINO, M. C.; FREITAS, K. M.; FREITAS, M. B. D.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P. Organization and Seasonal Quantification of the Intertubular Compartment in the Bat *Molossus molossus* (Pallas, 1776) Testis. **Microscopy research and technique**, v. 76, p.94–101, 2013a.

MORAIS, D. B.; CUPERTINO, M. C.; GOULART, L. S.; FREITAS, K. M.; FREITAS, M. B. D.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P. Histomorphometric evaluation of the *Molossus molossus* (Chiroptera, Molossidae) testis: The tubular compartment and indices of sperm production. **Animal Reproduction Science**, p. 01-11, 2013b.

NOWAK, R.M. Walker's Mammals of the World. **Johns Hopkins University Press**, London, USA., 5th ed. vol.1, p.642, 1991.

PACHECO, S. M. Biologia reprodutiva, desenvolvimento pré e pós-natal e maturidade sexual em morcegos da região Sul, Brasil (Chiroptera, Phyllostomidae, Vespertilionidae, Molossidae). Tese Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 115p, 2001.

THOMPSON, M.J.A. Roost philopatry in female pipistrelle bats *Pipistrellus pipistrellus*. **Journal of Zoology, London**. v.228, p.673–679, 1992.

UIEDA W.; HARMANI N.M.S.; SILVA M.M.S.. Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.29, n.5, p.393-397, 1995.

ZORTÉA, M. Reproductive patterns and feeding habits of three nectarivorous bats (Phyllostomidae: Glossophaginae) from the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, n.1, p.159-168, 2003.

Tabela 1. Médias mensais referentes à precipitação total e temperatura.

Seção de Observação e Meteorologia aplicada, (SEOMA), Pernambuco, Mata Sul.

Mês	Ano	Precipitação (mm)	Temperatura (°C)
Janeiro	2015	65,4	26,9
Fevereiro	2015	56,2	27,4
Março	2015	341,2	26,8
Abril	2015	74,6	27,2
Mai	2015	182,2	26,4
Junho	2015	451,4	25,0
Agosto	2015	115,4	24,6
Setembro	2015	35,1	25,7
Outubro	2015	16,6	26,4
Novembro	2015	30,6	27,0
Dezembro	2015	91,8	27,2

