



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL – PPGBA

NIVALDO BERNARDO DE LIMA JUNIOR

Aspectos da reprodução sazonal em *Phyllostomus discolor* (Wagner, 1843) e *Artibeus planirostris* (Spix, 1823) (Mammalia: Chiroptera) no Município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco: características histomorfométricas, imunohistoquímicas e hormonais

Recife
2020



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

NIVALDO BERNARDO DE LIMA JUNIOR

**Aspectos da reprodução sazonal em *Phyllostomus discolor*
(Wagner, 1843) e *Artibeus planirostris* (Spix, 1823) (Mammalia:
Chiroptera) no Município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco:
características histomorfométricas, imunohistoquímicas e
hormonais**

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 Animal.

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Coorientadoras:

Profa. Dra. Katharine Raquel Pereira dos Santos

Profa. Dra. Valéria Wanderley Teixeira

Recife

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L732a Lima Junior, Nivaldo Bernardo de
Aspectos da reprodução sazonal em *Phyllostomus discolor* (Wagner, 1843) e *Artibeus planirostris* (Spix, 1823) (Mammalia: Chiroptera) no Município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco: características histomorfométricas, imunohistoquímicas e hormonais / Nivaldo Bernardo de Lima Junior. - 2020.
177 f. : il.
- Orientador: Alvaro Aguiar Coelho Teixeira.
Coorientadora: Valeria Wanderley Teixeira.
Inclui referências e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.
1. Condições ambientais. 2. Epidídimo. 3. Gônadas. 4. Morcego. 5. Morfofisiologia. I. Teixeira, Alvaro Aguiar Coelho, orient. II. Teixeira, Valeria Wanderley, coorient. III. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL – PPGBA

**Aspectos da reprodução sazonal em *Phyllostomus discolor*
(Wagner, 1843) e *Artibeus planirostris* (Spix, 1823) (Mammalia:
Chiroptera) no Município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco:
características histomorfométricas, imunohistoquímicas e
hormonais**

Tese elaborada por

NIVALDO BERNARDO DE LIMA JUNIOR

Aprovado em 13 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA:

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

Profa. Dra. Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Profa. Dra. Katharine Raquel Pereira dos Santos – UFPE / CAV

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

Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas – UFPE / CAV

Recife

2020

*Aos meus pais, Nivaldo Bernardo e Silvia Alves,
que sempre foram meu porto seguro e
forneceram-me todo o amor e suporte
necessário, dentro das condições que tinham,
para que eu chegasse até aqui. Meu caráter e
todos os objetivos que alcancei, devo a
dedicação, compreensão e educação ofertada
por eles. Amo-os incondicionalmente!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus todo poderoso, divino pai eterno, que sempre me guiou e protegeu pelas estradas dessa vida, na busca incessante para alcançar meus objetivos e a mudar minha realidade por meio dos estudos. À virgem Maria, minha mãezinha do céu, que sempre intercedeu por mim ao Pai e cobriu-me com seu manto sagrado, livrando-me de todos os perigos, dificuldades e atribulações.

Aos meus avós paternos, Severino Bernardo (Pai Bui – *in memoriam*) e Maria Gomes (Mãe Lia – *in memoriam*), e avós maternos, Inaldo Alves (*in memoriam*) e Maria José (*in memoriam*). Sou grato por tudo que fizeram em vida por mim e, sobretudo, pelos meus pais.

Aos meus pais, Nivaldo Bernardo de Lima (Val) e Severina Alves Souza de Lima (Silvia), que sempre me ofertaram todo o apoio necessário, para tudo nessa vida, com muito amor, carinho, proteção, abrigo, compreensão, companheirismo e verdade. Sempre acreditaram no meu potencial e ensinaram-me a lutar pelos meus sonhos com ética, humildade, respeito, paciência e fé. Obrigado por sonharem os meus sonhos.

À minha querida irmã, Hávila Walkíria Sousa de Lima Silva, que sempre me ajudou de diversas formas e em muitos momentos nessa caminhada. Obrigado por todo amor, carinho, apoio e companheirismo ofertado. Você teve uma importante contribuição nessa minha conquista. Amo-te!

Às minhas queridas sobrinhas, Hágda Emylle Lima da Silva e Thayná Lohanny de Sousa Silva, pelo amor, carinho, alegria e momentos descontraídos proporcionados, principalmente, nos momentos difíceis e desafiadores dessa jornada de estudos.

Ao meu orientador professor Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, e a minha coorientadora professora Dra. Valéria Wanderley Teixeira. Obrigado pela oportunidade ofertada, por acreditarem em mim e no meu trabalho na pesquisa científica. Podem ter certeza que o sim de vocês fez a diferença na minha vida e mudou minha história e realidade, pois permitiu que o sonho de tornar-me doutor se concretizasse. Agradeço-lhes por cada ensinamento e contribuição na orientação dessa tese, pelas conversas, por retirarem minhas dúvidas e estarem sempre abertos ao diálogo e ajudar no que fosse preciso.

À minha coorientadora professora Dra. Katharine Raquel Pereira dos Santos, com a qual aprendi e tenho aprendido muito desde 2011. Como aluno de iniciação científica na graduação, depois como mestrando e, por fim, como doutorando. Obrigado pela oportunidade concedida, por cada sugestão e correção, por estar sempre disponível e aberta a dialogar e retirar minhas dúvidas, por nunca me negar ajuda e orientação durante todo esse tempo nessa caminhada. Agradeço-lhe ainda por me ensinar, dia após dia, valores humanos e de vida que perpassaram muito mais do que os conhecimentos acadêmicos e profissionais. Sou grato pela amizade construída, pelas conversas partilhadas, por escutar meus desabafos, bem como por todos os conselhos ofertados.

Ao professor Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior, pela importante colaboração, orientação e parceria estabelecida nas análises histológicas, morfométricas e estatísticas. Obrigado por cada ensinamento, pela disponibilidade ofertada e por sempre me atender quando precisei. Com toda certeza, suas sugestões e ajuda foram essenciais para o desenvolvimento e concretização desse trabalho.

Ao Diretor-Geral, professor Mauro de Souza Leão França, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (IFPE) - *Campus* da cidade de Vitória de Santo Antão, por conceder a autorização para que as coletas dos morcegos pudessem ser realizadas no território pertencente a essa instituição de ensino. Agradeço também aos porteiros e seguranças. Obrigado pela disponibilidade e parceria.

À Pós-doutoranda, Dra. Ismaela Maria Ferreira de Melo, do Laboratório de Estudos Morfológicos em Vertebrados e Invertebrados (LABEMOVI) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), por toda a contribuição nas análises imuno-histoquímicas. Obrigado por me ensinar, com muita paciência, dedicação e cuidado, cada uma das etapas dessas análises. Agradeço ainda pelas conversas compartilhadas no laboratório e por toda a disponibilidade em ajudar.

Ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da UFRPE, principalmente, aos que fazem parte do LABEMOVI pelo suporte e disponibilidade em ajudar, seja nas análises imuno-histoquímicas ou por meio de uma palavra de apoio e incentivo. Agradeço especialmente a Clovis Lapa, Érique Ricardo, Marina Baptista, Laís Santos e Rebeka Alves.

A todos que constituem o Programa de Pós-graduação em Biociência Animal (PPGBA): professores, alunos, secretária (Jackeline Dantas) e demais funcionários. Em especial, agradeço a coordenação do Programa, formada pela professora Dra. Tatiana Souza Porto e pelo substituto eventual professor Dr. Rinaldo Aparecido Mota, por serem tão acessíveis na retirada de dúvidas, conversas e estarem sempre dispostos a ajudar. Todos que fazem o PPGBA contribuíram de alguma maneira, na minha formação acadêmica. Muito obrigado!

Aos colegas da turma com ingresso em 2016.1 do PPGBA. Obrigado pelo conhecimento construído, a partir das discussões e do compartilhamento de informações, durante o tempo em que cursamos as disciplinas obrigatórias e optativas.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro Acadêmico de Vitória (CAV), em especial, aos que fazem parte do Laboratório de Biotecnologia e Fármacos e Microscopia I, por sempre acolher-me e fazer-me sentir em casa. Obrigado pela disponibilização das instalações, equipamentos e materiais para que essa pesquisa pudesse ser desenvolvida.

Aos ex-estagiários e alunos de iniciação científica dos laboratórios supracitados, em especial: Camila Ingrid, Diego Vinícius, Francilleni Gomes, Juliara Gonçalves e Ruthellen Kassia. Cada um de vocês, ao seu modo e de alguma forma, contribuíram para que as coletas de campo e análises laboratoriais dos animais acontecessem. Obrigado pela ajuda durante o período das coletas de morcegos.

À minha amiga, Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho, que esteve comigo acompanhando de perto os desafios dessa jornada de estudos. Juntos, compartilhamos as dúvidas, as preocupações e as alegrias proporcionadas durante essa caminhada. Agradeço-te ainda por todo o apoio ofertado e acolhida na sua residência, durante as maratonas de estudos. Estendo esses agradecimentos a sua mãe, Sueli Nascimento, e ao seu esposo, Teone Filho. Vocês sempre terão minha amizade! Obrigado por tudo!

À minha amiga, Fabricya Roberta da Silva, que dividiu comigo os momentos desafiadores e preocupantes de coletas dos morcegos em campo e também nas análises laboratoriais. Sua ajuda foi muito importante. Obrigado também pelas risadas, momentos descontraídos e tantas conversas compartilhadas que sempre

ajudaram a tornar tudo mais leve. Saiba que tenho um grande carinho por você e levo sua amizade para a vida.

Ao amigo, Erivaldo Alves Antonio, que me ajudou nas coletas de campo, no laboratório e na tradução de um dos artigos científicos dessa tese. Obrigado também por escutar os meus desabafos e por acompanhar, de perto, a minha correria e cansaço. Além de amigos de graduação e laboratório, nos tornamos também companheiros de trabalho. Considero-te demais e agradeço por sua amizade.

À Maria Juliana Gomes Arandas, por ter acreditado em mim e no meu trabalho quando ofertou em uma oportunidade para ser seu estagiário no ano de 2011. Agradeço-te ainda pela confiança, por todas as sugestões, ensinamentos e conselhos que me ajudaram a crescer enquanto pesquisador e profissional.

À minha querida amiga, Alaine Custódio da Silva, que nunca deixou de acreditar em mim e na minha capacidade, até mesmo quando as minhas forças pareciam não mais existir... você sempre esteve aqui comigo (física ou mentalmente), inclusive quando, muitas vezes, não podia estar. Obrigado por toda a torcida, por ficar feliz com minhas conquistas, por não desistir de mim e me incluir em suas rezas e orações. Com você, tive o imensurável privilégio de viver e sentir o significado mais genuíno da palavra amizade ao longo desses últimos 20 anos. Logo, você mais do que ninguém, sabe o quanto essa conquista significa para mim. Nós conseguimos! Obrigado por tanto!

À minha amiga Danielle Vitória Nogueira de Lucena, por sempre se fazer presente na minha vida, desde a monitoria de biofísica até os dias atuais. Nossa amizade foi construída de maneira tão natural, leve e gratuita que tenho plena certeza que vem de Deus. Cada mensagem e ligação sua fortaleceram-me em muitos momentos difíceis. Obrigado pela torcida, por ouvir os meus desabafos e demonstrar, nitidamente, o quanto fica feliz com cada uma das minhas conquistas.

A todos (as) os (as) demais amigos (as), por sempre procurarem saber como eu estava, por me escutarem e se fazerem presentes na minha vida em muitos momentos. Vocês sabem quem são ... obrigado!

Aos (as) meus (minhas) queridos (as) alunos (as), que sempre despertaram em mim o melhor que posso ser. Assim, foram estímulos importantes para que eu seguisse na busca pelo conhecimento. É quando estou em sala de aula, diante de tanta singularidade e histórias de vida diversas, que vivo encontros verdadeiros que

me permitem aprender muito como docente e, principalmente, como ser humano. Obrigado por me proporcionarem isso!

Aos morcegos que ao longo de todo o tempo de pesquisa, constituíram meu objeto de estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por conceder a bolsa de estudo nesse doutorado.

Aos membros do grupo “Bolsistas CAPES” do Facebook, por cada informação e experiência de vida compartilhada na pós-graduação, bem como pelos diversos assuntos e momentos descontraídos que me ajudou por diversas vezes.

Por último, contudo não menos importante, agradeço a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho e concretização desse sonho.

A todos (as), muito obrigado!

“Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda!”
(Mario Sergio Cortella)

RESUMO

As informações acerca da morfofisiologia reprodutiva das espécies de morcegos *Phyllostomus discolor* e *Artibeus planirostris* são limitadas, sobretudo, no nordeste brasileiro. Objetivou-se verificar os aspectos sazonais na reprodução dessas espécies, por meio de parâmetros histomorfométricos, imuno-histoquímicos e hormonais no Município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Através da meteorologia estabeleceram-se meses secos (setembro a fevereiro) e chuvosos (março a agosto). Foram capturados machos adultos de *P. discolor* (n=12) – meses secos (n=06) e chuvosos (n=06) –, e de *A. planirostris* (n=16) – meses secos (n=08) e chuvosos (n=08). Coletaram-se 33 fêmeas adultas de *A. planirostris* – inativas (n=13), grávidas (n=08), lactantes (n=07) e pós-lactantes (n=05). Na histomorfometria dos ovários só se consideraram as inativas. As fêmeas de *P. discolor* não foram consideradas, porque a quantidade capturada não foi suficiente para as devidas análises. Após a anestesia, amostras de sangue foram obtidas para dosagem de testosterona (nos machos) e estrógeno (nas fêmeas). Depois da eutanásia, os testículos, os epidídimos e os ovários foram coletados, processados e as lâminas produzidas foram submetidas às análises em microscopia óptica. Nos testículos de *P. discolor* corados com a técnica AgNOR, os espermátócitos e as espermátides apresentaram médias maiores nos parâmetros avaliados em meses chuvosos. Os espermátócitos e espermátides arredondadas apresentaram mudanças em meses secos. Nas regiões do epidídimo (cabeça, corpo e cauda), houve variações na altura do epitélio, nos diâmetros do túbulo e do lúmen, e na proporção volumétrica do epitélio e lúmen em meses secos; já os vasos sanguíneos e o tecido conjuntivo apresentaram mudanças maiores em meses chuvosos. As células principais foram as mais abundantes, seguidas das basais e apicais. Para *A. planirostris* houve fêmeas grávidas apenas em meses secos, contudo fêmeas nos demais estágios reprodutivos ocorreram em meses secos e chuvosos. A dosagem de estrógeno e a presença de células PCNA positivas nos ovários foram maiores em meses de chuva. Foram encontrados folículos de Graaf somente nesses meses, já o corpo lúteo ocorreu em todos os espécimes dos meses secos. Nos machos de *A. planirostris*, houve aumento na média dos espermátócitos, espermátides arredondadas e alongadas em meses secos; já nos meses chuvosos houve maior

atividade na proliferação celular, no número de células de Sertoli e de espermatogônias. A histomorfometria epididimária indicou aumento na altura do epitélio, nos diâmetros do ducto e do lúmen das regiões da cabeça e corpo em meses secos, todavia a cauda não apresentou variações. Portanto, ambas as espécies apresentaram mudanças na sua atividade reprodutiva com algumas peculiaridades. Apesar de *P. discolor* ter demonstrado variações em alguns parâmetros relacionadas aos meses secos, e em outros aos meses chuvosos, tudo indica que essa espécie possui uma ampla flexibilidade para se reproduzir em qualquer época do ano. E, embora as fêmeas de *A. planirostris* prefiram entrar em período gestacional nos meses secos e acasalar nos chuvosos, possui um padrão reprodutivo do tipo assazonal, o que induz os machos dessa espécie a adaptarem sua atividade espermatogênica, esteroidogênica e epididimária em períodos que os fatores abióticos sejam mais vantajosos para o ciclo reprodutivo desses mamíferos.

Palavras-chaves: Condições ambientais. Epidídimo. Gônadas. Morcego. Morfofisiologia.

ABSTRACT

Information about the reproductive morphophysiology of bat species *Phyllostomus discolor* and *Artibeus planirostris* is limited, especially in northeastern Brazil. The objective was to verify the seasonal aspects in the reproduction of these species, by means of histomorphometric, immunohistochemical and hormonal parameters in the Municipality of Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Through meteorology, dry months (September to February) and rainy months (March to August) were established. Adult males from *P. discolor* (n=12) - dry (n=06) and rainy (n=06) - and from *A. planirostris* (n=16) - dry (n=08) and rainy months were captured (n=08). 33 adult *A. planirostris* females were collected - inactive (n=13), pregnant (n=08), lactating (n=07) and post-lactating (n=05). In the histomorphometry of the ovaries, only the inactive ones were considered. The females of *P. discolor* were not considered, because the quantity captured was not sufficient for the due analyzes. After anesthesia, blood samples were obtained for testosterone (in males) and estrogen (in females). After euthanasia, the testes, the epididymis and the ovaries were collected, processed and the slides produced were subjected to analysis under optical microscopy. In the testes of *P. discolor* stained with the AgNOR technique, spermatocytes and spermatids showed higher averages in the parameters evaluated in rainy months. Spermatocytes and rounded spermatids showed changes in dry months. In the regions of the epididymis (caput, corpus and cauda), there were variations in the height of the epithelium, in the diameters of the tubule and lumen, and in the volumetric proportion of the epithelium and lumen in dry months; blood vessels and connective tissue showed greater changes in rainy months. The principal cells were the most abundant, followed by basal and apical cells. For *A. planirostris* there were pregnant females only in dry months, however females in the other reproductive stages occurred in dry and rainy months. Dosage estrogen and the presence of positive PCNA cells in the ovaries were higher in rainy months. Graaf follicles were found only in these months, whereas the corpus luteum occurred in all specimens from the dry months. In *A. planirostris* males, there was an increase in the average of spermatocytes, rounded and elongated spermatids in dry months; in the rainy months, there was greater activity in cell proliferation, in the number of Sertoli cells and spermatogonia. Epididymal histomorphometry indicated an increase in the

height of the epithelium, in the diameters of the duct and lumen of the regions of the head and body in dry months, however the tail did not show variations. Therefore, both species showed changes in their reproductive activity with some peculiarities. Although *P. discolor* has shown variations in some parameters related to the dry months, and in others to the rainy months, everything indicates that this species has ample flexibility to reproduce at any time of the year. And, although the females of *A. planirostris* prefer to enter gestational periods in the dry months and mate in the rainy months, they have an reproductive pattern of the asazonal type, which induces the males of this species to adapt their spermatogenic, steroidogenic and epididymal activity in periods that the abiotic factors are more advantageous for the reproductive cycle of these mammals.

Key words: Bat. Environmental conditions. Epididymis. Gonads. Morphophysiology.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xiii
LISTA DE FIGURAS	xix
LISTA DE TABELAS.....	xxiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxvi
CAPÍTULO I.....	29
1 INTRODUÇÃO	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	32
2.1 Ordem Chiroptera: distribuição, diversidade e classificação filogenética.....	32
2.2 Importância ecológica desempenhada pelos morcegos	34
2.3 Morcegos em ambientes urbanizados.....	36
2.4 Os morcegos e a sua relação com o vírus rábico	37
2.5 Família Phyllostomidae	38
2.5.1 Subfamília Phyllostominae – espécie <i>Phyllostomus discolor</i>	39
2.5.2 Subfamília Stenodermatinae – espécie <i>Artibeus planirostris</i>	40
2.6 Aspectos da biologia reprodutiva em morcegos	42
2.7 Características morfológicas e funções dos testículos	44
2.7.1 Morfologia e função das células de Sertoli.....	46
2.7.2 Processo de espermatogênese	46
2.7.3 Morfologia e função das células de Leydig	47
2.8 Características morfológicas e funções dos epidídimos	48
2.9 Morfofisiologia testicular e epididimária de morcegos no Brasil	50
2.9.1 Morfofisiologia testicular e epididimária em <i>Phyllostomus discolor</i> e <i>Artibeus planirostris</i> no Brasil	58
2.10 Morfologia, funções e foliculogênese nos ovários	59
2.10.1 Morfofisiologia dos ovários em morcegos no Brasil	62
2.11 Aspectos gerais do Município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco	64
3 OBJETIVOS.....	66
3.1 Geral.....	66

3.2 Específicos	66
4 REFERÊNCIAS	67
CAPÍTULO II.....	82
ARTIGO CIENTÍFICO I: MORFOFISIOLOGIA TESTICULAR E EPIDIDIMÁRIA EM <i>Phyllostomus discolor</i> (WAGNER, 1843) (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE) DURANTE OS MESES SECOS E CHUVOSOS EM UM MUNICÍPIO DA MATA PERNAMBUCANA, NORDESTE DO BRASIL	82
RESUMO.....	84
ABSTRACT.....	85
1 INTRODUÇÃO.....	87
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	89
2.1 Área de estudo e animais	89
2.2 Dados meteorológicos	90
2.3 Procedimento de eutanásia dos animais e coleta dos órgãos.....	90
2.4 Análises histológicas e citológicas	91
2.5 Análises histomorfométricas e citomorfométricas.....	91
2.6 Análises imuno-histoquímicas (PCNA e receptor de andrógeno).....	93
2.7 Dosagem hormonal.....	94
2.8 Análises estatísticas	94
3 RESULTADOS.....	95
4 DISCUSSÃO.....	97
5 LITERATURA CITADA.....	101
CAPÍTULO III.....	121
ARTIGO CIENTÍFICO II: ESTÁGIOS REPRODUTIVOS E HISTOFISIOLOGIA OVARIANA EM <i>Artibeus planirostris</i> (SPIX, 1823) (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE) NOS MESES SECOS E CHUVOSOS EM UM MUNICÍPIO DA MESORREGIÃO DA MATA PERNAMBUCANA, NORDESTE DO BRASIL	121
RESUMO.....	123
ABSTRACT.....	124
1 INTRODUÇÃO.....	125
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	127

2.1 Área de estudo e animais	127
2.2 Informações meteorológicas	128
2.3 Definição do estágio reprodutivo	128
2.4 Procedimento de eutanásia dos espécimes	129
2.5 Coleta de sangue e dos órgãos	129
2.6 Dosagem hormonal.....	129
2.7 Histologia	129
2.8 Morfometria.....	130
2.9 Imuno-histoquímica (PCNA)	131
2.10 Estatística	132
3 RESULTADOS.....	132
4 DISCUSSÃO.....	134
5 LITERATURA CITADA.....	137
CAPÍTULO IV	149
ARTIGO CIENTÍFICO III: SAZONALIDADE TESTICULAR E EPIDIDIMÁRIA DE <i>Artibeus planirostris</i> (SPIX, 1823) (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE) EM UM MUNICÍPIO DA MESORREGIÃO DA MATA PERNAMBUCANA, NORDESTE DO BRASIL	149
RESUMO.....	151
ABSTRACT.....	152
1 INTRODUÇÃO.....	153
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	154
2.1 Área de estudo e animais utilizados.....	154
2.2 Meteorologia	155
2.3 Eutanásia dos animais e coleta dos órgãos	156
2.4 Análises histológicas e morfométricas	156
2.5 Análise imuno-histoquímica (PCNA)	157
2.6 Dosagem hormonal.....	158
2.7 Análises estatísticas	158

3 RESULTADOS.....	159
4 DISCUSSÃO.....	161
5 LITERATURA CITADA.....	164
ANEXO	176
PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA).....	177

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Pág.