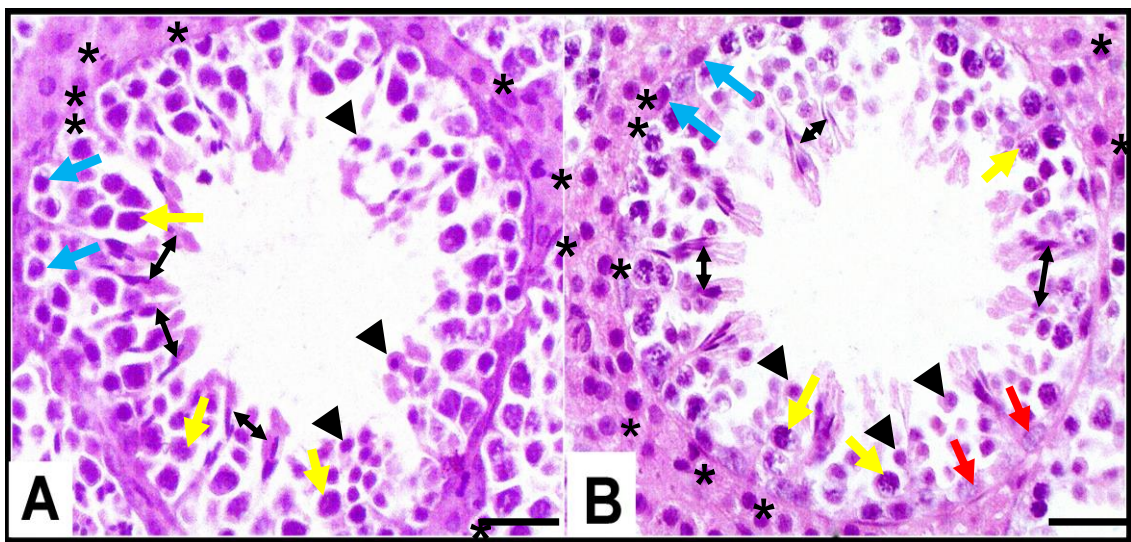


Figura 1: Fotomicrografia do testículo de *M. molossus*: meses secos (A) e meses chuvosos (B) Células de Sertoli (seta vermelha), espermatogônias (seta azul), espermatócitos (seta amarela), espermátides arredondadas (cabeça de seta), espermátides alongadas (setas de duas cabeças) e células de Leydig (asteriscos). H.E. Barras de escala = 20 μ m.