- FIGURA 1:** Representação esquemática da hipótese atual, referente às superfamílias e famílias pertencentes às subordens Yinpterochiroptera e Yangochiroptera. Fonte: Amador et al., (2016).....34
- FIGURA 2:** Morcego macho (A) e fêmea grávida (B) da espécie *Phyllostomus discolor* (Wagner, 1843) (Chiroptera: Phyllostomidae – Phyllostominae) coletados no Município de Vitória de Santo Antão – Pernambuco. Região inguinal (setas) onde ficam localizados os testículos (A). Abdômen proeminente (setas) (B) devido à presença do feto. Fonte: Lima Junior, N. B. (Março/2017)40
- FIGURA 3:** Morcegos macho (A) e fêmeas (B, C e D) da espécie *Artibeus planirostris* (Spix, 1823) (Chiroptera: Phyllostomidae - Stenodermatinae) coletados no Município de Vitória de Santo Antão - Pernambuco. Região inguinal dos machos (A) (setas). Fêmeas: grávida (B) – abdômen proeminente (setas); lactante (C) – com a presença de secreção no mamilo (ponto branco indicado pela seta); e pós-lactante (D) – poucos pelos em volta das mamas (seta). Fonte: Lima Junior, N. B. (Janeiro, Março e Novembro/2017).....41
- FIGURA 4:** Histologia geral do testículo de morcego (*Artibeus planirostris*). Nos túbulos seminíferos (compartimento tubular) há células de Sertoli (cabeça de seta) e da linhagem espermatogênica em diferentes estágios de maturação – espermatogônias (asteriscos), espermatócitos (setas pretas), espermátides arredondadas (setas brancas) e espermátides alongadas (setas pontilhadas). No lúmen (Lu) desses túbulos encontram-se os espermatozoides. Entre os túbulos seminíferos (compartimento intertubular) há células de Leydig (seta de duas cabeças). Coloração: Hematoxilina – Eosina. Barra de escala = 30 µm. Fonte: Lima Junior, N. B. (Abril /2017).....45

FIGURA 5: Histologia geral das regiões do epidídimo (Cabeça – A, Corpo – B e Cauda – C) de morcego (*Phyllostomus discolor*). Epitélio (Ep), Lúmen (Lu) e Interstício (It). Coloração: Hematoxilina – Eosina. Barra de escala = 30 µm. Fonte: Lima Junior, N. B. (Novembro /2016).....49

FIGURA 6: Histologia geral de um ovário de morcego (*Artibeus planirostris*). Córtex (C), medula (M), folículo em atresia (FA), folículos primordiais (cabeça de seta), folículo primário ou primário unilaminar (setas pretas), folículo secundário ou primário multilaminar (setas pretas pontilhadas), folículo terçoário ou antral (seta branca) e folículo pré-ovulatório, maduro ou de Graaf (asterisco). Coloração: Hematoxilina – Eosina. Barra de escala = 250 µm. Fonte: Lima Junior, N. B. (Junho /2017).....61

CAPÍTULO II

FIGURA 1: Fotomicrografias dos testículos de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos (A) e chuvosos (B) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Observar o epitélio seminífero com células de Sertoli (cabeça de seta) e da linhagem espermatogênica em diferentes estágios de maturação – espermatogônias (asteriscos), espermatócitos (setas pretas), espermátides arredondadas (setas brancas), espermátides alongadas (setas pontilhadas) –, e o lúmen (Lu) no compartimento tubular. Notar também as células de Leydig (seta de duas cabeças) distribuídas ao longo do compartimento intertubular. Coloração: Hematoxilina – Eosina (H. E.). Barras de escala = 10 µm107

FIGURA 2: Fotomicrografias dos túbulos seminíferos dos testículos de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos (A) e chuvosos (B) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Observar as Regiões organizadoras de nucléolos (NORs) – pontos escuros – no interior dos núcleos das células da linhagem espermatogênica em diferentes estágios de maturação no epitélio germinativo. Espermatogônias (setas pontilhadas), espermatócitos (setas contínuas), espermátides (ponta de setas). L=Lúmen. Coloração: AgNOR. Barras de escala = 10 µm108

FIGURA 3: Fotomicrografias das três regiões (cabeça – A e D; corpo – B e E; cauda – C e F) do epidídimo de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Notar o epitélio (Ep) e Lúmen (Lu) em cada uma dessas regiões. Observar também os tipos celulares encontrados no epitélio: células principais (setas pretas), células basais (cabeça de seta) e células apicais (setas pontilhadas). Colorações: H. E. (A, B e C) e azul de toluidina com borato de sódio (D, E e F). Barras de escala= 10 µm..... 109

FIGURA 4: Fotomicrografias das três regiões (cabeça – A e D; corpo – B e E; cauda – C e F) do epidídimo de *Phyllostomus discolor* coletados em meses chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Notar o epitélio (Ep) e Lúmen (Lu) em cada uma dessas regiões. Observar também os tipos celulares encontrados no epitélio: células principais (setas pretas), células basais (cabeça de seta) e células apicais (setas pontilhadas). Colorações: H. E. (A, B e C) e azul de toluidina com borato de sódio (D, E e F). Barras de escala= 10 µm.....110

FIGURA 5: Parâmetros histomorfométricos testiculares (A) e dosagem do hormônio testosterona – HT (B) de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. AOCT (área de ocupação do compartimento tubular), AOCl (área de ocupação do compartimento intertubular), CS (células de Sertoli), EPG (espermatogônias), EPC (espermatócitos), EAR (espermátides arredondadas), EAL (espermátides alongadas) e CL (células de Leydig). Médias seguidas por letras diferentes (a, b) em cada parâmetro, diferem significativamente entre si pelo teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).....111

FIGURA 6: Imuno-histoquímica do PCNA nos testículos de *Phyllostomus discolor* coletados nos meses chuvosos (A) e secos (B). Observar ainda a quantificação, em percentual, de células PCNA positivas nos meses secos e chuvosos (C) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$).112

FIGURA 7: Imuno-histoquímica do receptor de andrógeno nos testículos de *Phyllostomus discolor* coletados nos meses chuvosos (A) e secos (B) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Observar ainda a quantificação, em percentual, de células positivas para receptores de andrógeno nos meses secos e chuvosos (C). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$).....113

CAPÍTULO III

FIGURA 1: Relação entre a precipitação mensal e o número de fêmeas de *Artibeus planirostris*, em diferentes estágios reprodutivos, capturadas no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.....142

FIGURA 2: Fotomicrografias dos ovários de *Artibeus planirostris* coletados em meses secos (A – B) e chuvosos (C – D) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Notar a presença de folículos ovarianos em diferentes estágios de maturação – folículos primordiais (cabeça de seta), folículo primário unilaminar (seta preta); folículo primário multilaminar (asterisco); folículo antral (seta pontilhada), folículo de Graaf (seta de duas cabeças) – e corpo lúteo (CLU). Coloração: H. E. Barras de escala = 300 μm (A, C) e 100 μm (B, D).....143

FIGURA 3: Dosagem hormonal de estrógeno (DHE) de fêmeas de *Artibeus planirostris* coletadas em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Médias seguidas por letras diferentes (a, b), diferem significativamente entre si pelo teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).....144

FIGURA 4: Imuno-histoquímica do PCNA nos ovários de *Artibeus planirostris* coletados nos meses chuvosos (A) e secos (B) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Observar ainda a quantificação, em percentual, de células PCNA positivas em cada uma das estações (C). Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$)145

CAPÍTULO IV

Pág.

FIGURA 1: Fotomicrografias dos testículos de *Artibeus planirostris* coletados em meses secos (A) e chuvosos (B) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Epitélio seminífero com células de Sertoli (cabeça de seta) e da linhagem espermatogênica – espermatogônias (asteriscos), espermatócitos (setas pretas), espermatídes arredondadas (setas brancas), espermatídes alongadas (setas pontilhadas) –, e o lúmen (Lu) no compartimento tubular. Notar também as células de Leydig (seta de duas cabeças) no compartimento intertubular. Coloração: Hematoxilina – Eosina. Barras de escala =10 µm.169

FIGURA 2: Fotomicrografias das três regiões – cabeça (A, D), corpo (B, E) e cauda (C, F) – do epidídimo de *Artibeus planirostris* coletados em meses secos (A – C) e chuvosos (D – F) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Observar o epitélio (Ep) e Lúmen (Lu) em cada uma das regiões. Coloração: Hematoxilina – Eosina. Barras de escala = 10 µm. 170

FIGURA 3: Parâmetros histomorfométricos testiculares de *Artibeus planirostris* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. CS (células de Sertoli), EPG (espermatogônias), EPC (espermatócitos), EAR (espermatídes arredondadas), EAL (espermatídes alongadas) e CL (células de Leydig). Médias seguidas por letras diferentes (a, b) em cada parâmetro, diferem significativamente entre si pelo teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).....171

FIGURA 4: Imuno-histoquímica do PCNA nos testículos de *Artibeus planirostris* coletados em meses chuvosos (A) e secos (B) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Observar ainda a quantificação, em percentual, de células PCNA positivas em cada uma das estações (C). Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$).....172

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Pág.

TABELA 1: Parâmetros citomorfométricos avaliados nas espermatogônias de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Número de região organizadora de nucléolo por célula (NNORC), área da região organizadora de nucléolo ocupada na célula (ANOROC), área do núcleo da célula (ANC), área da célula (AC), porcentagem do núcleo ocupada pela região organizadora de nucléolo (PNONOR) e porcentagem da célula ocupada por núcleo (PCON).....114

TABELA 2: Parâmetros citomorfométricos avaliados nos espermátócitos de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Número de região organizadora de nucléolo por célula (NNORC), área da região organizadora de nucléolo ocupada na célula (ANOROC), área do núcleo da célula (ANC), área da célula (AC), porcentagem do núcleo ocupada pela região organizadora de nucléolo (PNONOR) e porcentagem da célula ocupada por núcleo (PCON).....114

TABELA 3: Parâmetros citomorfométricos avaliados nas espermátides de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Número de região organizadora de nucléolo por célula (NNORC), área da região organizadora de nucléolo ocupada na célula (ANOROC), área do núcleo da célula (ANC), área da célula (AC), porcentagem do núcleo ocupada pela região organizadora de nucléolo (PNONOR) e porcentagem da célula ocupada por núcleo (PCON).....115

TABELA 4: Proporção volumétrica (%) do epitélio (Ep), lúmen (Lu), vasos sanguíneos (VS) e tecido conjuntivo (TC) das regiões do epidídimo (cabeça – CA, corpo – CP e cauda – CAU) de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.....116

TABELA 5: Parâmetros histomorfométricos (altura do epitélio – AE, diâmetro do túbulo – DT e diâmetro do lúmen – DL) avaliados nas regiões do epidídimo (cabeça – CA, corpo – CP e cauda – CAU) de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.....117

TABELA 6: Distribuição relativa (%) das células principais (CPr), basais (CBa) e apicais (CAp) das três regiões do epidídimo (cabeça – CA, corpo – CP e cauda – CAU) de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.....118

CAPÍTULO III

TABELA 1: Números de folículo primário multilaminar (FPM), folículo antral (FAT), folículo de Graaf (FGA) e corpo lúteo (CLU) encontrados nas fêmeas inativas de *A. planirostris*, coletadas em meses secos e chuvosos no Município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.....146

TABELA 2: Média da área (μm^2) dos folículos ovarianos: primário unilaminar (FPU), primário multilaminar (FPM), antral (FAT) e de Graaf (FGA) da espécie *Artibeus planirostris* coletada no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.....146

CAPÍTULO IV

TABELA 1: Parâmetros histomorfométricos (altura do epitélio – AE, diâmetro do túbulo – DT e diâmetro do lúmen – DL) avaliados nas regiões do epidídimo (cabeça – CA, corpo – CP e cauda – CAU) de *Artibeus planirostris* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.....173

LISTA DE ABREVIATURAS

AC – Área da célula

AE – Altura do epitélio

AgNOR – Argyrophilic nucleolar organizer regions (Regiões organizadoras nucleolares argirofílicas)

ANC – Área do núcleo da célula

ANOROC – Área da região organizadora de nucléolo ocupada na célula

AOCT – Área de ocupação do compartimento tubular

AOCI – Área de ocupação do compartimento intertubular

AR – Androgen receptor (Receptor de andrógeno)

BSA – Bovine serum albumin. (Albumina sérica bovina)

CA – Cabeça do epidídimo

CAp – Células apicais

CAU – Cauda do epidídimo

CBa – Células basais

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CL – Células de Leydig

CLU – Corpo lúteo

CP – Corpo do epidídimo

CPr – Células principais

CS – Células de Sertoli

DAB – Diaminobenzidina

DHE – Dosagem hormonal de estrógeno

DL – Diâmetro do lúmen do epidídimo

DT – Diâmetro do túbulo do epidídimo

EAL – Espermátides alongadas

EAR – Espermátides arredondadas

Ep – Epitélio

EPC – Espermatócitos

EPG – Espermatogônias

ES – Epitélio seminífero

FA – Folículo em atresia

FAT – Folículo antral

FGA – Folículo de Graaf, maduro ou pré-ovulatório

FPM – Folículo primário multilaminar

FPU – Folículo primário unilaminar

H. E. – Hematoxilina – Eosina

HT – Hormônio testosterona

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

It – Interstício

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia

Lu – Lúmen

NBF – Formalina a 10% neutra tamponada

NNORC – Número de região organizadora de nucléolo por célula

NOR – Região organizadora de nucléolo

PBS – Phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salino)

PCNA – Proliferating cell nuclear antigen (Antígeno nuclear de proliferação celular)

PNONOR – Porcentagem do núcleo ocupada pela região organizadora de nucléolo

PCON – Porcentagem da célula ocupada por núcleo

SEOMA – Seção de Observação e Meteorologia Aplicada

SISBIO – Sistema de Autorização e informação em Biodiversidade

SPSS – Statical Package of the Social Scienses

TC – Tecido conjuntivo

TRIS – Tris (hidroximetil) aminometano

VS – Vasos sanguíneos

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Os morcegos são mamíferos classificados na ordem Chiroptera e são encontrados amplamente por todo o planeta, com exceção apenas de algumas ilhas oceânicas e nas regiões polares. Compõem 18 famílias, 202 gêneros e cerca de 1300 espécies que estão organizadas em duas subordens: Yinpterochiroptera e Yangochiroptera (JONES; TEELING, 2006; FENTON; SIMMONS, 2014; AMADOR et al., 2016). No território brasileiro, encontram-se aproximadamente 178 espécies, que fazem parte apenas da subordem Yangochiroptera e estão distribuídas em nove famílias: Phyllostomidae, Molossidae, Vespertilionidae, Emballonuridae, Thyropteridae, Mormoopidae, Noctilionidae, Furipteridae e Natalidae (NOGUEIRA et al., 2014).

Esses animais possuem papéis relevantes no ecossistema que estão relacionados principalmente aos variados hábitos alimentares que apresentam. Assim, por meio da dispersão de sementes, podem contribuir na manutenção e regeneração de florestas; atuam na polinização de flores de diversas plantas, na predação de artrópodes, peixes, rãs e alimentam-se de sangue de aves e mamíferos; são considerados bioindicadores em potencial de áreas perturbadas e podem ainda contribuir na fertilização do solo com os nutrientes do guano que produzem (LOBOVA; CULLEN; SCOTT, 2009; JONES et al., 2009; KUNZ et al., 2011; BREDET; UIEDA; PEDRO, 2012; KASSO; BALAKRISHNAN, 2013).

A importância ecológica desempenhada pelos quirópteros pode ser reconhecida nos diferentes biomas em que são encontrados, de modo que muitos deles habitam em áreas de Mata Atlântica. Contudo, nos dias atuais, esse bioma encontra-se fragmentado por conta da atuação antrópica e do crescimento da população que resultou na expansão das áreas urbanizadas. Além disso, esse bioma veio sendo destruído ao longo dos anos para ceder lugar à atividade agrícola, sobretudo, para o cultivo da cana-de-açúcar. Esses acontecimentos vieram impactando a Mata Atlântica e afetando muitas espécies de morcegos, por meio da destruição dos seus habitats naturais. Com isso e por conta da sua ampla capacidade de dispersão, várias espécies adaptaram-se a conviver próximo à

população humana em áreas urbanas, nas quais têm encontrado abrigo e alimentação disponível (BARROS; BISAGGIO; BORGES, 2006; LIMA, 2008; MACHADO; DRUMMOND; PÁGLIA, 2008). Essa ampla adaptabilidade traz consigo preocupações no contexto da saúde, uma vez que esses animais são reservatórios naturais em potencial de várias antropozoonoses, das quais se pode destacar a raiva como a mais perigosa, por conta da sua letalidade (SODRÉ; GAMA; ALMEIDA, 2010; WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011; ESBÉRARD et al., 2014; MOUTINHO et al., 2015).

Apesar dessas particularidades, os morcegos ainda são poucos investigados sob o ponto de vista da biologia reprodutiva. Os padrões, as estratégias e os ciclos reprodutivos anuais podem ser bastante diversos, a depender da espécie e da região no qual habitam. Esses padrões podem variar da monoestria à poliestria (FABIÁN; MARQUES, 1989; BALMORI, 1999; REIS et al., 2011), de modo que, na região neotropical, quatro tipos de padrões reprodutivos podem ser encontrados, a saber: monoestria sazonal, poliestria sazonal, poliestria sazonal bimodal e poliestria assazonal (FLEMING; HOOPER; WILSON, 1972; TADDEI, 1976; WILLIG, 1985a, 1985b; ZORTÉA, 2003).

Diante disso, esses mamíferos podem desenvolver diferentes estratégias reprodutivas, as quais podem ser notadas principalmente nos testículos, epidídimos, ovários e útero, para lidar com as variações das condições ambientais (CRICHTON; KRUTZSCH, 2000; ENCARNAÇÃO et al., 2003; BEGUELINI; TABOGA; MORIELLE-VERSUTE, 2012; ARAÚJO et al., 2013). Essas estratégias são induzidas por fatores abióticos e bióticos, de forma que optam por acasalar e parir em épocas do ano que forneçam condições adequadas e favoráveis à ocorrência desses eventos (FLEMING; HOOPER; WILSON, 1972; CRICHTON; KRUTZSCH, 2000; ZORTÉA, 2003).

No Brasil, investigações com enfoque na morfofisiologia dos testículos, epidídimos e ovários têm sido realizadas com diferentes espécies, principalmente, nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Entretanto, na região nordeste, estudos dentro dessa perspectiva são reduzidos e estão limitados a algumas investigações apenas no estado de Pernambuco (LIMA JUNIOR et al., 2014, 2018a, 2018b; BEGUELINI et al., 2015; NOTINI et al., 2015; CASTRO et al., 2017; MORAIS et al.,

2017; BUENO et al., 2018; CAMPOLINA-SILVA; HESS; OLIVEIRA, 2018; FERREIRA et al., 2018; SOUZA et al., 2018; ARANDAS et al., 2019).

Phyllostomus discolor (Wagner, 1843) e *Artibeus planirostris* (Spix, 1823), pertencem à família Phyllostomidae que é considerada a maior e mais diversificada entre as famílias da ordem Chiroptera (DATZMANN; HELVERSEN; MAYER, 2010; OLIVEIRA; LEMES, 2010; REIS et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2014; BAKER et al., 2016). As investigações acerca da reprodução dessas espécies são bastante pontuais (BEGUELINI et al., 2009, 2013a, 2013b; LIMA JUNIOR et al., 2014; BUENO et al., 2018). Assim, esta pesquisa teve por objetivo verificar os aspectos e relações sazonais existentes na reprodução das espécies supracitadas coletadas no Município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ordem Chiroptera: distribuição, diversidade e classificação filogenética

Os morcegos fazem parte da ordem Chiroptera (do grego, *Chiro* = mão, *Ptero* = asa) que compreende a segunda maior ordem, em número de espécies, dentre os mamíferos existentes. No mundo, estão classificados em 18 famílias, 202 gêneros e aproximadamente 1300 espécies (GARDNER, 2008; FENTON; SIMMONS, 2014).

Esses animais estão distribuídos ao longo de todo o globo terrestre, tanto em áreas tropicais quanto temperadas, exceto em algumas ilhas do oceano pacífico e também nas regiões polares (Ártico e Antártica). A ampla distribuição dos quirópteros por todo o planeta tem relação ao fato de consistirem nos únicos mamíferos com capacidade de realizar o voo verdadeiro, já que suas mãos são adaptadas em asas (SIMMONS, 2005; VOIGHT; KINGSTON, 2016).

Além disso, a ecolocalização também consiste em outro atributo que foi de suma importância para que os morcegos se dispersassem em todo o planeta e explorassem diferentes nichos. Essa habilidade corresponde à produção de sons de frequências elevadas entoados por meio das cavidades nasal e bucal desses animais. Há algumas espécies que conseguem fazer a amplificação desses sons por meio dos apêndices nasais. Desse modo, quando o som é emitido, este bate na presa e/ou nos obstáculos e são direcionados de volta para o morcego permitindo o direcionamento do animal (JONES; TEELING, 2006; FENTON; SIMMONS, 2014).

Os estudos filogenéticos moleculares atuais evidenciaram características importantes nos organismos que fazem parte da ordem Chiroptera. Porém, antes desses achados, a classificação sistemática dos quirópteros era realizada por meio de dados morfológicos que sustentavam o monofiletismo dessa ordem. Com isso, eram classificados em duas subordens: Microchiroptera (incluíam todos os morcegos que produziam chamadas de ecolocalização laringeal) e Megachiroptera (englobava todos os morcegos do velho mundo de hábito alimentar frugívoro e que não possuíam ecolocalização) (HALL; RICHARDS, 2000; JONES; TEELING, 2006).

Depois de alguns estudos, principalmente comportamentais e moleculares, chegou-se a um consenso. Houve uma revisão na filogenia e uma nova classificação dessa ordem foi criada. Com base nas análises e investigações do DNA mitocondrial

e nuclear, surgiram duas novas subordens: Yinpterochiroptera e Yangochiroptera. A subordem Yinpterochiroptera é formada por uma família (Pteropodidae) e uma superfamília (Rhinolophoidea), sendo esta constituída por seis famílias (Rhinonycteridae, Hipposideridae, Rhinolophidae, Rhinopomatidae, Megadermatidae e Craseonycteridae). Antes dessa nova classificação, essa superfamília pertencia à subordem Microchiroptera; todavia por meio das investigações moleculares, constatou-se que Rhinolophoidea possuíam características mais próximas dos indivíduos pertencentes à subordem Megachiroptera; por conta disso foi agrupada na subordem Yinpterochiroptera. Enquanto que a subordem Yangochiroptera inclui as famílias de quirópteros que antes eram tradicionalmente compreendidas na subordem Microchiroptera. Assim, em Yangochiroptera, encontram-se três superfamílias: Emballonuroidea – formada por duas famílias (Emballonuridae e Nycteridae); Noctilionoidea – constituída por sete famílias (Mystacinidae, Thyropteridae, Furipteridae, Noctilionidae, Mormoopidae, Phyllostomidae e Myzopodidae); e Vespertilionoidea – composta por cinco famílias (Natalidae, Molossidae, Miniopteridae, Cistugidae e Vespertilionidae) (JONES; TEELING, 2006; TEELING, 2009; FENTON; SIMMONS, 2014; SOLARI et al., 2014; AMADOR et al., 2016) (Fig. 1).

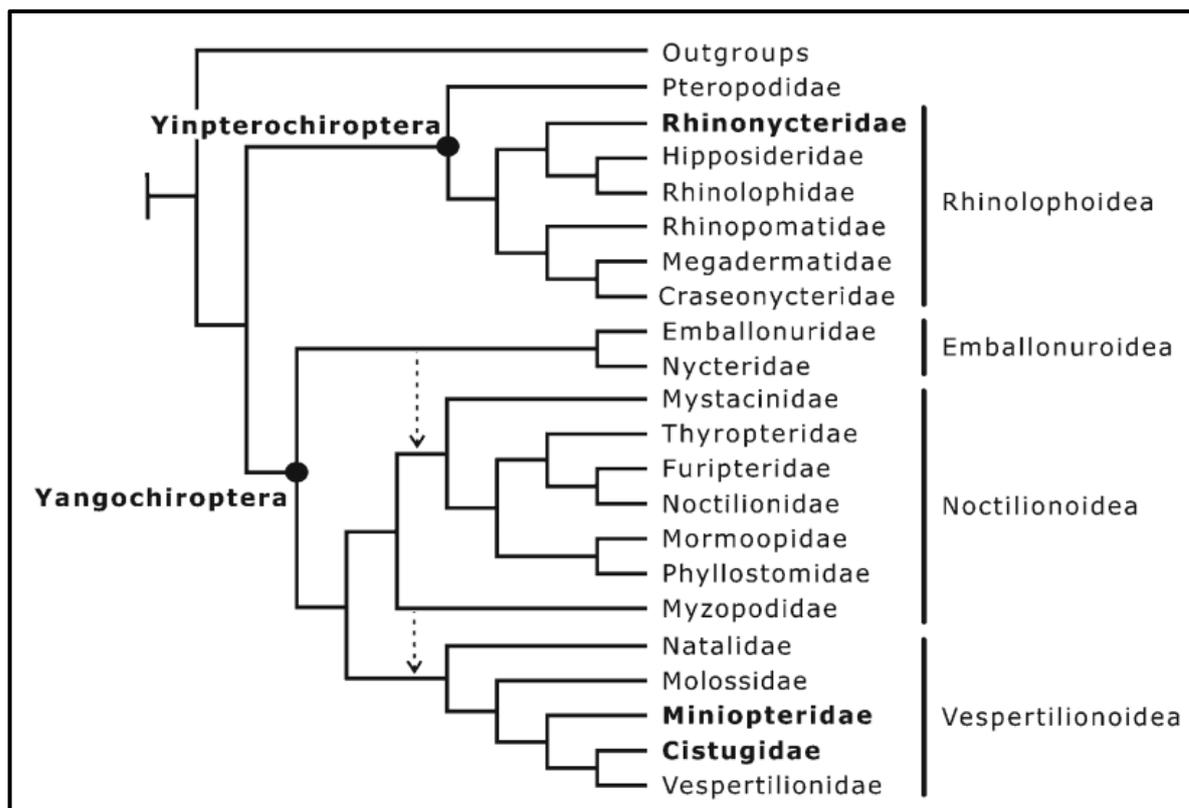


Figura 1: Representação esquemática da hipótese atual, referente às superfamílias e famílias pertencentes às subordens Yinpterochiroptera e Yangochiroptera. Fonte: Amador et al., (2016).

No Brasil, há uma considerável diversidade de morcegos, trata-se do segundo país com maior riqueza de espécies, em todo o mundo. Apesar disso, no território brasileiro há representantes apenas da subordem Yangochiroptera, com ocorrência de 09 famílias: Phyllostomidae (43 gêneros e 92 espécies), Molossidae (08 gêneros e 29 espécies), Vespertilionidae (05 gêneros e 28 espécies), Emballonuridae (07 gêneros e 17 espécies), Thyropteridae (01 gênero e 05 espécies), Mormoopidae (01 gênero e 03 espécies), Noctilionidae (01 gênero e 02 espécies), Furipteridae (01 gênero e 01 espécie) e Natalidae (01 gênero e 01 espécie), totalizando assim 68 gêneros e 178 espécies (NOGUEIRA et al., 2014).

2.2 Importância ecológica desempenhada pelos morcegos

Os morcegos apresentam um papel preponderante na prestação de serviços ecossistêmicos e tal função está relacionada com a ampla variedade de hábitos em

seu comportamento, principalmente, em relação à alimentação. Assim, há espécies frugívoras, insetívoras, piscívoras, carnívoras, onívoros, nectarívoras e hematófagas (BARROS; BISAGGIO; BORGES, 2006; OPREA et al., 2007; KELM; WIESNER; VON HELVERSEN, 2008; KUNZ et al., 2011).

As espécies que se alimentam de frutos têm considerável contribuição na manutenção da diversidade e regeneração das florestas, por meio da dispersão de sementes de diversas plantas de uma área para a outra. Na região Neotropical, por exemplo, esses animais utilizam frutos de, pelo menos, 546 espécies de plantas. Essas sementes podem ser levadas para locais consideravelmente distantes (1 – 2 km) das plantas progenitoras, e nessa trajetória é muito comum que defequem ou cuscam as sementes durante o voo, gerando assim a chuva de sementes e facilitando a dispersão. Também podem utilizar um ou mais poleiros em cada noite, durante o processo de alimentação, onde depositam muitas dessas sementes (MUSCARELLA; FLEMING, 2007; LOBOVA; CULLEN; SCOTT, 2009; BOYLES et al., 2011; BREDT; UIEDA; PEDRO, 2012).

Já as espécies que atuam na visitação de flores, dispersando pólen, contribuem para a manutenção da variabilidade genética de várias plantas. A importância é tamanha que algumas investigações evidenciam que esse processo de polinização realizado pelos quirópteros acontece em mais de 528 espécies de 67 famílias e 28 ordens de angiospermas por todo o planeta. Inclusive, há plantas que só conseguem ser polinizadas por morcegos de determinada espécie (FLEMING; GEISELMAN; KRESS, 2009; KASSO; BALAKRISHNAN, 2013).

Existem também morcegos que atuam como predadores de artrópodes, rãs, peixes, bem como há aquelas espécies que se alimentam de sangue de certos mamíferos e aves. As espécies que se alimentam de artrópodes, por exemplo, contribuem no controle de diversas pragas agrícolas e florestais que têm hábito noturno (LACKI et al., 2007; KUNZ et al., 2011; KASSO; BALAKRISHNAN, 2013).

Além disso, há relatos de que algumas espécies são consideradas como bioindicadores potenciais de áreas que se encontram perturbadas. Assim, uma alteração na quantidade ou na atividade dos quirópteros de uma determinada área pode ser um indicativo de mudanças, por exemplo, no clima, na qualidade da água, na fragmentação de habitats ou na utilização de pesticidas (FENTON et al., 1992; MEDELLÍN; EQUIHUA; AMIN, 2000; JONES et al., 2009).

Esses mamíferos podem contribuir ainda na fertilidade do solo e distribuição de nutrientes por meio do guano (acúmulo de fezes), que tem um grande potencial ecológico, pois pode ser espalhado durante a noite. No guano podem ser encontrados diversos organismos como artrópodes, bactérias, fungos e líquens. Essa diversidade encontrada depende da espécie e do hábito alimentar que apresenta (POLIS; ANDERSON; HOLT, 1997; FERREIRA; MARTINS, 1998).

2.3 Morcegos em ambientes urbanizados

Atualmente, a vegetação original da Mata Atlântica encontra-se extremamente fragmentada, o que é reflexo da expansão de atividades agrícolas, bem como do intenso crescimento populacional que contribuiu na existência de pequenos fragmentos remanescentes cercados por edificações. Assim, o processo de ampliação da área urbana é considerado o segundo vetor que ocasiona maior impacto nesse bioma, o que faz com que um número considerável de espécies, inclusive de morcegos, seja afetado (LIMA, 2008; MACHADO; DRUMMOND; PÁGLIA, 2008).

Desde que muitos habitats naturais dos quirópteros passaram a ser destruídos pela ação antrópica, várias espécies foram se adaptando a conviver de forma mais direta com a população humana em área de perímetro urbano, inclusive no entorno de edificações, já que esses mamíferos possuem elevada capacidade de dispersão (ESTRADA; COATES-ESTRADA, 2001; NUNES; ROCHA; CORDEIRO-ESTRELA, 2017).

Nesses ambientes, diversas espécies costumam ser ecologicamente flexíveis podendo utilizar diferentes tipos de abrigos (forros de telhados de casas e prédios, sótãos, porões, pontes, janelas, tubulações e outros espaços em construções), bem como passam a desenvolver diversas estratégias alimentares, com ingestão de diferentes itens em sua dieta (REIS; LIMA; PERACCHI, 2006; PASSOS; PASSAMANI, 2003; BARROS; BISAGGIO; BORGES, 2006).

Diante disso, a forma e os locais que escolhem e se ajustam para abrigarem-se, influenciam a distribuição e densidade das espécies e suas respectivas populações, assim como afetam também o processo de forrageamento, de

acasalamento e a morfofisiologia reprodutiva dos quirópteros (ALTRINGHAM, 1996; BREDT; UIEDA; MAGALHÃES, 1999; SILVA DE ARAÚJO; BERNARD, 2016).

Em ambientes urbanizados, esses animais conseguem atingir elevada densidade, devido à ausência e/ou diminuição de predadores, bem como de concorrentes potenciais, associado à abundância de recursos alimentares que podem existir nessas áreas. Com isso, são considerados animais sinantrópicos, pois se adaptaram a conviver com o homem. Esse contato próximo com o ser humano e com os seus animais de estimação, traz implicações para a saúde pública e animal, já que os morcegos são indicados como potenciais reservatórios naturais e transmissores de diversas antropozoonoses, dentre as quais a raiva é a mais preocupante (UIEDA et al., 1996; SOUZA, et al., 2005; REIS; LIMA; PERACCHI, 2006; ESBÉRARD et al., 2014).

2.4 Os morcegos e a sua relação com o vírus rábico

A raiva consiste em uma antropozoonose que possui taxa de letalidade de aproximadamente 100%, podendo atingir todos os organismos da classe Mammalia e comprometer o sistema nervoso central destes. Ela é causada por um vírus que faz parte do gênero *Lyssavirus* e família Rhabdoviridae. Possui quatro ciclos epidemiológicos (urbano, rural, aéreo e silvestre), de modo que os morcegos são os responsáveis pelo ciclo aéreo dessa doença. Pode ser transmitida, principalmente, por meio do contato com a saliva de um determinado animal que se encontra infectado, de forma que a introdução do vírus pode acontecer através da mordedura, lambedura e ou arranhadura de tal animal (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009; ANDERSON; SHWIFF, 2015; MOUTINHO et al., 2015).

Entre as diversas espécies de morcegos, *Desmodus rotundus*, que possui hábito alimentar hematófago, é considerado o principal hospedeiro do vírus rábico e, conseqüentemente, o principal transmissor dessa doença em herbívoros, bovinos e também nos seres humanos. Além dessa espécie, duas outras (*Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi*) que também são hematófagas, têm preferência por se alimentarem de sangue de aves, todavia há relatos inclusive de se alimentarem de sangue humano (BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007; SCHNEIDER et al., 2009).

Apesar de durante algum tempo, a maioria das investigações enfatizarem essas três espécies hematófagas como hospedeiras do vírus rábico, o que se tem observado é que as espécies não hematófagas (insetívoras, frugívoras, onívoras, polinívoras e piscívoras) vêm tornando-se portadoras desse vírus inclusive com uma maior frequência. Isso se deve, por exemplo, às diversas interações que realizam com as espécies hematófagas que se encontram contaminadas (SCHEFFER et al., 2007; CARNEIRO et al., 2009).

No território brasileiro, a positividade para o vírus rábico nos organismos da ordem Chiroptera, já engloba mais de 41 espécies que se encontram distribuídas em três famílias (Phyllostomidae – 43,9%, Vespertilionidae – 29,3% e Molossidae – 26,8%). Assim, entre os anos de 2002 a 2009 houve registro de 1.163 casos de quirópteros com esse vírus, de modo que 80% dos morcegos infectados não eram hematófagos (SODRÉ; GAMA; ALMEIDA, 2010; WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011; MOUTINHO et al., 2015).

No estado de Pernambuco, alguns estudos relataram a presença do vírus rábico em algumas espécies de morcegos urbanos. Assim, no Município de Moreno, Albuquerque et al. (2012) identificaram quatro casos, das seguintes espécies e quantidades: *Molossus molossus* (01), *Eptesicus furinalis* (02) e uma espécie não foi identificada. Já no Município de Chã de Alegria, Silva et al. (2014) identificaram o primeiro relato de raiva, para o estado, da espécie *Molossus rufus*.

2.5 Família Phyllostomidae

Dentre os morcegos neotropicais, a família Phyllostomidae consiste na maior e mais diversa com relação à morfologia, ecologia e diversidade de hábitos alimentares das espécies que a compõe, uma vez que possuem importantes funções no ecossistema como, por exemplo, a polinização e a dispersão de sementes. As espécies que fazem parte dela apresentam um apêndice nasal, com formato de folha membranosa, localizada na extremidade do focinho que consiste em uma importante característica, utilizada no processo de identificação de espécies membros dessa família (SIMMONS, 2005; REIS et al., 2007, 2011).

A família Phyllostomidae é dividida em subfamílias. Após diversos estudos e debates, a divisão mais aceita, considera aspectos tanto morfológicos, quanto

genéticos nessa subdivisão. Desse modo, são reconhecidas 11 subfamílias, que são: Carollinae, Desmodontinae, Glossophaginae, Glyphonycterinae, Lonchophyllinae, Lonchorhininae, Macrotinae, Micronycterinae, Phyllostominae, Rhinophyllinae e Stenodermatinae (REIS et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2014; BAKER et al., 2016).

Nessa família, em território brasileiro, há a confirmação da ocorrência de 92 espécies que estão organizadas em 43 gêneros. Entre essas espécies, 63 possuem hábito alimentar do tipo fitófago, das quais 35 são consideradas predominantemente frugívoras (PAGLIA et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2014; BAKER et al., 2016).

2.5.1 Subfamília Phyllostominae – espécie *Phyllostomus discolor*

As espécies que fazem parte da subfamília Phyllostominae possuem extensa diversidade no tamanho corpóreo. Assim, podem ser encontradas espécies menores, com massa de cerca de 10 g, até espécies maiores que chegam a mais de 200 g. Além disso, em alguns gêneros a folha nasal é bastante desenvolvida, com importância na ecolocalização (ZHUANG; MULLER, 2006; REIS et al., 2007, 2011).

No território brasileiro, a subfamília Phyllostominae é composta pelos seguintes gêneros: *Chrotopterus*, *Lophostoma*, *Macrophyllum*, *Mimon*, *Phylloderma*, *Phyllostomus*, *Tonatia*, *Trachops* e *Vampyrum*, nos quais estão distribuídas 17 espécies (NOGUEIRA et al., 2014).

Desses gêneros, quatro espécies fazem parte do gênero *Phyllostomus*, dentre as quais *Phyllostomus discolor* (Wagner, 1843), que apresenta como algumas de suas características gerais: tamanho médio, orelhas pontiagudas, cauda com comprimento curto, ausência de listas faciais, membrana interfemoral grande, presença de almofada em formato de V no lábio inferior limitadas por papilas de morfologia alongada (KWIECINSKI, 2006; NOGUEIRA et al., 2014) (Fig. 2).

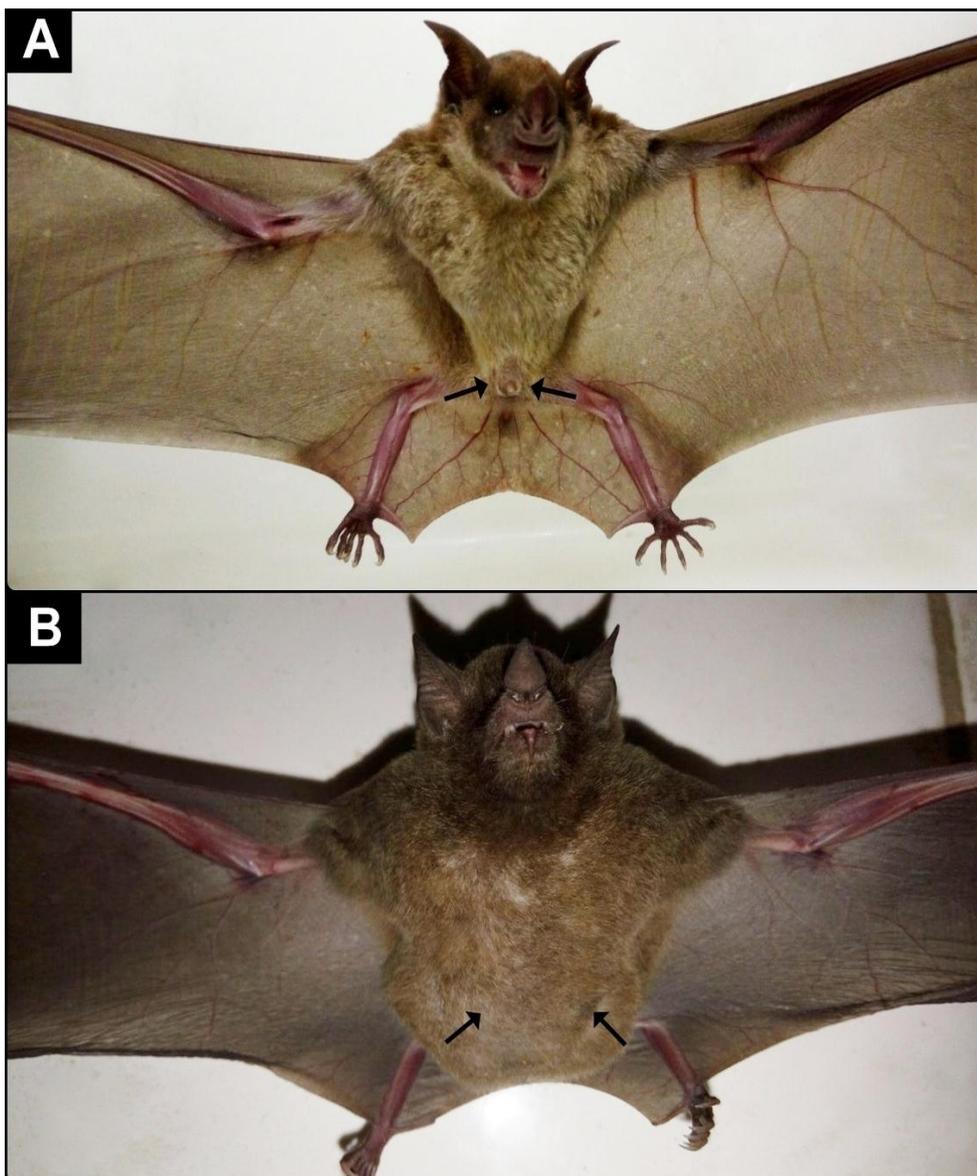


Figura 2: Morcego macho (A) e fêmea grávida (B) da espécie *Phyllostomus discolor* (Wagner, 1843) (Chiroptera: Phyllostomidae – Phyllostominae) coletados no Município de Vitória de Santo Antão - Pernambuco. Região inguinal (setas) onde ficam localizados os testículos (A). Abdômen proeminente (setas) (B) devido à presença do feto. Fonte: Lima Junior, N. B. (Março/2017).