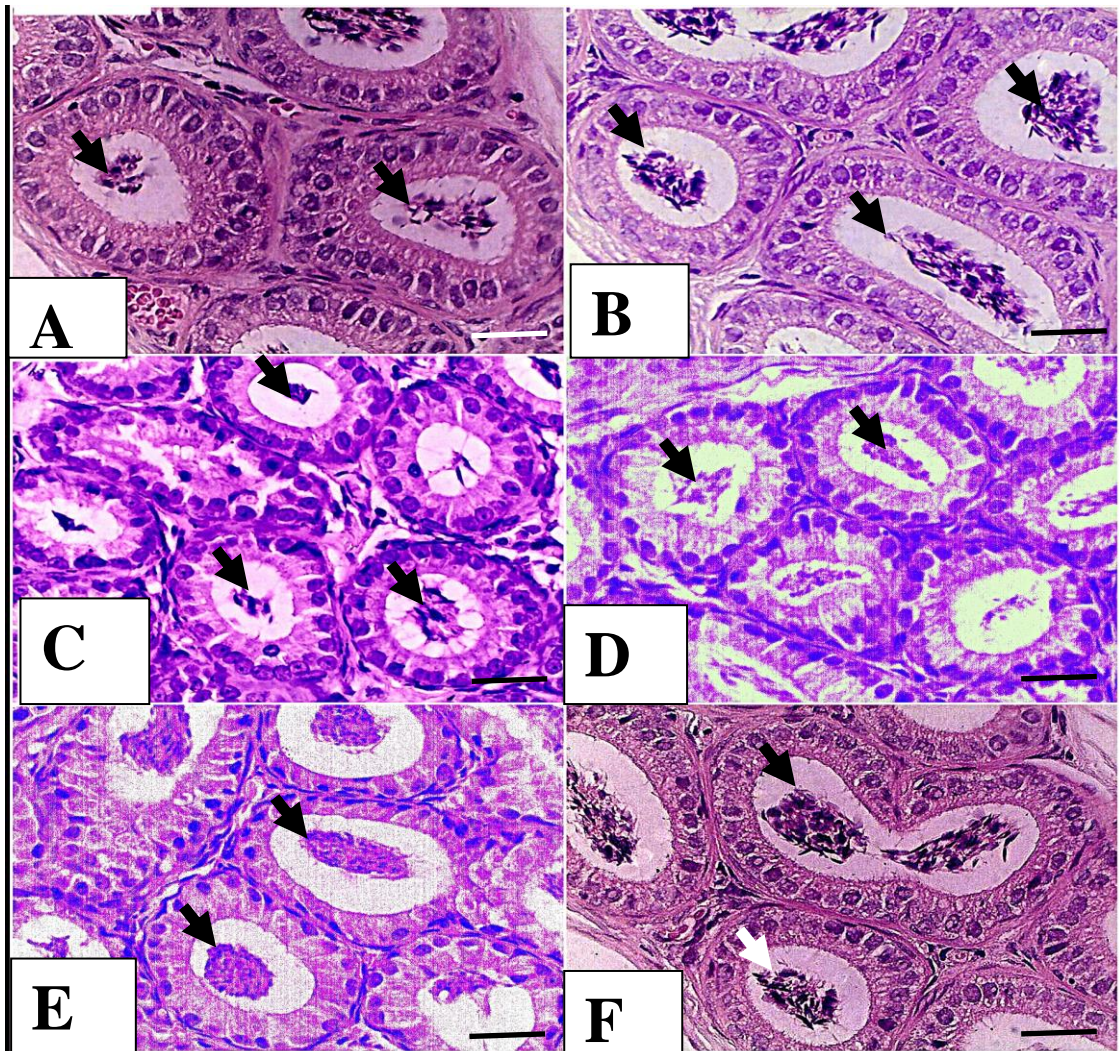


Figura 2: Fotomicrografia das regiões do epidídimo de *M. molossus*: meses secos, A) Cabeça, B) Corpo, C) Cauda. Meses chuvosos, D) Cabeça, E) Corpo, F) Cauda. Setas: espermatozoides no lúmen. H.E. Barras de escala = 20 μ m.