2.5.2 Subfamília Stenodermatinae – espécie *Artibeus planirostris*

No Brasil, a subfamília Stenodermatinae é constituída pelos seguintes gêneros: *Ametrida*, *Artibeus*, *Chiroderma*, *Dermanura*, *Mesophylla*, *Platyrrhinus*,

Pygoderma, *Sphaeronycteris*, *Sturnira*, *Uroderma*, *Vampyressa*, *Vampyriscus* e *Vampyrodes*. Nesses, estão agrupadas 35 espécies (NOGUEIRA et al., 2014).

Entre esses gêneros, cinco espécies fazem parte do *Artibeus*, dentre as quais há *Artibeus planirostris* (Spix, 1823) (Fig. 3) que apresenta hábito alimentar predominantemente frugívoro e, portanto, atua na dispersão de sementes de diferentes espécies de plantas situadas na região Neotropical, o que contribui para a recuperação e regeneração de matas tropicais que se encontram perturbadas (REIS et al., 2007, 2011; OLIVEIRA; LEMES, 2010).

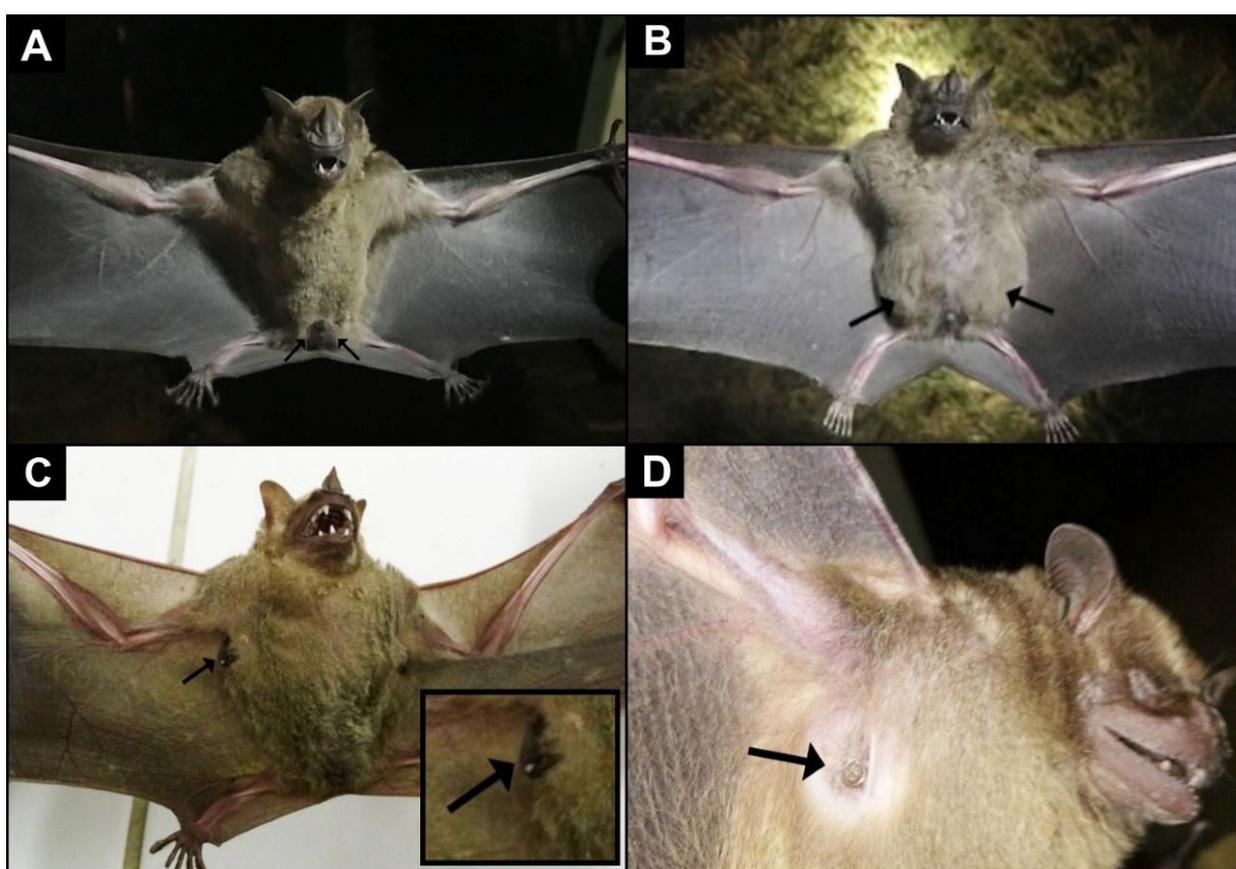


Figura 3: Morcegos macho (A) e fêmeas (B, C e D) da espécie *Artibeus planirostris* (Spix, 1823) (Chiroptera: Phyllostomidae - Stenodermatinae) coletados no Município de Vitória de Santo Antão - Pernambuco. Região inguinal dos machos (A) (setas). Fêmeas: grávida (B) – abdômen proeminente (setas); lactante (C) – com a presença de secreção no mamilo (ponto branco indicado pela seta); e pós-lactante (D) – poucos pelos em volta das mamas (seta). Fonte: Lima Junior, N. B. (Janeiro, Março e Novembro/2017).

2.6 Aspectos da biologia reprodutiva em morcegos

A biologia reprodutiva dos quirópteros possui características comuns a todos os organismos da classe Mammalia, envolvendo os seguintes eventos: corte, acasalamento, período gestacional, parto e lactação. Em relação ao acasalamento, é importante destacar o sistema poligínico que ocorre em diversas espécies de morcegos. Nesse sistema, um macho que é dominante atua defendendo seu harém de outros machos que possam se aproximar e, com isso pode acasalar com várias fêmeas (RACEY, 1982; NOWAK, 1994; ALTRINGHAM, 1996; ZORTÉA, 2003).

Esses mamíferos podem apresentar uma ampla diversidade na quantidade e duração dos seus padrões, estratégias e ciclos reprodutivos. Assim, há espécies que são monoéstricas e outras poliéstricas. Aqueles que habitam zonas temperadas possuem um período reprodutivo anual que acontece na época da primavera. Já os quirópteros tropicais possuem uma variação maior na sua atividade reprodutiva ao longo do ano (BALMORI, 1999; REIS et al., 2011).

Nas espécies de morcegos neotropicais, com base na atividade reprodutiva das fêmeas, podem ser encontrados quatro tipos de padrões: monoestria sazonal (possui somente um pico reprodutivo – gravidez – durante o ano, seguido de um pico de lactação), poliestria sazonal (se reproduz continuamente ao longo da maior parte do ano – possui mais de dois picos de gravidez e lactação –, todavia é acompanhado de um pequeno período de inatividade), poliestria sazonal bimodal (apresenta dois picos reprodutivos, sendo cada um destes seguidos por um pico de lactação, totalizando dois picos ao ano) e poliestria assazonal (possui atividade reprodutiva ao longo de todo o ano, sem distinção de picos de nascimento de filhotes ou de lactação). Apesar de existirem esses quatro padrões na região neotropical, os estudos indicam que a maioria das espécies encontradas nessa região possui um padrão bimodal (FLEMING; HOOPER; WILSON, 1972; TADDEI, 1976; WILLIG, 1985a,1985b; ZORTÉA, 2003).

Além dos padrões reprodutivos, os morcegos podem apresentar estratégias peculiares para ajustar sua reprodução às condições ambientais onde se encontram. Há espécies que hibernam e apresentam os túbulos seminíferos em regressão, indicados pela presença apenas de espermatozônias e de células de Sertoli no epitélio. Todavia, já foi verificada também a ocorrência de regressão testicular, bem

como na posição e morfofisiologia testicular e epididimária de espécies neotropicais que não apresentam período de hibernação. Ademais, diversas espécies desenvolveram estratégias únicas como prolongar o tempo de armazenamento dos espermatozoides viáveis na região da cauda do epidídimo, nos machos, e também nos cornos uterinos, nas fêmeas; apresentar ausência de sincronia entre a espermatogênese e o período de acasalamento, assim como um retardo no processo de ovulação, implantação e desenvolvimento embrionário (ALTRINGHAM, 1996; CRICHTON; KRUTZSCH, 2000; ENCARNAÇÃO et al., 2003; LEE; MORI, 2004; BEGUELINI; TABOGA; MORIELLE-VERSUTE, 2012; ARAÚJO et al., 2013; MARTINS et al., 2015).

A definição desses padrões e outras estratégias reprodutivas desempenhadas pelos morcegos são influenciadas pelos fatores abióticos (temperatura, precipitação, umidade e latitude) e bióticos que atuam na regulação do ciclo reprodutivo. As espécies neotropicais possuem uma forte associação com a estação chuvosa, uma vez que a elevação dos índices pluviométricos favorece a disponibilidade alimentar, importante para fornecer energia tanto para o processo reprodutivo em si, como para garantir a manutenção da prole. Desse modo, muitas espécies fazem um ajuste dos períodos de espermiogênese, oogênese, copulação e fertilização com as estações do ano (FLEMING; HOOPER; WILSON, 1972; RACEY et al., 1982; BALMORI, 1999; CRICHTON; KRUTZSCH, 2000; ZORTÉA, 2003).

Os órgãos que fazem parte do sistema reprodutor dos quirópteros possuem estruturas, anatômica e histológica, semelhantes ao que já se tem relatado para os demais mamíferos. Os machos possuem dois testículos, ductos eferentes, ductos deferentes, ducto ejaculatório, uretra, dois epidídimos, glândulas reprodutivas acessórias (GRAs) e um órgão copulador (BALMORI, 1999; CRICHTON; KRUTZSCH, 2000). As GRAs apresentam uma ampla variação, de forma que algumas podem estar presentes e outras ausentes a depender da espécie considerada (PUGA et al., 2013; MARTINS et al., 2015, 2016; BEGUELINI et al., 2016; SANTOS et al., 2017). Nas fêmeas, o seu sistema reprodutivo é constituído por ovários, ovidutos, útero e vagina. É importante enfatizar que o útero é bastante variável nas diversas espécies. Com isso, pode haver espécies com útero simples, duplo, bipartido ou bicorne (BALMORI, 1999).

O tempo de gestação nos morcegos é bastante variável e vai depender da espécie que se esteja considerando. Essas variações têm relações também com o tamanho corpóreo, hábito alimentar e localidade em que se encontra inserida. Assim, por exemplo, as espécies que possuem hábito alimentar do tipo fitófago, apresentam período de gestação de três a cinco meses; nas espécies insetívoras fica entre dois e três meses; e o das espécies hematófagas é o que tem maior duração, em torno de sete meses. Nas espécies tropicais de pequeno porte, o período gestacional tem duração de três meses, já nas de grande porte tem duração de até oito meses. Em geral, as fêmeas parem apenas um filhote ao fim de cada gestação. Todavia, espécies do gênero *Lasiurus* (família Vespertilionidae) podem ter de dois até cinco filhotes em cada gestação (BREDT; SILVA, 1998; BALMORI, 1999; PERACCHI et al., 2006; REIS et al., 2007).

2.7 Características morfológicas e funções dos testículos

Os testículos são gônadas masculinas pares que se encontram na região escrotal e apresentam funções endócrina e exócrina. Externamente, esses órgãos são revestidos pelo escroto que atua mantendo a temperatura adequada (mais baixa que a do corpo), o que é importante para a produção e viabilidade dos espermatozoides. Os testículos estão envoltos pela túnica albugínea que é composta de tecido conjuntivo. Essa túnica emite septos que vão à direção do interior do testículo alcançando até a região do mediastino de tal órgão (RUSSELL et al., 1990; SCANLON; SANDERS, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Esses órgãos são formados pelo compartimento tubular e intertubular. O compartimento tubular compõe a maior parte dos testículos. É constituído pelos túbulos seminíferos, que são alças bastante contorcidas e que se ligam por meio de suas extremidades à rede testicular, que está situada na região do mediastino do testículo. Tal rede se conecta ao epidídimo através dos ductos eferentes. Nos túbulos seminíferos, na parte mais externa, estão a túnica própria, as células do tipo peritubulares ou mioídes e a membrana basal; enquanto na parte mais interna, encontra-se o epitélio seminífero, no qual podem ser encontradas as células germinativas em diferentes estágios de maturação e as células de Sertoli. Na parte central desses túbulos encontra-se o lúmen, em que pode haver a presença de

espermatozoides e de fluido liberado pelas células de Sertoli. Por outro lado, o compartimento intertubular situa-se entre esses túbulos e nele podem ser encontradas as células de Leydig, os vasos sanguíneos e linfáticos, os nervos e outros tipos de células do tecido conjuntivo, principalmente, macrófagos, mastócitos e fibroblastos (Fig. 4) (RUSSEL et al., 1990; KARL; CAPEL, 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

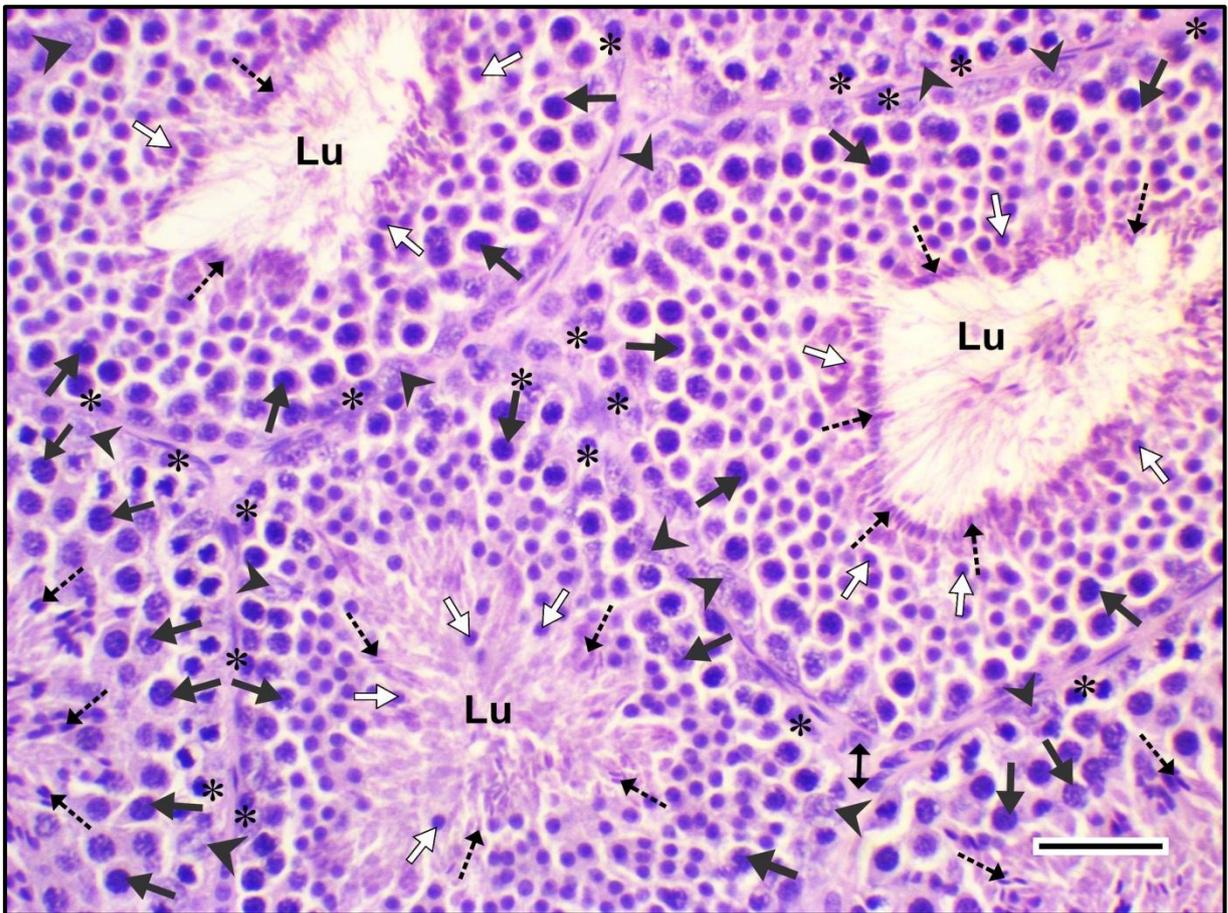


Figura 4: Histologia geral do testículo de morcego (*Artibeus planirostris*). Nos túbulos seminíferos (compartimento tubular) há células de Sertoli (cabeça de seta) e da linhagem espermatogênica em diferentes estágios de maturação – espermatogônias (asteriscos), espermatócitos (setas pretas), espermatídes arredondadas (setas brancas) e espermatídes alongadas (setas pontilhadas). No lúmen (Lu) desses túbulos encontram-se os espermatozoides. Entre os túbulos seminíferos (compartimento intertubular), além de outros componentes, há células de Leydig (seta de duas cabeças). Coloração: Hematoxilina – Eosina. Barra de escala = 30 μ m. Fonte: Lima Junior, N. B. (Abril /2017).

2.7.1 Morfologia e função das células de Sertoli

As células de Sertoli apresentam-se em formato colunar com amplos prolongamentos tanto apicais, quanto laterais que envolvem as células da linhagem espermatogênica que se encontram próximas no epitélio dos túbulos seminíferos. Essas células de sustentação têm como função fornecer suporte para as células dessa linhagem germinativa. Essas células dividem o epitélio seminífero em dois ambientes: sendo um basal e o outro adluminal. No primeiro, podem ser encontradas espermatogônias e espermatócitos primários no início da prófase meiótica. Enquanto no segundo, há espermatócitos primários na fase de leptóteno, bem como espermatócitos secundários e espermatídes (RUSSEL et al., 1990; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

2.7.2 Processo de espermatogênese

De maneira geral, a espermatogênese consiste em um processo complexo em que as espermatogônias, após passarem por uma série de eventos e diferenciações, desenvolvem-se em espermatozoides. É composto distintamente por três fases: espermatogônica (mitótica), espermatocítica (meiose) e espermatídica (espermiogênese) (HESS; FRANÇA, 2008; ROSS; PAWLINA, 2008).

Na fase espermatogônica (mitótica), ocorrem diversas divisões das células-tronco das espermatogônias que por sua vez darão origem a outras células, bem como sofrerão divisões para formar outros tipos de espermatogônias. As células-filhas resultantes podem manter-se como células-tronco de outros tipos de espermatogônias (do tipo A) ou passam por ciclos de divisões mitóticas para dar origem às espermatogônias do tipo B. Dessa forma, há três tipos de espermatogônias: do tipo A escura – Ad (originarão um par de espermatogônias do próprio tipo Ad que permanecerão como células-troncos, ou podem dar também origem a duas espermatogônias do tipo A pálida); do tipo A pálida – Ap (irão passar por diversas divisões seguidas para elevar seu quantitativo) e do tipo B (passam por divisões mitóticas e no final irão dar origem aos espermatócitos primários) (FRANÇA; RUSSELL, 1998; ROSS; PAWLINA, 2008).

Já na fase espermatocítica (meiose), os espermatócitos primários irão passar por duas divisões meióticas para diminuir a quantidade de cromossomos. As células que irão resultar da primeira divisão meiótica são chamadas de espermatócitos secundários. No final da segunda divisão meiótica, ocorre a formação de duas espermátides haploides a partir de cada espermatócito secundário (RUSSELL et al., 1990; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Por fim, na fase espermatídica (espermio gênese), que consiste na fase de maior duração da espermatogênese, as espermátides arredondadas haploides passam por um processo de diferenciação e remodelamento celular transformam-se em espermatozoides maduros haploides com formato alongado. Esse remodelamento é extenso e envolve as fases de golgi, de capuz, acrossômica e de maturação. Após as espermátides terem sido diferenciadas em espermatozoides, estes irão para o lúmen dos túbulos seminíferos e, conseqüentemente, serão direcionados ao epidídimo (HESS; FRANÇA, 2008; ROSS; PAWLINA, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

2.7.3 Morfologia e função das células de Leydig

As células de Leydig, também conhecidas como células intersticiais, apresentam-se grandes e com formato poligonal. É o tipo celular mais abundante no compartimento intertubular. São produtoras de andrógenos, dentre os quais a dihidrotestosterona (cujas função é a diferenciação do trato genital masculino) e a testosterona (hormônio atuante na masculinização do feto, responsável pelas características sexuais secundárias, assim como na descida das gônadas masculinas da cavidade abdominal à região escrotal no período fetal). A testosterona também atua na manutenção da espermatogênese e influencia a atividade sexual na vida adulta (GILBERT, 2006; ROSS; PAWLINA, 2008; YE; SU; GE, 2011).

2.8 Características morfológicas e funções dos epidídimos

Os epidídimos são órgãos responsáveis pelo transporte, armazenamento e maturação dos espermatozoides. Cada epidídimo é composto por um túbulo bastante enrolado que funciona como elo entre o testículo e o canal deferente. Seu epitélio é do tipo pseudoestratificado cilíndrico com estereocílios. Esse órgão possui regiões que se organizam conforme as características do seu epitélio, de modo que o número dessas regiões varia dependendo da espécie. A classificação proposta mais enfatizada em mamíferos é de quatro regiões (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda), mas pode haver espécies apenas com três (cabeça, corpo e cauda) ou até com um número maior e variado de subdivisões dessas regiões (Fig. 5) (SERRE; ROBAIRE, 1998; TURNER et al., 2007; BEU; ORSI; DOMENICONI, 2009).

A região do segmento inicial é limitada pela parte terminal do ducto eferente e começo da cabeça, enquanto que esta é curta e encontra-se localizada entre o segmento inicial e o corpo. Este é alongado e estreito e situa-se entre a cabeça e a cauda, a qual consiste na parte mais distal e dilatada do epidídimo. No epitélio de cada uma dessas regiões, é possível encontrar diferentes células com funções específicas, de forma que a quantidade e os tipos destas variam dependendo da região considerada. Assim, destacam-se seis tipos de células: principais, basais, estreitas, claras, halo e apicais (Fig. 5) (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN, 2006; ROBAIRE; HINTON, 2015).

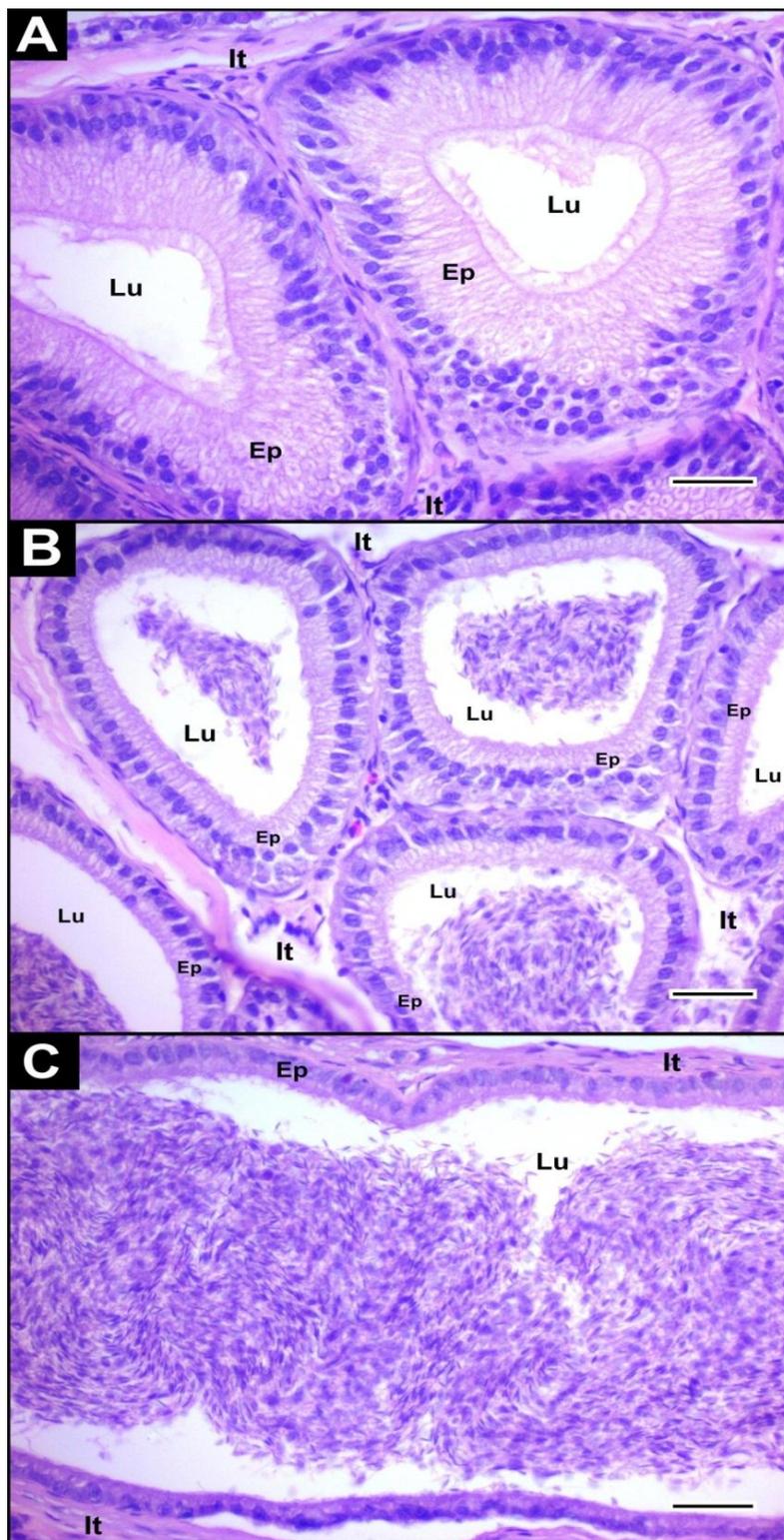


Figura 5: Histologia geral das regiões do epidídimo (Cabeça – A, Corpo – B e Cauda – C) de morcego (*Phyllostomus discolor*). Epitélio (Ep), Lúmen (Lu) e Interstício (It). Coloração: Hematoxilina – Eosina. Barra de escala = 30 μ m. Fonte: Lima Junior, N. B. (Novembro /2016).

As células principais têm forma colunar e estendem-se desde a membrana basal do ducto epididimário até o lúmen; apresentam função de secreção e absorção, e consistem no tipo celular mais abundante. As células basais são consideradas o segundo tipo celular mais numeroso, têm núcleo com formato alongado, estão localizadas na parte basal do epitélio e possuem função de proteção, podendo ser encontradas em todas as regiões. As células estreitas estão presentes no segmento inicial e região próxima à cabeça; possuem núcleo pequeno e alongado, e atuam na destruição de proteínas endocitadas e no controle do pH do lúmen. As células claras possuem núcleo situado na base da célula; são encontradas em todas as regiões – com exceção do segmento inicial – embora sejam encontradas frequentemente na cauda. Atuam captando componentes do lúmen, do conteúdo destacado dos espermatozoides e no controle do pH do lúmen. As células halo podem ser encontradas em todas as regiões; possuem núcleo pequeno e redondo, com amplo citoplasma, e atuam na barreira imunológica. Já as células apicais têm núcleo com morfologia variável de oval a esférica; estão situadas na parte mediana do epitélio ou extremidade apical, produzem enzimas proteolíticas, protegem os espermatozoides contra o ataque eletrofílico e são encontradas predominantemente no segmento inicial e cabeça (VERI; HERMO; ROBAIRE, 1993; YEUNG; COOPER, 1994; SERRE; ROBAIRE, 1998; ROBAIRE; HINTON, 2015).

2.9 Morfofisiologia testicular e epididimária de morcegos no Brasil

No Brasil, foram realizadas algumas investigações morfofisiológicas dos testículos e epidídimos das espécies da ordem Chiroptera, porém ainda há muitas incongruências, tendo em vista a grande diversidade de espécies existentes no território brasileiro e a diversidade de padrões e estratégias reprodutivas que uma mesma espécie pode apresentar a depender da sua área de ocorrência (FABIÁN; MARQUES, 1989, BEGUELINI et al., 2015; MORAIS et al. 2017; FERREIRA et al., 2018).

Na região noroeste do estado de São Paulo, Beguelini et al. (2009) caracterizaram a espermatogênese de seis espécies de morcegos neotropicais coletadas em área urbana, cinco da família Phyllostomidae (*Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Platyrrhinus lineatus* e *Sturnira lilium*) e

uma da família Vespertilionidae (*Myotis nigricans*). Nessas espécies, o ciclo do epitélio seminífero (CES) foi organizado em oito estágios e foram identificados três tipos de espermatogônias: duas do tipo A (uma escura e outra pálida) e uma do tipo B. Além disso, o desenvolvimento das espermátides foi dividido em sete etapas. Constataram-se diferenças entre o CES nas espécies da família Phyllostomidae em comparação ao da espécie *M. nigricans*. Nesta, notou-se uma assincronia, destacada por estágios sobrepostos com ciclos imprecisos, diferentemente das demais espécies que demonstraram estágios graduais semelhantes ao que se tem descrito para os demais mamíferos.

Nessa mesma região, as características morfológicas e morfométricas do epidídimo das espécies *Eumops glaucinus* e *Molossus molossus*, foram investigadas por Beguelini et al., (2010). Em ambas as espécies, verificou-se que o epidídimo possui quatro regiões (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda) e tanto em *E. glaucinus* quanto em *M. molossus*, foram encontrados predominantemente três tipos de células (principais, basais e apicais) no epitélio desse órgão, mas também outros dois tipos (células halo e claras) foram observados ainda que em menor quantidade. As células principais foram o tipo celular mais abundante, seguido das células basais e apicais. Os espermatozoides foram constatados em maior quantidade nas regiões do corpo e cauda. Nas duas espécies, notou-se que os diâmetros do túbulo, do lúmen e do percentual do interstício, apresentaram diferença significativa nos quatro segmentos considerados. O epitélio foi mais alto no segmento inicial e diminuiu à medida que se direcionava para a região caudal.

Ainda no estado de São Paulo, o processo de espermatogênese da espécie *Platyrrhinus lineatus* foi caracterizado ultraestruturalmente, de modo que três tipos de espermatogônias (escura A, pálida A e tipo B) foram identificadas, bem como a diferenciação das espermátides em 12 etapas. A espermatogênese dessa espécie é semelhante ao padrão já descrito para outros mamíferos e a morfologia dos espermatozoides de *P. lineatus* apresenta relações estreitas com os espermatozoides de seres humanos e de outros primatas (BEGUELINI et al., 2011).

Dentro desse mesmo contexto, Beguelini et al., (2013a) analisaram os testículos e epidídimos de 18 espécies, pertencentes a cinco famílias (*Peropteryx macrotis* e *Rhynchonycteris naso*; Molossidae – *Eumops glaucinus*, *Molossops temminckii*, *Molossus molossus* e *Molossus rufus*; Phyllostomidae – *A. lituratus*, *A.*

planirostris, *C. perspicillata*, *Glossophaga soricina*, *Phyllostomus discolor* e *P. lineatus*; Noctilionidae – *Noctilio albiventris*; e Vespertilionidae – *Eptesicus furinalis*, *Histiotus velatus*, *Lasiurus blossevillii*, *Myotis albescens* e *M. nigricans*), capturadas na região noroeste do estado de São Paulo e na região central do estado de Goiás. Os testículos dessas espécies apresentaram mínimas variações; contudo, os epidídimos das espécies das famílias Emballonuridae e Vespertilionidae, mostraram-se com a região caudal bastante alongada. Referente ao posicionamento dessas gônadas, as espécies das famílias Phyllostomidae e Noctilionidae apresentavam testículos situados mais externamente; Emballonuridae e Molossidae possuíam testículos que migravam entre posições intra-abdominal e externas; enquanto que os testículos das espécies da família Vespertilionidae estavam localizados na região mais escrotal. Histologicamente, foi constatado um padrão em todas as espécies da família Vespertilionidae, nas quais verificou-se a regressão dos túbulos seminíferos, bem como armazenamento de espermatozóides na região caudal do epidídimo. De maneira similar, foi constatada também regressão dos testículos na espécie *M. temminckii* da família Molossidae, contudo nesta não houve retenção de espermatozóides no epidídimo.

A espermatogênese e os espermatozóides da espécie *Carollia perspicillata*, capturadas também na região noroeste do estado de São Paulo, foi caracterizada ultraestruturalmente, de modo que verificou-se a presença de três tipos de espermatogônias (escura A, pálida A e tipo B) e sua espermiogênese foi dividida em 12 etapas. Os espermatozóides dessa espécie possuem ultraestrutura semelhante a de outros quirópteros e possui semelhança com a espermatogênese da espécie *P. lineatus* que também faz parte da família Phyllostomidae. Contudo, algumas características apresentadas por *C. perspicillata* estão mais próximas de espécies de famílias diferentes e, portanto, distante filogeneticamente como é o caso de *Myotis nigricans* que faz parte da família Vespertilionidae (BEGUENINI et al., 2013e).

Ainda em São Paulo, as mudanças sazonais ocorridas na morfologia do testículo e epidídimo de *Myotis nigricans* foram investigadas em bioma de Cerrado. Essa espécie apresentou dois picos na sua atividade espermatogênica, em que cada um desses picos foi seguido por um pico de regressão, totalizando dois picos de regressão testicular total durante o mesmo ciclo de reprodução anual. Essa regressão foi caracterizada por seu epitélio seminífero ter apresentado apenas

espermatogônias e células de Sertoli. A funcionalidade do testículo apresentou sincronização com as regiões da cabeça e corpo do epidídimo, porém não com a cauda (BEGUELINI et al., 2013c).

ciclo reprodutivo de *M. nigricans* também foi avaliado ultraestruturalmente, no estado de São Paulo. O processo de regressão dos testículos dessa espécie foi dividido em quatro períodos: ativo, regredindo, regredido e em recrudescência. No período ativo, ocorreu espermatogênese completa com três tipos principais de espermatogônias (escura A, pálida A e tipo B) e 12 etapas de diferenciação das espermátides. Esses tipos de espermatogônias passam por alterações na sua morfologia no período em que está regredindo para o regredido, enquanto que no período de recrudescência, retomam a sua forma básica para reativar a espermatogênese (BEGUELINI et al., 2013d). Outro estudo (BEGUELINI et al., 2015), nessa mesma localidade, demonstrou atividade contínua do epidídimo de *M. nigricans*, assim como um retrocesso na morfofisiologia desse órgão. A regressão total, bem como a recrudescência posterior, ocorrida nos testículos de *M. nigricans*, também interferem na fisiologia do epidídimo, porém com atraso na sua resposta. As células epiteliais são reguladas por hormônios (testosterona e estrogênio), mediante a ativação e desativação dos receptores de andrógeno e estrógeno.

Além dos estudos realizados no estado de São Paulo, recentemente, as implicações da condição corporal e sazonalidade nos parâmetros morfofisiológicos dos testículos de *M. nigricans* foram verificados no estado de Minas Gerais, durante as estações seca e chuvosa. Os resultados indicaram que o índice tubulosomático médio anual dessa espécie foi de 0,58%, enquanto que a porcentagem dos túbulos seminíferos nos testículos foi de 88,96%, de modo que foram os maiores já registrados para os indivíduos da ordem Chiroptera. A proporção de células de Leydig, bem como o volume do citoplasma destas, apresentou-se mais elevada na estação de chuva, em comparação à seca. Já em relação ao percentual do núcleo e ao quantitativo total dessas células intersticiais, verificou-se que foi maior na estação seca. Desse modo, uma maior atividade androgênica de *M. nigricans* foi evidenciada durante a estação chuvosa, o que está relacionado aos níveis elevados do hormônio testosterona (FERREIRA et al., 2018).

Dentro dessa perspectiva, a organização e a quantificação dos componentes do compartimento intertubular dos testículos de *Molossus molossus*, foram

comparados em diferentes estações climáticas em bioma de Mata Atlântica. Esse compartimento é constituído predominante por células de Leydig e os percentuais ocupados pelo compartimento intertubular e por essas células nos testículos foram mais elevados durante o período do verão. Os demais componentes do intertúbulo não apresentaram diferenças entre as estações e havia células de Leydig multinucleadas ao longo do período de chuvas. Com isso, ocorreu um aumento na atividade esteroidogênica de *M. molossus* ao longo do verão, confirmando a influência dos fatores ambientais no processo reprodutivo dessa espécie (MORAIS et al., 2013a).

Morais et al. (2013c) também avaliaram a histomorfometria do compartimento tubular de *M. molossus* entre as estações nessa mesma área de estudo. No verão, houve os menores índices gonadossomático e tubulosomático, bem como de diâmetro tubular. Houve um maior rendimento da espermatogênese no inverno, enquanto que um menor índice de células de Sertoli foi verificado no verão em comparação ao outono, porém o número de células de Sertoli não variou entre as estações. A maior reserva de espermatozoides ocorreu nas estações do outono e inverno, indicando que *M. molossus* apresentou reprodução com ciclo contínuo, com maior atividade espermática ao longo das estações do outono e inverno.

As reservas energéticas, associadas ao ciclo reprodutivo, de *M. molossus* foram investigadas durante as quatro estações anuais também em Minas Gerais. Na estação do inverno, as concentrações de glicogênio no fígado e músculo peitoral foram menores, enquanto que o índice de tecido adiposo foi maior no outono. Houve um maior investimento em produção espermática ao longo das estações do outono e inverno, indicado pela presença de maiores diâmetros dos túbulos seminíferos nessas épocas, enquanto que as células de Leydig demonstraram um maior percentual durante o verão. Desse modo, *M. molossus* apresentou dois picos reprodutivos: um no outono (relacionado mais a espermatogênese) e outro no verão (relacionado mais a esteroidogênese), o que indica uma associação entre o seu padrão metabólico com a sua reprodução (BARROS et al., 2013).

As etapas do ciclo do epitélio seminífero (CES) da espécie *Sturnira liliium* foram caracterizadas, durante as estações seca e chuvosa, em bioma de Mata Atlântica também nesse mesmo estado. O CES é composto por oito estágios, mantendo o padrão do que já se tem relatado para outros mamíferos. O estágio 1 foi

o mais frequente, enquanto que o menos frequente foi o estágio 7. A duração de cada CES ocorreu em 3,45 dias, de forma que foram precisos 15,52 dias para o desenvolvimento dos espermatozoides a partir das espermatogônias (MORAIS et al., 2013b). As células de Leydig foram o principal componente encontrado no compartimento intertubular, e o citoplasma desse tipo celular contém gotas lipídicas dispostas de maneira abundante. A proporção e o volume de cada componente intertubular, entre as duas estações, assim como a concentração de testosterona, o número total das células de Leydig e o Índice Leydigossomático. *S. liliium*, apresentou as maiores médias de reservas espermiáticas e na produção diária de espermatozoides durante a estação chuvosa. Dessa forma, *S. liliium* apresentou um ciclo de reprodução contínuo, com elevado rendimento em sua espermatogênese (MORAIS et al., 2014a).

Ainda no estado de Minas Gerais, a espécie *Desmodus rotundus* apresentou investimento mais elevado no tecido gonadal (índice gonadossomático), bem como nos túbulos seminíferos (índice tubulosomático) em comparação com os mamíferos de maior porte. Também foi constatado alto comprimento nos túbulos e que, cerca da metade do compartimento intertubular, é composto por células de Leydig. A espermatogênese dessa espécie possui duração de aproximadamente 37,02 dias, o que evidencia elevada produção de espermatozoides. Assim, *D. rotundus* apresentou atividade testicular padrão e semelhante ao que já se tem descrito para outros indivíduos da classe Mammalia, inclusive de outras espécies de quirópteros (MORAIS et al., 2017). Em um estudo realizado com o epidídimo de *D. rotundus*, o epitélio do ducto apresentou diminuição progressiva na sua altura, da região do segmento inicial em direção à cauda. Cada tipo celular apresentou morfologia igual em todo o ducto desse órgão e dentre os tipos celulares encontrados, as células principais foram as mais abundantes, seguidas pelas basais e claras. Proporcionalmente, as células principais e basais apresentaram-se em maior quantidade na região da cauda, e não houve aumento de células claras nessa região (CASTRO et al., 2017).

O padrão reprodutivo de *D. rotundus* não apresentou mudanças entre as estações seca e chuvosa em área de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais. Assim, os testículos apresentaram um aumento no diâmetro tubular e na altura do epitélio dos túbulos seminíferos durante a estação chuvosa. Nos epidídimos, a

quantidade de espermatozoides presentes nas regiões da cabeça e corpo foi maior na estação chuvosa, sendo reduzida na região da cauda durante essa estação. As células de Leydig apresentaram tanto o volume, quanto o número constante nas duas estações. E também não houve mudanças em relação aos níveis de testosterona, produção diária de espermatozoides e índice apoptótico (SOUZA et al., 2018).

A espécie *Myotis levis* apresentou reprodução sazonal com características semelhantes à de outras espécies da família Vespertilionidae em área montanhosa de transição entre a Mata Atlântica e o Cerrado de Minas Gerais. Ao longo de toda a estação chuvosa, os machos apresentaram testículos com características de repouso e maturação. Naqueles que se encontrava em repouso, não foi verificado espermatogênese e nos ductos dos epidídimos não foi constatada a presença de espermatozoides. Já os espécimes que estavam em fase de maturação, haviam iniciado a espermatogênese com poucos espermatozoides nos ductos dos epidídimos. A presença de espécimes maduros com atividade espermatogênica completa e espermatozoides no epidídimo foi constatada no final da estação chuvosa (ARAÚJO et al., 2013).

Em outro estudo realizado com *M. levis* nessa mesma área, os resultados morfométricos indicaram que não houve diferenças da massa corporal e diâmetro nuclear das células de Leydig entre as estações. Enquanto que os parâmetros diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero e as quatro etapas (repouso, amadurecimento, maduro e regredido) da reprodução anual do ciclo, apresentaram diferenças. Na estação chuvosa, a maioria dos animais encontrava-se na etapa de amadurecimento, enquanto que, na estação seca, a maior parte estava em repouso. *M. levis* apresentou produção de espermatozoides sazonal com armazenamento dessas células no epidídimo ao longo da estação seca (FARIAS et al., 2014).