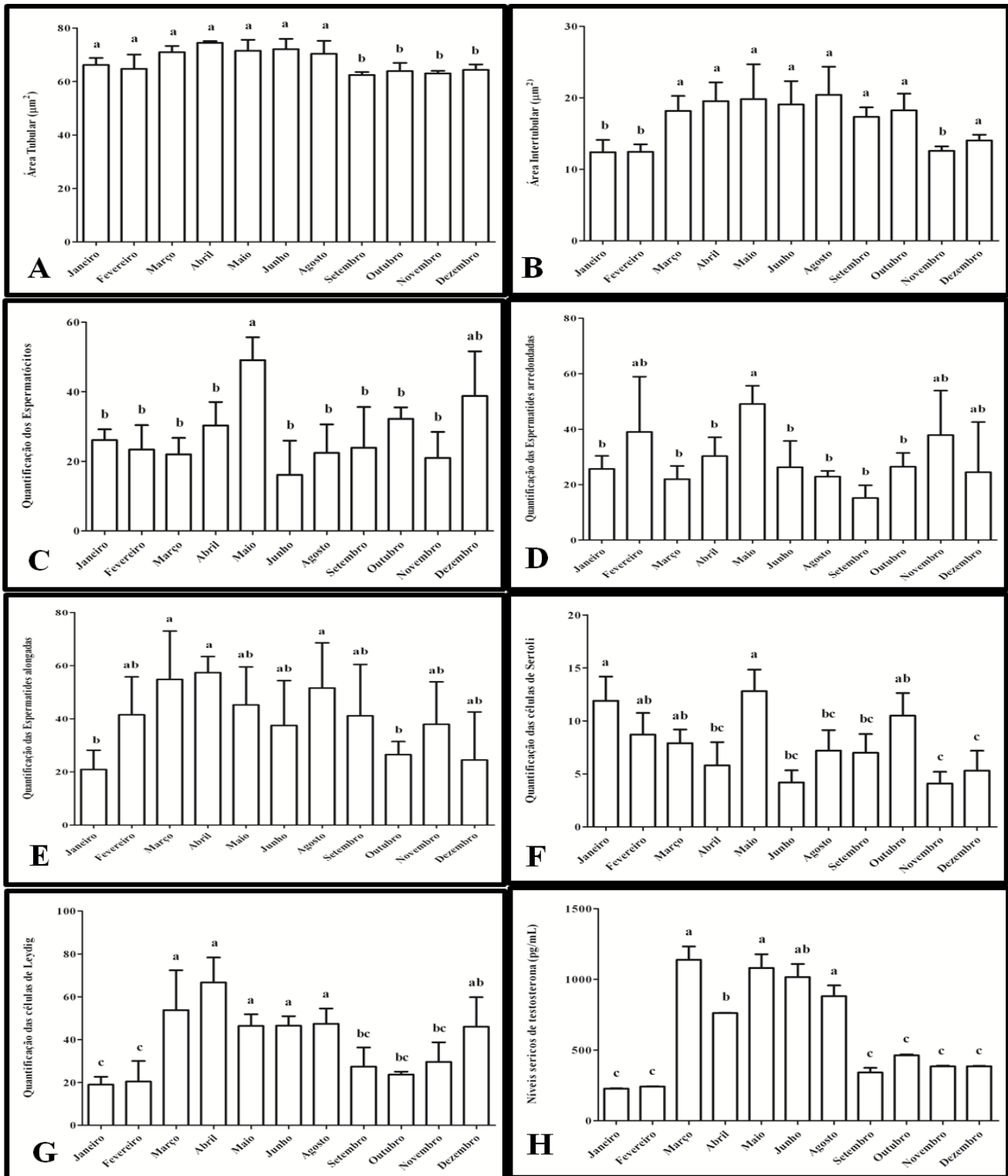


Figura 3: Gráfico das médias mensais histomorfométricas do testículo e níveis de testosterona de *M. molossus*. A) área tubular. B) área intertubular. C) quantificação dos espermátócitos, D) quantificação das espermátides arredondadas E) quantificação das espermátides alongadas, F) quantificação das células de Sertoli, G) quantificação das células de Leydig e H) níveis de testosterona.

Tabela 2. Média e desvio padrão da área tubular (AT), área intertubular (AI), espermatócitos (Es), espermatídes arredondadas (Ear), espermatídes alongadas (Eal), células de Sertoli (CS), células de Leydig (CL) dos testículos e níveis plasmáticos de testosterona de *Molossus molossus* coletados em meses secos e chuvosos em um fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, no ano de 2015.

Parâmetros	Estação seca	Estação chuvosa	P
AT (mm ²)	60,38 ± 2,11b	76,88 ± 3,65a	<0,001
AI (mm ²)	15,30 ± 1,09b	21,65 ± 2,12a	<0,001
Es	24,34 ± 3,09a	22,67 ± 2,54a	0,1008
Ear	40,21 ± 2,76b	49,13 ± 1,76a	0,0112
Eal	27,70 ± 3,12b	44,45 ± 4,02a	<0,001
CS	7,81 ± 3,50a	7,30 ± 3,34a	0,3070
CL	39,22 ± 1,19b	45,93 ± 2,44a	<0,001
Testosterona (pg/mL)	356,30 ± 80,11b	1026 ± 202,50a	0,0020

*Médias seguidas pela mesma letra nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney (p<0,05).