A maioria dos indivíduos machos de *Artibeus lituratus* em bioma de Mata Atlântica de Minas Gerais apresentaram grandes testículos na região escrotal, de forma que se encontravam férteis ao longo de todo o ano (DUARTE; TALAMONI, 2010). Em outra investigação, para essa mesma espécie e no mesmo bioma e estado, não houve diferenças na massa testicular e do epidídimo, bem como no índice gonadossomático, diâmetro do túbulo seminífero e do núcleo da célula de

Leydig, entre as estações chuvosa e seca. Verificou-se também a presença de espermatozoides na cauda do epidídimo dos espécimes analisados, e em relação à frequência relativa dos oito estágios do ciclo do epitélio seminífero, não houve diferenças significativas entre as duas estações, o que indica que *A. lituratus* apresentou atividade espermatogênica contínua ao longo do ciclo reprodutivo anual (NOTINI et al., 2015).

Na reprodução de *A. lituratus*, coletada em perímetro urbano do estado de Minas Gerais, os ductos eferentes e epidídimos apresentaram baixas taxas na proliferação celular e apoptose, durante o período reprodutivo. Por outro lado, ao longo do período regressivo a taxa de células apoptóticas e proliferativas foi elevada no revestimento epitelial dos ductos eferentes e também no epidídimo. Ao que tudo indica, essa elevação na atividade de proliferação possui relação com a expressão do receptor alfa de estrogênio, enquanto que a variação na apoptose possui relação com a expressão de receptores estrogênicos e androgênicos. Essas evidências revelaram que a proliferação celular e a apoptose são moduladas de maneiras diferentes em ambos os órgãos de *A. lituratus* ao longo de sua reprodução anual (CAMPOLINA-SILVA; HESS; OLIVEIRA, 2018).

As investigações sobre os parâmetros morfométricos testiculares de *Anoura geoffroyi*, em Minas Gerais, indicaram que apesar dessa espécie ter apresentado atividade espermática contínua ao longo do ano, os parâmetros avaliados apresentaram valores maiores ao longo da estação chuvosa. Assim, em associação com a atividade das fêmeas, constatou-se que o padrão reprodutivo dessa espécie foi caracterizado pela monoestria sazonal, de forma que os principais eventos reprodutivos ocorreram durante a estação chuvosa (FARIAS; TALAMONI; GODINHO, 2018).

Na região Sul, estado do Paraná, Bordignon; França (2012) estudaram o padrão reprodutivo da espécie *Noctilio leporinus* coletados em vegetação de Mata Atlântica. Os resultados demonstraram que o diâmetro dos túbulos seminíferos se elevou de forma proporcional à massa corporal e dos testículos. Além de que, houve a ocorrência de espécimes machos com maturidade sexual durante todo o ano.

Na região Nordeste, poucos estudos foram realizados com abordagens morfofisiológicas dos testículos e epidídimos de espécies da ordem Chiroptera, de forma que a maioria das investigações é encontrada no estado de Pernambuco.

Assim, o estágio reprodutivo, a histologia e a morfometria dos testículos de *Dermanura cinerea* foram analisados durante os meses secos e chuvosos em área de Mata Atlântica do litoral sul desse estado. Essa espécie apresentou uma maior produção espermática ao longo de meses de baixos índices pluviométricos e, maior produção de hormônio em meses de elevados índices pluviométricos. Esses achados relacionam-se com o padrão reprodutivo das fêmeas dessa mesma espécie, bem como com o aumento da pluviosidade que medeia à disponibilidade de alimentos (LIMA JUNIOR et al., 2018b).

Na mesma área de estudo supracitada, a espécie *Carollia perspicillata* apresentou as maiores médias dos parâmetros histomorfométricos avaliados nos testículos (área dos túbulos seminíferos e compartimento intertubular, número das células espermatogênica e das células de Leydig), durante a estação chuvosa. Isso indica uma sincronia entre a produção hormonal e o pico de espermatogênese. Além disso, houve uma relação com a abundância de alimentos disponíveis durante tal estação, já que o processo reprodutivo envolve um elevado gasto energético (ARANDAS et al., 2019).

2.9.1 Morfofisiologia testicular e epididimária em *Phyllostomus discolor* e *Artibeus planirostris* no Brasil

No território brasileiro, poucas investigações abordam acerca da morfofisiologia reprodutiva dos testículos e epidídimos das espécies *Phyllostomus discolor* e *Artibeus planirostris*. Ademais, os estudos que relacionam as variações sazonais ao longo do ciclo reprodutivo anual, nessas espécies, em diferentes áreas e biomas do país, são limitados.

Na região noroeste do estado de São Paulo, foi constatado que *A. planirostris* possui o ciclo do epitélio seminífero organizado em oito estágios, de modo que três tipos de espermatogônias foram identificados: duas do tipo A (uma escura e outra pálida) e uma do tipo B. Verificou-se também que, no que diz respeito ao desenvolvimento das espermátides, estas foram divididas em sete etapas (BEGUELINI et al., 2009).

Além disso, os testículos e epidídimos das espécies *P. discolor* e *A. planirostris*, capturadas na mesma região acima mencionada, foram analisados

anatômica e histologicamente, de forma que exibiram variações morfológicas mínimas, em que o posicionamento das gônadas em ambas as espécies apresentaram-se situados mais externamente na região do escroto. Por meio da histologia, verificou-se um padrão na organização dos testículos e epidídimos das duas espécies, com notório armazenamento de espermatozoides na cauda do epidídimo e ausência de latência reprodutiva (testículos regredidos) (BEGUELINI et al., 2013a).

Ainda em São Paulo, *A. planirostris* apresentou sua espermatogênese com características contínua e ativa durante todo o ano, já que foi verificada a presença de espermatozoides na cauda do epidídimo durante todos os meses considerados do ciclo reprodutivo, todavia dois picos foram mais evidentes, entre os meses de setembro e fevereiro, na produção espermática (BEGUELINI et al., 2013b).

No estado de Pernambuco, em fragmentos de Mata Atlântica do litoral sul desse estado, foi constatado por meio da histomorfometria testicular, que a espécie *P. discolor* possui uma maior atividade reprodutiva durante os meses de elevados índices pluviométricos, uma vez que a área de ocupação dos túbulos seminíferos, tanto dos espécimes com testículos descendentes quanto com testículos não descendentes, apresentaram médias maiores durante a estação chuvosa (LIMA JUNIOR et al., 2014).

2.10 Morfologia, funções e foliculogênese nos ovários

Nos mamíferos, os ovários são órgãos que consistem nas gônadas femininas que apresentam funções endócrina (esteroidogênese – relacionada à produção e secreção hormonal) e exócrina (gametogênese – relacionada à produção e liberação de células reprodutivas). Sua superfície é revestida por um epitélio conhecido como germinativo, o qual pode apresentar classificação que varia de simples cúbico a pavimentoso. Abaixo desse epitélio, encontra-se uma camada de tecido conjuntivo denso que é chamada de túnica albugínea. Sob esta, encontra-se a região cortical onde estão os folículos ovarianos. Mais internamente, há outra região conhecida por medular que é altamente vascularizada. É importante enfatizar que não há uma distinção precisa dos limites existentes entre essas regiões (HAFEZ, 2004; MOORE; PERSAUD, 2004; MARTINS et al., 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

A foliculogênese é entendida como um processo de formação, crescimento e maturação dos folículos ovarianos que inicia com a formação do folículo primordial e termina com a formação do folículo pré-ovulatório, maduro ou de Graaf. Ela apresenta-se com alguns modelos de classificação que evidenciam uma quantidade diversa de estágios de folículos que variam a depender da espécie considerada. Em sua maioria, os folículos ovarianos não atingem o estágio final em que ocorre a ovulação, uma vez que morrem por um mecanismo fisiológico e natural conhecido como atresia folicular que acontece por meio da apoptose ou do processo degenerativo de necrose. Isso faz com que apenas uma quantidade pequena de folículos alcance o estágio de ovulação (GOUGEON, 2004; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; GRIFFIN et al., 2006; MARTINS et al., 2008; LIMA et al., 2010; SARAIVA et al., 2010).

De acordo com o grau de evolução e morfologia, os folículos ovarianos podem ser classificados em pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais (terciários e pré-ovulatórios). Os folículos primordiais, em sua maioria, encontram-se próximo da túnica albugínea no córtex ovariano e estão em estado de repouso. São constituídos por um ovócito imaturo envolto por uma só camada de células foliculares com formato achatado. Já os folículos primários são constituídos por uma só camada de células com morfologia cuboide, que se formam quando as células foliculares passam por um aumento de volume e dividem-se por mitose; além disso, tem como característica marcante a presença de uma zona conhecida como pelúcida, a qual é constituída por diversas glicoproteínas e envolvem todo o ovócito. Os folículos secundários são formados quando ocorre aumento da proliferação das células foliculares que possibilitará a formação de duas a três camadas de células granulosas, bem como da teca entorno da membrana basal. Em seguida, os folículos atingem a fase de folículos terciários (ou antrais), os quais são formados conforme ocorre o crescimento, sobretudo, das células da granulosa que irão se organizar em diversas camadas e, entre os espaços das células foliculares, iniciará o acúmulo de um líquido chamado de folicular que formará uma cavidade conhecida como antro folicular. Esse líquido é constituído por água, proteínas, eletrólitos e elevada composição de hormônios do tipo esteroides. Ao redor desses folículos, o estroma passa por um processo de modificação e forma as tecas foliculares (interna e externa). Por fim, há os folículos pré-ovulatórios (maduro ou de Graaf) que são

aqueles que alcançam o estágio mais elevado de crescimento. Nesses folículos, encontram-se células da granulosa concentradas em determinada parte do folículo constituindo o *cumulus oophorus* que atua apoiando o ovócito. Há também a corona radiata que é formada por células foliculares nas quais o ovócito está envolto. No folículo de Graaf, as células da granulosa reagem e param de se multiplicar preparando tal folículo para entrar no processo de ovulação (Fig. 6) (FIGUEIREDO et al., 2008; MARTINS et al., 2008; LEITÃO et al., 2009; SARAIVA et al., 2010).

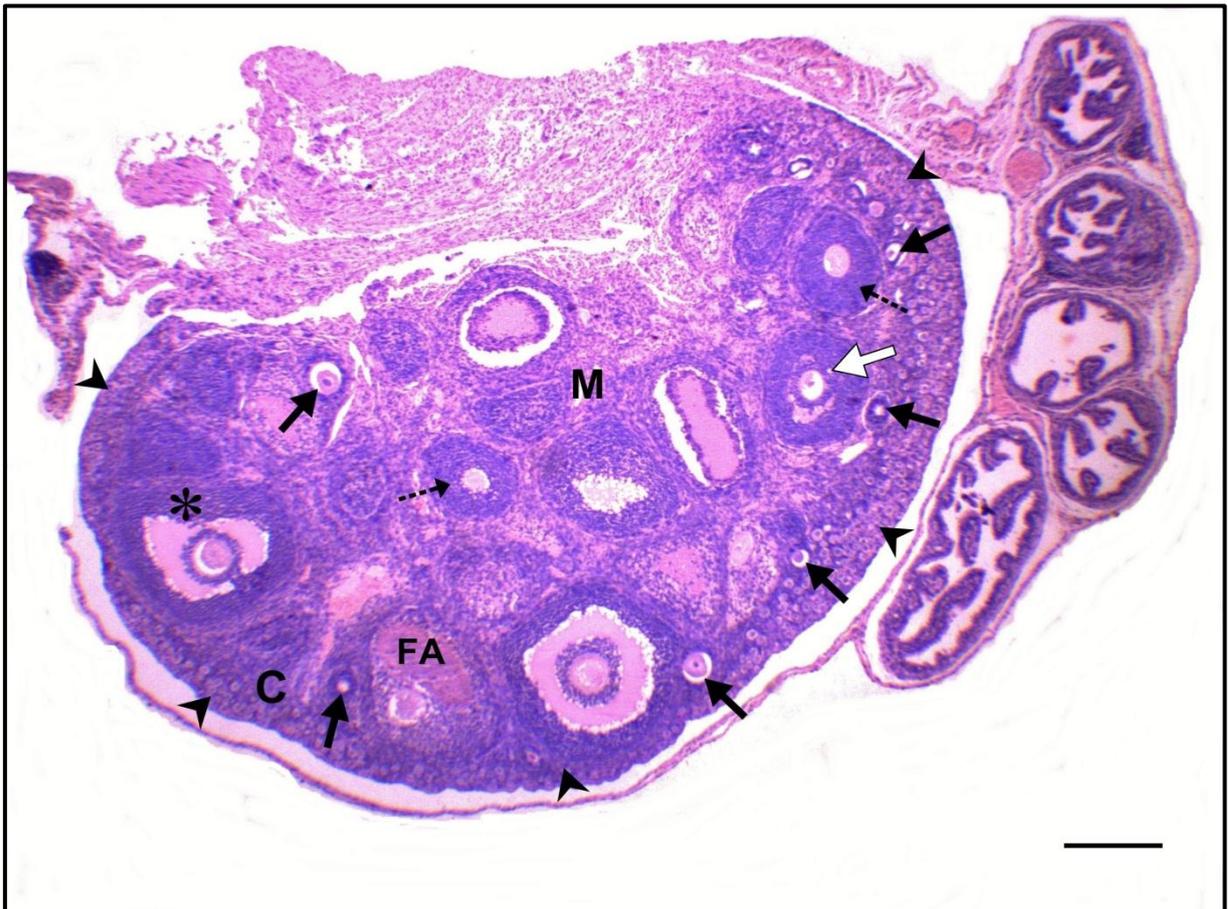


Figura 6: Histologia geral de um ovário de morcego (*Artibeus planirostris*). Córtex (C), medula (M), folículo em atresia (FA), folículos primordiais (cabeça de seta), folículo primário ou primário unilaminar (setas pretas), folículo secundário ou primário multilaminar (setas pretas pontilhadas), folículo terçoário ou antral (seta branca) e folículo pré-ovulatório, maduro ou de Graaf (asterisco). Coloração: Hematoxilina – Eosina. Barra de escala = 250 µm. Fonte: Lima Junior, N. B. (Junho /2017).

A ovulação acontece quando os níveis do hormônio estrógeno, sintetizado nos folículos em crescimento, encontram-se elevados. Isso induz a glândula hipófise a secretar em maiores quantidades o hormônio luteinizante (LH) possibilitando a ruptura do folículo de Graaf e consequente ovulação com liberação do ovócito. Depois da ocorrência da ovulação, ocorre a formação do corpo lúteo por meio da reorganização das células da granulosa e da teca interna do folículo que ovulou. O corpo lúteo é uma glândula endócrina considerada temporária que atua na produção e liberação de hormônios que irão manter o endométrio do útero. Essa glândula possui bastantes vasos e é constituída por células granuloso-luteínicas (produtoras de progesterona) e teca-luteínicas (produtoras de progesterona, estrógenos e de andrógenos) (DOWNEY; MOOTOO; DOYLE, 1998; MARTINS et al., 2008; SARAIVA et al., 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

2.10.1 Morfofisiologia dos ovários em morcegos no Brasil

Os estudos direcionados a morfofisiologia das gônadas femininas dos morcegos são ainda mais limitados, quando comparado às masculinas, no território brasileiro. Assim, as fêmeas de *Noctilio leporinus* coletadas em bioma de Mata Atlântica, situada no estado do Paraná, entram em período de ovulação entre os meses de julho e dezembro. A presença de fêmeas lactantes foi notada ao longo de quase todos os meses do ano, o que evidencia que *N. leporinus* apresenta um padrão reprodutivo do tipo poliétrico bimodal (BORDIGNON; FRANÇA, 2012).

Os ovários da espécie *Myotis levis* coletados em área de transição entre a Mata Atlântica e o Cerrado de Minas Gerais, apresentaram todos os folículos em diferentes estágios de maturação ao longo do período considerado (estações seca e chuvosa), com exceção dos folículos maduros que foram observados somente na metade da estação seca. No começo da estação chuvosa, notou-se a presença de fêmeas em estágio de lactação. Esses achados indicam que *M. levis*, apresentou reprodução sazonal com características semelhantes à de outras espécies da família Vespertilionidae, que habitam em regiões temperadas (ARAÚJO et al., 2013).

Ainda no estado supracitado, foi investigada a dinâmica reprodutiva da espécie *Anoura geoffroyi*. Nas fêmeas dessa espécie, foram encontrados espermatozoides nas criptas do útero, bem como embriões nos ovidutos e útero

gravídico durante a estação chuvosa, e também no começo da estação seca do ano seguinte, o que indica a ausência de sincronia nos nascimentos. Constataram-se também a presença de todos os tipos de folículos nos ovários, além de que este apresentou um córtex polarizado que divergiu da organização padrão já encontrado na maioria dos mamíferos. Assim, relacionado com a atividade dos machos, o padrão reprodutivo de *A. geoffroyi* foi caracterizado com monoestria sazonal nessa área de estudo considerada (FARIAS; TALAMONI; GODINHO, 2018).

A morfologia dos ovários bem como o processo de foliculogênese das espécies *Artibeus planirostris* e *Eptesicus furinalis* foram comparados na região noroeste do estado de São Paulo. A morfologia ovariana dessas espécies apresentaram distinções, de modo que *A. planirostris* apresentou os folículos primordiais situados em uma parte mais cranial desse órgão, assim como as células glandulares intersticiais não possuem distinções. Por outro lado, *E. furinalis* apresentou folículos primordiais ao longo de todo o córtex do ovário, bem como abundância nas células glandulares intersticiais. Nessas duas espécies, folículos binovulares ou triovulares foram encontrados, além de que *A. planirostris* é uma espécie monovular, enquanto que *E. furinalis* é poliovular (BUENO et al., 2018).

Em área de Cerrado desse mesmo estado, os ovários da espécie *Artibeus lituratus* apresentaram formato que varia do oval a circular. São compostos por um córtex, no qual podem ser encontrados os folículos ovarianos em diferentes fases de maturação (primordiais, primários, secundários, terciários, antrais e de Graaf), bem como o corpo lúteo – quando está presente. Em sua superfície, esse córtex é coberto pela túnica albugínea que é constituída por uma camada de tecido conjuntivo denso. Além do córtex, há também a medula que se situa na parte mais central do órgão e é formada por tecido conjuntivo do tipo frouxo, por vasos sanguíneos e linfáticos, bem como por nervos e algumas glândulas intersticiais. Os ovários de *A. lituratus* apresentaram poucas glândulas intersticiais, folículos de Graaf grandes e bastantes desenvolvidos, bem como corpo lúteo. A forma de ovulação verificada para essa espécie foi do tipo simples e unilateral, de modo que há indícios de que pode ocorrer de forma alternada com estro pós-parto (RODRIGUES et al., 2019).

No estado de Santa Catarina, a espécie *Myotis nigricans* apresentou registro de fêmeas grávidas (com dois picos: um maior em setembro e outubro, e outro

menor em dezembro); fêmeas lactantes, observadas apenas nos meses de outubro e novembro; pós – lactantes presentes na maioria dos meses considerados com exceção de maio, junho e setembro; e de fêmeas não reprodutivas, presentes em todos os meses, exceto em janeiro. Os meses em que ocorrem os nascimentos dos filhotes foram entre setembro e janeiro, de forma que pode ocorrer mais de uma gravidez ao ano, o que indica um padrão reprodutivo do tipo poliéstrico sazonal e bimodal (MOTTIN et al., 2018).

No estado de Pernambuco, o estágio reprodutivo, a histologia e a morfometria ovariana da espécie *Dermanura cinerea* foi analisada em um fragmento preservado de Mata Atlântica no litoral Sul de Pernambuco, em períodos seco e chuvoso. Essa espécie possui ovários com estruturas e tipos celulares padrões e semelhantes ao de outros mamíferos. Além disso, essa espécie apresentou dois picos na sua atividade reprodutiva ao longo do ciclo reprodutivo anual. Assim, as fêmeas de *D. cinerea* preparam-se para ovular em períodos de chuva, de modo que podem parir em fases finais de períodos com baixos índices pluviométricos ou do começo para a metade do período com índices pluviométricos elevados. Esse comportamento favorece a reprodução em épocas em que a disponibilidade alimentar seja ampla para manter a prole, de acordo com as condições ambientais (LIMA JUNIOR et al., 2018a).

2.11 Aspectos gerais do Município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco

O Município de Vitória de Santo Antão (08°07'05" de latitude sul e 35°17'29" de longitude oeste), está localizado a aproximadamente 45,1 km da capital – Recife – do estado de Pernambuco. Faz parte da Mesorregião da Mata Pernambucana e Microrregião da Vitória de Santo Antão. Essa Microrregião, além do município supracitado é composta também pelos municípios de Chã de Alegria, Glória do Goitá, Pombos e Chã Grande (SILVA et al., 2015; RIBEIRO; SOUZA, 2018).

O clima desse município é considerado quente e úmido do tipo tropical, de acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger, e apresenta temperatura média de 23,8°C. Nessa microrregião, da qual Vitória de Santo Antão faz parte, há duas estações bem definidas: o período chuvoso (março a agosto) e o seco

(setembro a fevereiro), embora existam irregularidades na pluviosidade ao longo do ano (LIMA, 2017; RIBEIRO; SOUZA, 2018).

Além disso, a vegetação característica dessa localidade é do tipo floresta subperenifólia. Apesar de que o processo de produção agrícola e o crescimento urbano vieram ocasionando, ao longo do tempo, a destruição de uma parte importante do bioma original da Mata Atlântica nessa área, o que é preocupante, pois trouxe consigo diversas consequências geoambientais (SILVA et al., 2010; ÁLVARES et al, 2011; LIMA, 2017).

Essas consequências estão diretamente relacionadas ao crescimento econômico. Tanto é que, nos dias atuais, Vitória de Santo Antão possui um considerável desenvolvimento nas atividades industriais, comerciais, de prestação de serviços e também na agropecuária, que representam valores expressivos para o desenvolvimento local. Todavia, se por um lado esse crescimento tem trazido benefícios para a população humana, por outro tem ocasionado a redução dos recursos naturais, devido à degradação ambiental. Logo, esse cenário pode interferir na história de vida de muitas espécies vegetais e animais, inclusive dos morcegos que vivem nesse ambiente (SILVA et al., 2015; LORENA et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Verificar os aspectos e relações sazonais existentes na reprodução das espécies *Phyllostomus discolor* (Phyllostomidae: Phyllostominae) e *Artibeus planirostris* (Phyllostomidae: Stenodermatinae), coletadas no Município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco, através de parâmetros histomorfométricos, imunohistoquímicos e hormonais.

3.2 Específicos

- Determinar o estágio e padrão reprodutivo de ambas as espécies na área de estudo considerada;
- Descrever a morfofisiologia dos testículos e epidídimos de *P. discolor* e *A. planirostris*;
- Descrever a morfofisiologia dos ovários de *A. planirostris*;
- Quantificar as células espermatogênicas em diferentes estágios de desenvolvimento e de Sertoli nos túbulos seminíferos, bem como as células de Leydig no compartimento intertubular dos testículos das duas espécies;
- Verificar possíveis variações histomorfométricas, nas regiões que compõem o epidídimo de cada uma das espécies, entre os meses secos e chuvosos;
- Quantificar os folículos, em diferentes fases de maturação, e o corpo lúteo quando presente, nos ovários da espécie *A. planirostris*;
- Analisar os níveis de testosterona nos machos de ambas as espécies;
- Analisar os níveis de estrógeno e a proliferação celular nos ovários de *A. planirostris*;
- Avaliar a atividade de proliferação celular e do receptor de andrógeno nos testículos de *P. discolor*;
- Avaliar a atividade de proliferação celular nos testículos de *A. planirostris*;
- Comparar os dados obtidos para as duas espécies, verificando se existem variações sazonais entre os meses secos e chuvosos.

4 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, P.; SILVA, L. A. M.; CUNHA, M. C.; SILVA, C. J.; MACHADO, J. L. 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.

ALTRINGHAM, J. D. **Bats: Biology and behavior**. University Press, Oxford, 262 p. 1996.

ÁLVARES, J.; FERRER, P.; HOLANDA, D.; JATOBÁ, L. **História da Vitória de Santo Antão, 1983 a 2010**. 1ª Ed. Vitória de Santo Antão: CEPE, 2011.636p.

AMADOR, L. I.; MOYERS ARÉVALO, R. L.; ALMEIDA, F. C.; CATALANO, S. A.; GIANNINI, N. P. Bat Systematics in the Light of Unconstrained Analyses of a Comprehensive Molecular Supermatrix. **Journal of Mammalian Evolution**, v.25, n.1, p.37 – 70, 2016.

ANDERSON, A.; SHWIFF, S. A. The Cost of Canine Rabies on Four Continents. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.62, n.4, 446 – 52, 2015.

ARANDAS, M. J. G.; TEIXEIRA, A. A. C.; TEIXEIRA, V. W.; SILVA, F. R.; MARINHO, K.; S. N.; LIMA JUNIOR, N. B.; AGUIAR JÚNIOR, F. C. A.; SANTOS, K. R. Seasonal influence on testicular morphophysiological parameters of bat *Carollia perspicillata* in fragments of the Atlantic Forest, northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.39, n.6, p.429 – 433, 2019.

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, n.11, p. 1230 – 1238, 2013.

BALMORI, L. La reproducion em los quirópteros. **Revisiones em Mastozoología** v.11, p.17 – 34, 1999.

BAKER, R. J.; SOLARI, S.; CIRRANELLO, A.; SIMMONS, N.B. Higher level classification of phyllostomid bats with a summary of DNA synapomorphies. **Acta Chiropterologica**, v. 18, n.1, p.1 – 38, 2016.

BARROS, M. S.; MORAIS, D. B.; ARAÚJO, M. R.; CARVALHO, T. F.; MATTA, S. L. P.; PINHEIRO, E. C.; FREITAS, M. B. Seasonal variation of energy reserves and

reproduction in neotropical free-tailed bats *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.73, n.3, p. 629 – 635, 2013.

BARROS, R. S.; 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, 2006.

BATISTA, H. B. C. R.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Raiva: Uma Breve Revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 125 – 144, 2007.

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.; 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.; 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.; MORIELLE-VERSUTE, E.; TABOGA, S. R. Comparative analysis of the male reproductive accessory glands of bats *Noctilio albiventris* (Noctilionidae) and *Rhynchonycteris naso* (Emballonuridae). **Journal of Morphology**, v.277, n.11, p.1459 – 1468, 2016.

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 broadnosed 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.

BEGUELINI, M. R.; TABOGA, S. R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in Pallas's Mastiff bat, *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). **Microscopy Research and Technique**, v.75, n.7, p.856 – 868, 2012.

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.

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.

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, p.62 – 67, 2012.

BOYLES, J. G.; CRYAN, P. M.; MCCracken, G. F.; KUNZ, T. H. **Economic Importance of Bats in Agriculture. Science**, v.332, n.6025, p.41 – 42, 2011.

BREDT, A.; SILVA, D.M. Morcegos em áreas urbanas e rurais: Manual de manejo e controle. **Fundação Nacional de Saúde**, 1998.117 p.

BREDT, A.; UIEDA, W.; MAGALHÃES, E. D. Morcegos cavernícolas da região do Distrito Federal, centro-oeste do Brasil (Mammalia: Chiroptera). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n.3, p.731 – 770, 1999.

BREDT, A.; UIEDA, W.; PEDRO, W. A. **Plantas e morcegos**: na recuperação de áreas degradadas e na paisagem urbanas. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado, 2012. 273 p.

BUENO, L. M.; CAUN, D. L.; COMELIS, M. T.; BEGUELINI, M. R.; TABOGA, S. R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Ovarian morphology and folliculogenesis and ovulation process in the flat-faced fruit-eating bat *Artibeus planirostris* and the Argentine brown bat *Eptesicus furinalis*: A comparative analysis. **Acta Zoologica**. p.1 – 12, 2018.

CAMPOLINA-SILVA, G. H.; HESS, R. A.; OLIVEIRA, C. A. Seasonal variation of cell proliferation and apoptosis in the efferent ductules and epididymis of the Neotropical bat *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae). **General and Comparative Endocrinology**, v.273, p.3 – 10, 2018.

CARNEIRO, N. F. F.; CALDEIRA, A. P.; ANTUNES, L. A.; CARNEIRO, V. F.; CARNEIRO, G. F. Raiva em Morcegos *Artibeus lituratus* em Montes Claros, Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 449 – 451, 2009.

CASTRO, M. M.; GONÇALVES, W. G.; TEIXEIRA, S. A. M. V.; FIALHO, M. 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.

CRICHTON, E.G.; KRUTZSCH, P.H. Reproductive biology of bats. In: Racey PA, Entwistle AC (eds.), Life - history and Reproductive Strategies of Bats. London: [s.n.], 2000.

DATZMANN, T.; HELVERSEN, O.; MAYER, F. Evolution of nectarivory in phyllostomid bats (Phyllostomidae Gray, 1825, Chiroptera: Mammalia). **BMC Evolutionary Biology**, v.10, n.165, 2010.

DOWNEY, B. R.; MOOTOO, J. E.; DOYLE, S. E. A role for lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in porcine ovulation. **Animal Reproduction Science**, v.49, p.269 – 279, 1998.

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.

ENCARNAÇÃO, J. A.; DIETZ, M.; KIERDORF, U. Reproductive condition and activity pattern of male Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*) in the summer habitat. **Mammalian Biology**, v.69, p.163 –17, 2003.

ESBÉRARD, C. E. L.; LUZ, J. L. ; COSTA, L. M. ; BERGALLO, H. G. Bats (Mammalia, Chiroptera) of an urban park in the metropolitan area of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 104, p.59 – 69, 2014.

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.

FABIÁN, M. F.; MARQUES, R. V. 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.

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.

FARIAS, T. O.; TALAMONI, S. A.; GODINHO, H. P. Reproductive Dynamics of the Nectarivorous Geoffroy's Tailless Bat *Anoura geoffroyi* (Glossophaginae) in a Highland Neotropical Area of Brazil, with Evidence of a Mating Period. **Acta Chiropterologica**, v.20, n.1, p.251 – 261, 2018.

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

FENTON, M. B.; SIMMONS, N. B. Bats: A World of Science and Mystery. Chicago, University of Chicago Press. 240p. 2014.

FERREIRA, M.; SOLDATI, A; RODRIGUES, S. S. S.; BENJAMIN, L. A. Implications of body condition and seasonality on morphological and functional parameters of testes of *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). **Reproduction, Fertility and Development**, v.30, p.1029 – 1037, 2018.

FERREIRA, R. L.; MARTINS, R. P. Diversity and distribution of spiders associated with bat guano piles in Morrinho cave (Bahia State, Brazil), **Diversity and Distributions**, v. 4, n. 5-6, p. 235 – 241, 1998.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2.ed. São Paulo: Roca, p. 303 – 327, 2008.

FLEMING, T. H.; GEISELMAN, C.; KRESS, W. J. The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective, **Annals of Botany**, v. 104, n. 6, p. 1017 – 1043, 2009.

FLEMING, T. H; HOOPER, E. T.; WILSON, D. E. Three Central American bat communities : structure, reproductive cycles and movement patterns. **Ecology**, v. 53, n.4, p. 556 – 569, 1972.

FRANÇA, L. R., RUSSELL, L. D., 1998. The testis of domestic mammals. In: REGADERA, J., MARTINEZ-GARCIA, F. (Eds.). **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. Churchill Livingstone, Madrid, p.197 – 219, 1998.

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, 2008. 669 p.

GILBERT, F. S. **Developmental Biology**. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, 2006. 751 p.

GOUGEON, A. 2004. Dynamics of human follicular growth: morphologic, dynamic, and functional aspects. In: Leung P, Adashi E (eds). *The Ovary* Elsevier Academic Press.

GRIFFIN, J.; EMERY, B. R.; HUANG, I.; PETERSON, C. M.; CARRELL, D. T. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). **Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction**, v.3, n.1, 2006.

HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução feminina. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Manole. 2004. 582 p.

HALL, L.; RICHARDS, G. Flying foxes: fruit and blossom bats of Australia, p. 62–63. In T. J. Dawson (ed.), *Australian natural history series*. University of New South Wales Press Ltd., Sydney, Australia. 2000.

HESS, R. A; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: CHENG, C. Y., editor. **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**. Landes Bioscience/Springer Science; 2008, p. 186 – 211.

JONES, G.; JACOBS, D.; KUNZ, T. H.; WILIG, M. R.; RACEY, P. A. Carpe Noctem: the importance of bats as bioindicators, **Endangered Species Research**, v. 8, p. 3 – 115, 2009.

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. **Histologia básica: texto e atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cells of mouse testis originate from the coelomic epithelium. **Developmental Biology**, v.203, n.2, p.323 – 333, 1998.

KASSO, M.; BALAKRISHNAN, M. Ecological and economic importance of bats (order Chiroptera). **ISRN Biodiversity**, p.1 – 9, 2013.

KELM, D. H., WIESNER, K. R.; VON HELVERSEN, O. Effects of artificial roosts for frugivorous bats on seed dispersal in a Neotropical forest pasture mosaic. **Conservation Biology**, v. 22, p.733 – 741, 2008.

KOTAIT, I. CARRIERI, M. L. TAKAOKA, N. Y. Raiva – **Aspectos gerais e clínica**. Manual Técnico do Instituto Pasteur. n.8. 2009. 49p.

KUNZ, T. H.; TORREZ, E. B.; BAUER, D.; LOBOVA, T.; FLEMING, T. H. Ecosystem services provided by bats, **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1223, n. 1, p. 1 – 38, 2011.

KWIECINSKI, G. G. *Phyllostomus discolor*. **Mammalian Species**, n. 801, p. 1 – 11, 2006.

LACKI, M. J.; JOHNSON, J. S.; DODD, L. E.; BAKER, M. D. Prey consumption of insectivorous bats in coniferous forests of north-central Idaho, **Northwest Science**, v. 81, n. 3, p. 199 – 205, 2007.

LEE, J. H.; MORI, T. Annual cycle of the seminiferous epithelium of *Myotis macrodactylus*. **Journal of Faculty of Agriculture, Kyushu University**. v.49, n.2, p.355 – 365. 2004.

LEITÃO, C. C. F.; BRITO, I. R.; FROTA, I. M. A.; SILVA, J. R. V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.37, n.3, p.215 – 224, 2009.

LIMA, I. P. Espécies de Morcegos (Mammalia, Chiroptera) registradas em parques nas áreas urbanas do Brasil e suas implicações no uso deste ambiente. P.71-85. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; SANTOS, G. A. S. D. (Org.). Ecologia de Morcegos. Londrina: **Technical Books Editora**. 2008.

LIMA, M. J. F. **Análise das ações em educação ambiental realizadas em uma comunidade do município de Vitória de Santo Antão – Pernambuco**, 2017. 63 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Pernambuco, 2017.

LIMA, I. M. T.; CELESTINO, J. J. H.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Papel da Proteína Morfogenética Óssea-15 (BMP15) e Kit Ligand (KL) na regulação da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.1, p.3 – 20, 2010.

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. Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.51, p.263 – 270, 2014.

LIMA JUNIOR, N. B.; ARANDAS, M. J. G.; SILVA, F. R.; ANTONIO, E. A.; AGUIAR JÚNIOR, F. C. A.; TEIXEIRA, A. A. C.; GARCIA, J. E.; SANTOS, K. R. P. Analysis of the reproductive stage and ovarian histomorphometry of *Dermanura cinerea* (Chiroptera: Phyllostomidae) in an Atlantic Forest fragment of Pernambuco, northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n.1. p.167 – 174, 2018a.

LIMA JUNIOR, N. B.; ARANDAS, M. J. G.; SILVA, F. R.; SILVA, V. D.; TEIXEIRA, A. A. C.; AGUIAR JÚNIOR, F. C. A.; GARCIA, J. E.; SANTOS, K. R. P. Estágio reprodutivo, histologia e morfometria sazonal do testículo de *Dermanura cinerea* (Chiroptera: Phyllostomidae) em fragmento de Mata Atlântica no Litoral Sul de Pernambuco, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v.108, e2018038, p. 1 – 5, 2018b.

LOBOVA, T. A.; CULLEN, K. G.; SCOTT A. M. **Seed dispersal by bats in the Neotropics**. New York: New York Botanical Garden Press, 2009. 465 p.

LORENA, E. M. G.; BEZERRA, A. P. X. G.; SANTOS, I. G. S.; MEDEIROS, R. M.; ROLIM NETO, F. C.; HOLANDA, R. M. Cálculo da evolução temporal de área

degradada às margens do rio Tapacurá na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 03, n. 01, p.173 – 180, 2018.

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. Livro vermelho da Revbea, São Paulo, V. 13, No1:43-60, 2018. Revista brasileira de educação ambiental fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília, DF. Ministério do Meio Ambiente, v.1, 1420p. 2008.

MARTINS, F. F.; BEGUELINI, M. R.; PUGA, C. C.; MORIELLE-VERSUTE, E.; VILAMAIOR, P. S.; TABOGA, S. R. Morphophysiology and ultrastructure of the male reproductive accessory glands of the bats *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina* and *Phyllostomus discolor* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Acta Histochemica**. v.118, n.6, p. 640 – 651, 2016.

MARTINS, F. F.; PUGA, C. C. I.; BEGUELINI, M. R.; MORIELLE-VERSUTE, E.; VILAMAIOR, P. S. L.; TABOGA, S. R. Comparative Analysis of the Male Reproductive Accessory Glands of Bat Species From the Five Brazilian Subfamilies of the Family Phyllostomidae (Chiroptera). **Journal of Morphology**, v.276, p.470 – 480, 2015.

MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.32, n.1, p.36 – 39, 2008.

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

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clinica**. 7 ed. Rio de Janeiro. 2004. 609 p.

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**, v.147, n.3 – 4, p.180 – 186, 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 spermatid indexes of the bat *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae). **PloS One** v.9, n.7, e101759, 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 indices of sperm production. **Animal Reproduction Science**, v.140, p.268 – 278, 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, n. 1, p. 94 – 101, 2013a.

MORAIS, D. B.; PAULA, T. A.; BARROS, M. S.; BALARINI, M. K.; FREITAS, M. B. D.; MATTA, S. L. 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, n. 3, e0173856, 2017.

MOTTIN, V.; CARVALHO, F.; BÔLLA, D. A. S.; MIRANDA, J. M. D.; MACHADO, T. S.; PASSOS, F. C. Atividade reprodutiva e estrutura populacional de *Myotis nigricans* (SCHINZ, 1821) (Chiroptera: Vespertilionidae) no sul do Brasil. **Mastozoología neotropical**, v.25, n.2, p.399 – 406, 2018.

MOUTINHO, F. F. B.; BORGES, F. V. B.; FERNANDES, P. M.; NUNES, V. M. A.; ROCHA, M. R. D.; SANTOS, C. S.; FARIA 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.

MUSCARELLA, R.; FLEMING, T. H. The role of frugivorous bats in tropical forest succession, **Biological Reviews**, v. 82, n. 4, p. 573 – 590, 2007.

NOGUEIRA, M. R.; LIMA, I. P.; MORATELLI, R.; TAVARES, V. C.; GREGORIN, R.; PERACCHI, A. L. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. **Check List**, v.10, n.4, p.808 – 821, 2014.

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.

NOWAK, R. M., 1994. **Walker's Bats of the world**. Johns Hopkins University Press, London, 287 p.

NUNES, H. L.; ROCHA, F. L.; CORDEIRO-ESTRELA, P. Bats in Urban Areas of Brazil: Roosts, Food Resources and Parasites in Disturbed Environments. **Urban Ecosystems**, v. 20, n. 4, p. 953 – 969, 2017.

OLIVEIRA, A. K. M.; LEMES, F. T. F. *Artibeus planirostris* como dispersor e indutor de germinação em uma área do Pantanal do Negro, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n.1, p. 49 – 52, 2010.

OPREA, M.; BRITO, D.; VIEIRA, T. B.; MENDES, P.; LOPES, S. R. A note on the diet and foraging behavior of *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae) in an urban park in southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v.7, n.2, bn01407022007, 2007.

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.

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 on line**, 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.

POLIS, G. A.; ANDERSON, W. B.; HOLT, R. D. Toward an integration of landscape and food web ecology: the dynamics of spatially subsidized food webs, **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 28, p. 289 – 316, 1997.

PUGA, C. C.; BEGUELINI, M. R.; NEGRIN, A. C.; CHRISTANTE, C. M.; MORIELLE-VERSUTE, E.; VILAMAIOR, P. S.; TABOGA, S. R. Structure, histochemistry and ultrastructure of the male reproductive accessory glands in the neotropical flat-faced fruit-eating bat *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Reproduction, Fertility and Development**, v.25, n.3, p. 558 – 569, 2013.

RACEY, P. Ecology of Bat Reproduction. **Ecology of Bats**, 1982.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, A. W.; LIMA, I. P. DE. Mamíferos do Brasil. 2ed. Londrina: [s.n.], 2011.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. Morcegos do Brasil. [S.l: s.n.], 2007.

REIS, N. R.; LIMA, I. P.; PERACCHI, A. L. Morcegos (Chiroptera) da área urbana de Londrina, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.19, p.739 – 746, 2006.

RIBEIRO, E. P.; SOUZA, C. S. Caracterização e classificação climática da Microrregião de Vitória de Santo Antão. **Revista Continentes (UFRRJ)**, v. 7, n. 12, p.235 – 259, 2018.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. The Epididymis. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (4th edition). **Academic Press**, p.691 – 771, 2015.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T.; ORGEBIN, M. C. The epididymis. Knobil and Neill's. **Physiology of reproduction**, v. 1, n. 1, p. 1071 – 1148, 2006.

RODRIGUES, A. F.; SANTIAGO, C. S.; MORIELLE-VERSUTE, E.; TABOGA, S. R.; BEGUELINI, M. R. Morphological variation of the female reproductive organs of the bat *Artibeus lituratus* during its different reproductive phases. **Journal of Morphology**. 280, p.1141 – 1155. 2019.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Histologia: texto e atlas: em correlação com biologia celular e molecular. 5. ed. Rio de Janeiro; Buenos Aires [Argentina]: Guanabara Koogan: Panamericana, 2008.

RUSSELL, L. D., ETTLIN, R. A., SINHA HIKIM, A. P., CLEGG, E. D. Mammalian spermatogenesis. In: Russell, L. D., Ettlin, R. A., Sinha Hikim, A. P., Clegg, E. D. (Eds). **Histological and histopathological evaluation of the testis** Cache River Press, Clearwater, Florida, p. 1 – 40, 1990.

SANTOS, R. T. S.; PIRES, L. R. M.; ALBERNAZ, E. S. S.; ANDRADE, C. S.; SANTIAGO, C. S.; MORIELLE-VERSUTE, E.; TABOGA, S. R. BEGUELINI, M. R. Morphological analysis of the male reproductive accessory glands of the bat *Artibeus lituratus* (Phyllostomidae: Chiroptera). **Journal of Morphology**, v. 279, n.2, p. 228 – 241, 2017.

SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; FAUSTINO, L. R.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.4, p.206 – 221, 2010.

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

SCHEFFER, K. C.; CARRIERI, M. L.; ALBAS, A.; SANTOS, H. C. P.; KOTAIT, I.; ITO, F. H. Vírus da Raiva em Quirópteros Naturalmente Infectados no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 3, p. 389 – 95, 2007.

SCHNEIDER, M. C.; ROMIJN, P. C.; UIEDA, W.; TAMAYO, H.; SILVA, D. F.; BELOTTO, A.; SILVA, J. B.; LEANES, L. F. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America? **Pan American Journal of Public Health**, v.25, p.260 – 269, 2009.