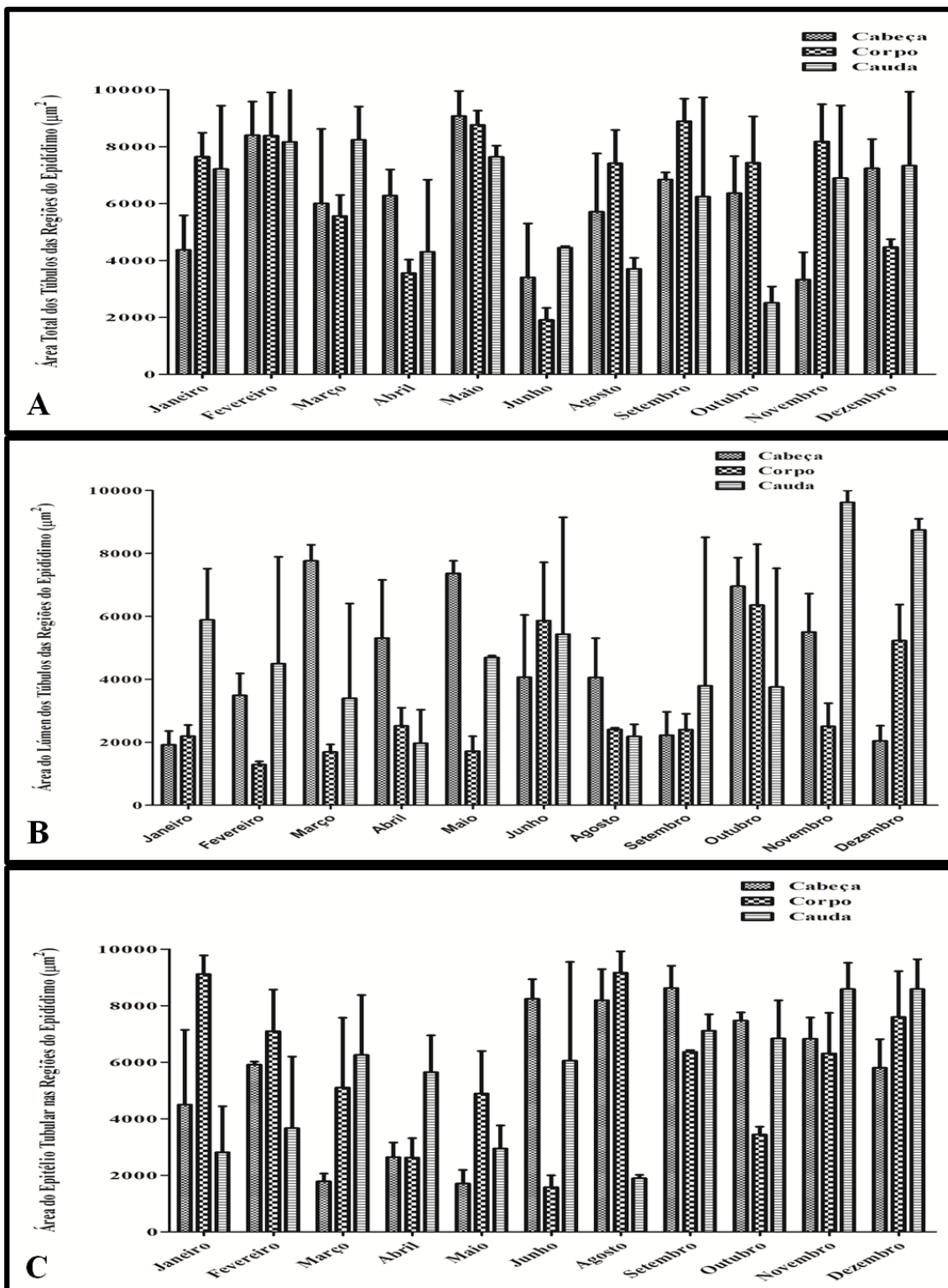


Figura 4: Gráfico evidenciando as médias mensais da área tubular (A), área do lúmen (B) e área epitelial (C) da cabeça, corpo e cauda do epidídimo de *M. molossus* em um fragmento de Mata Atlântica, Pernambuco, 2015.

Tabela 3. Média e desvio padrão da área tubular (AT), área do lúmen (AL) e área do epitélio (AE) em μm^2 , da cabeça, corpo e cauda do epidídimo de *Molossus molossus* coletados em meses secos e chuvosos em um fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, no ano de 2015.

Parâmetros	Meses secos	Meses chuvosos	P
AT CABEÇA	5435 \pm 186,90a	5512 \pm 280,87a	0,0564
AL CABEÇA	1784 \pm 197,54a	1976 \pm 175,40a	0,1309
AE CABEÇA	3920 \pm 354,09a	4087 \pm 126,70a	0,0630
AT CORPO	8076 \pm 117,55a	7998 \pm 209,32a	0,1109
AL CORPO	3254 \pm 188,39a	3184 \pm 145,66a	0,1012
AE CORPO	6587 \pm 324,87a	6298 \pm 276,54a	0,0765
AT CAUDA	5639 \pm 544,18b	6659 \pm 401,03a	<0,001
AL CAUDA	3024 \pm 365,87b	3943 \pm 236,60a	<0,001
AE CAUDA	6715 \pm 256,34b	7876 \pm 156,08a	0,0103

*Médias seguidas pela mesma letra nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$).