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

SILVA DE ARAUJO, M. L. V.; BERNARD, E. Green remnants are hotspots for bat activity in a large Brazilian urban area. **Urban Ecosystems**, v. 19, p. 287 – 296, 2016.

SILVA, J. F.; MACHADO, J.; ANDRADE, J. S. C. O.; WANDERLEY, R. A. Economia, agricultura e clima através de modelo digital do terreno na microrregião de Vitória de Santo Antão. **Revista GEAMA**, v.1, n.1, p.43 – 58, 2015.

SILVA, L. A. M.; SILVA FILHO, T. P.; SILVA, R. R.; SILVA, E. M. V. G.; MACHADO, J. L. M. Isolamento do vírus rábico em *Molossus rufus* (E. Geoffroy, 1805) (Chiroptera: Molossidae) no Nordeste do Brasil. **Revista Biociências**, v.20, n. 2, p. 1 – 4, 2014.

SILVA, R. M.; SILVA, L. P.; MONTENEGRO, S. M. G. L.; SANTOS, C. A. G. Análise da variabilidade espaço-temporal e identificação do padrão da precipitação na bacia do Rio Tapacurá, Pernambuco. **Sociedade & Natureza**, v.22, n.2, p.357 – 372, 2010.

SIMMONS, N. B.; Ordem Chiroptera. In: Wilson DE, Reeder DM. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. Baltimore: Johns Hopkins University Press, p.312 – 529, 2005.

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

SOLARI, S.; MARTINEZ-ARIAS, V. Cambios recientes en la sistemática y taxonomía de murciélagos Neotropicales (Mammalia: Chiroptera). **Therya**, v.5, p.167 – 196, 2014.

SOUZA, A. C. F.; SANTOS, F. C.; BASTOS, D. S. S.; SERTORIO, M. N.; TEIXEIRA, J. P. G.; FERNANDES, K. M.; MACHADO – NEVES, M. Reproductive functions in *Desmodus rotundus*: A comparison between seasons in a morphological context. **PLoS ONE** v.13, n.10, e0205023, 2018.

SOUZA, L. C.; LANGONI, H.; SILVA, R. C.; LUCHEIS, S. B. Vigilância Epidemiológica da Raiva na Região de Botucatu – SP: Importância dos Quirópteros na Manutenção dos Vírus na Natureza. Jaboticabal, SP: **ARS Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 62 – 68, 2005.

TADDEI, V. A. The reproduction of some Phyllostomidae (Chiroptera) from the northwestern region of the State of São Paulo. **Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo**, v. 1, p. 313 – 330, 1976.

TEELING, E. C. Chiroptera. In: HEDGES, S. B.; KUMAR, S. (Editors). The Time Tree of life, **Oxford University Press**, p.499 – 503, 2009.

TURNER, T. T.; JOHNSTON, D. S.; JELINSKY, S. A.; TOMSIG, J. L.; FINGER, J. N. Segment boundaries of the adult rat epididymis limit interstitial signaling by potential paracrine factors and segments lose differential gene expression after efferent duct ligation. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, p.565 – 573, 2007.

UIEDA, W.; HAYASHI, M. M.; GOMES, L. H.; SILVA, M. M. Espécies de quirópteros diagnosticadas com raiva no Brasil. **Boletim do Instituto Pasteur**, n.2, p.17 – 36, 1996.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717 – 1751, 2005.

VERI, J. P.; HERMO, L.; ROBAIRE, B. Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. **Journal of Andrology**, v.14, p.23 – 44, 1993.

VOIGT, C. C.; KINGSTON, T. Bats in the Anthropocene: conservation of bats in a changing world. Springer International AG, **Cham**, 2016.

WADA, M. Y.; ROCHA, S. M.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S. Situação da Raiva no Brasil, 2000 a 2009. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v.20, n.4, p.233 – 244, 2011.

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

WILLIG, M. R. Reproductive activity of female bats from Northeastern Brazil. **Bat Research News**, v.26, p.17 – 20, 1985b.

YE, L.; SU, Z. J.; GE, R. S. Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes. **Molecules**, v.16, n.12, p. 9983 – 10001, 2011.

YEUNG, C. H.; COOPER, T. G. Basal cells of the human epididymis-Antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. **Biology of Reproduction**, v.50, p.917 – 926, 1994.

ZHUANG, Q.; MÜLLER, R. Noseleaf furrows in a horseshoe bat act as resonance cavities shaping the biosonar beam. **Physical Review Letters** v.97, n.21, 218701, 2006.

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

**ARTIGO CIENTÍFICO I:
MORFOFISIOLOGIA TESTICULAR E EPIDIDIMÁRIA EM
Phyllostomus discolor (WAGNER, 1843) (CHIROPTERA:
PHYLLOSTOMIDAE) DURANTE OS MESES SECOS E CHUVOSOS
EM UM MUNICÍPIO DA MATA PERNAMBUCANA, NORDESTE DO
BRASIL**

**MORFOFISIOLOGIA TESTICULAR E EPIDIDIMÁRIA EM *Phyllostomus discolor*
(WAGNER, 1843) (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE) DURANTE OS MESES
SECOS E CHUVOSOS EM UM MUNICÍPIO DA MATA PERNAMBUCANA,
NORDESTE DO BRASIL**

Nivaldo Bernardo de Lima Junior^{1*}, Ismaela Maria Ferreira de Melo¹, Fabricya Roberta da Silva¹, Erivaldo Alves Antonio¹, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior²; Katharine Raquel Pereira dos Santos²; Valéria Wanderley Teixeira¹ e Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹

¹Área de Morfologia, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Brasil.

*[Correspondência: Nivaldo Bernardo de Lima Junior <nivaldobernardo@hotmail.com>]

²Núcleo de Biologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Brasil.

Título curto: REPRODUÇÃO EM MACHOS DE *P. discolor*.

RESUMO. A morfofisiologia testicular e epididimária de *Phyllostomus discolor* foram avaliadas em meses secos e chuvosos em Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Foram capturados animais adultos (n=12) em meses secos (n=06) – setembro a fevereiro e chuvosos – março a agosto (n=06). Amostras sanguíneas foram coletadas para dosagem de testosterona. Após a eutanásia, os testículos e os epidídimos foram removidos e processados. Nos testículos consideraram-se as áreas de ocupação do compartimento tubular e intertubular, e o percentual das seguintes células: Sertoli, Leydig, espermatogônias, espermatócitos, espermátides arredondadas e alongadas. Na citomorfometria das espermatogônias, espermatócitos e espermátides, consideraram-se: número de região organizadora de nucléolo (NOR) por célula, área da NOR ocupada na célula, área do núcleo e da célula, porcentagem do núcleo ocupada por NOR e porcentagem da célula ocupada por núcleo. Na imuno-histoquímica testicular, consideraram-se o PCNA e o receptor de andrógeno. Nos epidídimos foram mensuradas a altura do epitélio, os diâmetros do túbulo e do lúmen, bem como a proporção volumétrica de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, lúmen e epitélio, das regiões da cabeça, corpo e cauda. No epitélio de cada região foram quantificadas as células principais, basais e apicais. Os resultados indicaram que essa espécie apresentou atividade esteroidogênica ao longo de todo o ano. Na contagem, apenas os espermatócitos e as espermátides arredondadas demonstraram diferenças em meses secos. Na citomorfometria das espermatogônias, espermatócitos e espermátides, a maioria das variações foi em meses chuvosos. Os epidídimos apresentaram mudanças no epitélio, túbulo e lúmen em meses secos, já os vasos sanguíneos e tecido conjuntivo foram maiores em meses chuvosos. As células principais foram as mais abundantes, seguidas das basais e apicais. Apesar de *P. discolor* ter apresentado elevação em alguns parâmetros, de maneira geral, essa espécie apresenta ampla flexibilidade e sempre se ajusta para poder se reproduzir em qualquer época do ano, influenciada pelas condições ambientais.

Palavras-chave: Epidídimo, morcegos, morfologia, morfometria, testículo.

ABSTRACT. The testicular and epididymal morphophysiology of *Phyllostomus discolor* were evaluated in dry and rainy months in Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Adult animals (n=12) were captured in dry months (n=06) - September to February and rainy - March to August (n=06). Blood samples were collected for testosterone dosage. After euthanasia, the testes and the epididymis were removed and processed. In the testes, the areas of occupation of the tubular and intertubular compartments, and the percentage of the following cells were considered: Sertoli, Leydig, spermatogonia, spermatocytes, rounded and elongated spermatids. In cytomorphometry of spermatogonia, spermatocytes and spermatids, were considered: number of nucleolus organizing region (NOR) per cell, area of NOR occupied in the cell, area of the nucleus and of the cell, percentage of the nucleus occupied by NOR and percentage of the cell occupied by nucleus. In testicular immunohistochemistry, PCNA and androgen receptor were considered. In the epididymis, the height of the epithelium, the diameters of the tubule and the lumen, as well as the volumetric proportion of connective tissue, blood vessels, lumen and epithelium, of the caput, corpus and cauda regions were measured. In the epithelium of each region, the principal, basal and apical cells were quantified. The results indicated that this species showed steroidogenic activity throughout the year. In counting, only spermatocytes and rounded spermatids showed differences in dry months. In cytomorphometry of spermatogonia, spermatocytes and spermatids, most variations were in rainy months. The epididymis showed changes in the epithelium, tubule and lumen in dry months, whereas blood vessels and connective tissue were greater in rainy months. The principal cells were the most abundant, followed by basal and apical cells. Although *P. discolor* has increased in some parameters, in general, this

species has ample flexibility and always adjusts to be able to reproduce at any time of the year, influenced by environmental conditions.

Key words: Epididymis, bats, morphology, morphometry, testis.

1 INTRODUÇÃO

As espécies da ordem Chiroptera vivem em ambientes sazonais e geralmente, ajustam o seu período de acasalamento para ocorrer antes ou durante a época em que as condições ambientais e a abundância de alimentos favoreçam o processo reprodutivo. Há também espécies em que a determinação do padrão reprodutivo não se limita às alterações sazonais, e outras apresentam uma intrínseca associação entre a atividade dos testículos e epidídimos dos machos com o ciclo reprodutivo das fêmeas (Crichton & Kruttsch 2000; Lima Junior et al. 2014; 2018a; b; Christante et al. 2015).

Os testículos dos quirópteros apresentam funções exócrina (produção de células da linhagem espermatogênica) e endócrina (produção de andrógenos), e são constituídos por dois compartimentos (tubular e intertubular). Os epidídimos têm função de maturação e armazenamento dos espermatozoides provenientes dos testículos, é dividido anatomicamente em regiões específicas (geralmente cabeça, corpo e cauda), com variações a depender da espécie considerada (Russell et al. 1990; Serre & Robaire 1998; Belleannee et al. 2012; Beguelini et al. 2013a; Castro et al., 2017).

Os processos de espermatogênese e de esteroidogênese nos testículos, bem como o armazenamento de espermatozoides no epidídimo, são peculiares em cada espécie de morcego, de forma que são influenciados pelas condições ambientais e bioma considerado. Assim, há espécies que são capazes de apresentar regressão testicular e prolongar o tempo de estocagem dos espermatozoides na região da cauda do epidídimo, como forma de estratégia reprodutiva (Cooper, 1999; Tobón et al. 2010; Beguelini et al. 2013c; 2015; Castro et al. 2017; Souza et al. 2018; Arandas et al. 2019).

Nesses animais, a espermatogênese apresenta eventos bioquímicos e morfofisiológicos característicos a nível citoplasmático e nuclear das células espermatogênicas que compõe o

epitélio germinativo, as quais passam por diferentes estágios e fases. No núcleo dessas células, é possível identificar a região organizadora de nucléolo (NOR) que consiste em parte de um cromossomo, e o nucléolo é uma estrutura que contém essa parte junto com o material que se aglomera ao redor dessa região, principalmente, rRNAs e proteínas específicas. Além disso, a produção de testosterona sintetizada pelas células de Leydig requer alterações metabólicas essenciais, para que a espécie possa se reproduzir e realizar o seu ciclo com a demanda hormonal adequada (Russell et al. 1990; Murray 2004; Beguelini et al. 2011b; Gupta et al. 2016; Morais et al. 2017; Ferreira et al. 2018).

Entre as espécies de morcegos existentes, *Phyllostomus discolor* (Wagner, 1843) faz parte da família Phyllostomidae, apresenta hábito alimentar onívoro e tem ampla adaptabilidade para viver tanto em ambientes preservados quanto em áreas urbanas (Bredt & Uieda 1996; Faria et al. 2006; Willig et al. 2007; Reis et al. 2011; Lima Junior et al. 2014). No estado de Pernambuco, o único estudo morfológico existente referente à reprodução de *P. discolor* é o de Lima Junior et al. (2014) realizado durante as estações seca e chuvosa, em área de Mata Atlântica desse estado. Contudo, ainda não se sabe se há influência da sazonalidade a nível tecidual e celular, sobre a reprodução dessa espécie; nem de que forma esta enfrenta esse processo, diante das variações ambientais que podem ocorrer em área de perímetro urbano no estado de Pernambuco.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar as características morfofisiológicas dos testículos e epidídimos de *P. discolor* durante os meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, situado na Mesorregião da Mata Pernambucana, na região Nordeste do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e animais

O estudo foi conduzido no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (IFPE) - *Campus* do município de Vitória de Santo Antão (08° 07' 05'' de latitude sul e 35° 17' 29'' de longitude oeste). Esse município pertence à Mesorregião da Mata Pernambucana e Microrregião da Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Nessa localidade o clima é quente e úmido do tipo tropical chuvoso, e a vegetação é constituída de forma predominante por formações de Floresta Estacional Semidecidual e de Floresta Ombrófila Densa (Morais et al. 2011; Costa 2012).

A captura dos animais foi feita mediante licença permanente cadastrada no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO (Nº: 22418-1) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio. E a realização da parte experimental foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (processo Nº: 23076. 039757/2016-81).

As coletas foram realizadas durante uma noite, em cada mês, ao longo dos meses de novembro de 2016 a novembro de 2017. Para isso, foram utilizadas 05 redes de neblina (12 m de comprimento x 3 m de altura) em cada noite de captura. Durante esse período, o esforço total de captura foi de 11700 m². h (Straube & Bianconi 2002).

Foram utilizados apenas espécimes machos adultos (n=12) da espécie *P. discolor* (n=06 – meses secos e n=06 – meses chuvosos). Para confirmar se o estágio de desenvolvimento do animal era adulto, considerou-se a metodologia de Anthony (1988) que se baseia em observações do grau de ossificação das epífises tanto dos metacarpos quanto das primeiras falanges das asas.

2.2 Dados meteorológicos

As informações meteorológicas, sobre as médias da precipitação (mm), temperatura (C°) e umidade do ar (%), foram disponibilizadas pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) – 3° Distrito. Para isso, foi considerada a estação meteorológica mais próxima de Vitória de Santo Antão que foi a do município de Recife - Pernambuco, uma vez que cada estação possui representação de um raio de 150 km de circunferência, partindo da estação considerada.

As médias mensais da precipitação foram utilizadas e associadas com os dados reprodutivos da espécie em estudo. Foram considerados os meses secos (setembro a fevereiro) e os meses chuvosos (março a agosto), com base no que já se tem relatado, em outras investigações, para as áreas de Mata Atlântica de Pernambuco (Lima Junior et al. 2014; Asfora et al. 2017).

2.3 Procedimento de eutanásia dos animais e coleta dos órgãos

Os machos de *P. discolor* foram eutanasiados. Primeiramente, foi aplicada uma anestesia na região intraperitoneal constituída por pentobarbital sódico com concentração de 40 mg/kg⁻¹, sendo inoculada, na sequência, uma solução saturada composta por cloreto de potássio (Morais et al. 2013b).

Para a coleta dos órgãos, foi feita uma incisão da pele e fâscias do escroto, na região inguinal, mediante manuseio de instrumentos apropriados para a microdissecção, de modo que os testículos e epidídimos ficassem expostos e fossem coletados.

2.4 Análises histológicas e citológicas

Os testículos e epidídimos foram fixados em solução de formalina a 10% neutra tamponada (NBF) durante um período de 24 horas e conservados em solução alcoólica a 70% e glicerizada a 5%. Depois passaram pelo processamento de acordo com a técnica histológica de rotina laboratorial (BEHMER et al. 1976; Rieder & Schmidt 1987). Os blocos de parafina produzidos foram cortados em micrótomo com ajuste para 4 µm (micrômetros) de espessura.

A partir desses cortes foram confeccionadas lâminas histológicas coradas por: H. E. (Hematoxilina – Eosina), para descrição geral dos testículos e epidídimos; AgNOR (regiões organizadoras nucleolares argirofílicas), para identificação das regiões organizadoras de nucléolos (NORs), por meio na visualização de pontos escuros presentes no interior dos núcleos de cada tipo celular considerado; e azul de toluidina com borato de sódio para quantificação dos diferentes tipos celulares encontrados no epitélio dos epidídimos. Depois de montadas, as lâminas foram submetidas às devidas análises em microscopia de luz.

2.5 Análises histomorfométricas e citomorfométricas

As lâminas dos testículos e epidídimos foram fotografadas em aumentos específicos no programa *ISCapture*. Para tanto, o microscópio óptico foi acoplado a um computador, no qual esse *software* estava instalado e possibilitou a visualização e captura das imagens. Para as mensurações e quantificações dos parâmetros histomorfométricos e citomorfométricos utilizou-se o *software ImageJ*.

Nos testículos corados por H. E. as áreas de ocupação do compartimento tubular (AOCT) e intertubular (AOCI) foram medidas em porcentagem (%). Para isso, foram utilizadas 10 fotomicrografias por animal em aumento total de 100X (Lima Junior et al. 2014). No compartimento tubular foi considerado o número de: células de Sertoli (CS),

espermatogônias (EPG), espermatócitos (EPC), espermatídes arredondadas (EAR) e espermatídes alongadas (EAL), de modo que se consideraram dez túbulos seminíferos por animal em aumento total de 400X. No compartimento intertubular, o número de células de Leydig (CL) foi quantificado em dez fotomicrografias diferentes por espécime, também em aumento de 400X. A contagem das células do compartimento tubular e intertubular foram transformadas e apresentadas em porcentagem (%).

As lâminas dos testículos coradas pela técnica AgNOR foram fotografadas em aumento de 1000X. Consideraram-se 10 células por fotomicrografia de cada tipo celular da linhagem espermatogênica (espermatogônias, espermatócitos e espermatídes). Foram obtidas 10 imagens diferentes por animal, resultando em 100 células de cada tipo anteriormente apresentado, totalizando 300 células por espécime (Chacur et al. 2015). Em cada um dessas células foram avaliados os seguintes parâmetros: número de região organizadora de nucléolo por célula (NNORC), área da região organizadora de nucléolo ocupada na célula (ANOROC), área do núcleo da célula (ANC), área da célula (AC), porcentagem do núcleo ocupada pela região organizadora de nucléolo (PNONOR) e porcentagem da célula ocupada por núcleo (PCON). O NNORC foi quantificado, as ANOROC, AN e AC foram mensuradas em micrômetros quadrados (μm^2), enquanto que as PNONOR e PCON foram expressas em percentual (%).

Nos epidídimos corados com H. E. foram mensurados em cada uma das regiões desses órgãos, o diâmetro do túbulo (DT), o diâmetro do lúmen (DL) e a altura do epitélio (AE). Esta última foi definida pela média aritmética de quatro medidas situadas diametralmente opostas, do epitélio de cada túbulo, cuja mensuração foi desde a base até a superfície apical. Foram considerados 20 cortes transversais tubulares de cada região por animal (Castro et al. 2017). As fotomicrografias utilizadas nessas medidas foram em aumento de 100X.

Ainda nos epidídimos corados por H. E. foi realizada a proporção volumétrica de cada uma das regiões, por meio da contagem de 2530 pontos projetados em 10 fotomicrografias diferentes por região de cada animal. Os pontos coincidentes foram quantificados no epitélio (Ep), lúmen (Lu), vasos sanguíneos (VS) e tecido conjuntivo (TC). O percentual de pontos obtidos para cada um desses componentes foi calculado por meio da fórmula: proporção volumétrica (%) = (número de pontos no componente / 2530 pontos no total) x 100. Já nas lâminas coradas com azul de toluidina e borato de sódio, foram quantificados três tipos de células: principais (CPr), basais (CBa) e apicais (CAp), do epitélio das três regiões do epidídimo. Para tanto, foram consideradas 10 secções por região de cada animal, de forma que foi verificada a distribuição relativa (%) desses tipos celulares (Castro et al. 2017).

2.6 Análises imuno-histoquímicas (PCNA e receptor de andrógeno)

As lâminas dos testículos passaram pelo processo de desparafinização (em xilol) e de reidratação (em álcoois). Na sequência, foram submetidas à recuperação antigênica, por meio do tampão citrato (pH 6,0), em elevada temperatura no micro-ondas (10 minutos). A peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio - 3%. Foram utilizados dois anticorpos primários: PCNA (Santa Cruz Biotechnology) e receptor de andrógeno (AR) (441): SC-7305 (Santa Cruz Biotechnology). Para bloquear a reação antígeno – anticorpo inespecífica do PCNA as lâminas foram incubadas em Tris/BSA (albumina sérica bovina) a 5%, enquanto que o do AR foi feito em PBS/BSA a 5%. O anticorpo anti PCNA foi diluído em Tris/BSA a 5% (1: 100), enquanto que o anticorpo anti AR foi diluído em PBS/BSA a 5% (1: 50). As lâminas foram distribuídas em câmara úmida e colocadas em overnight na geladeira. No dia seguinte, foram tratadas com o anticorpo secundário (30 minutos). A reação antígeno-anticorpo foi verificada por meio de um precipitado de cor marrom, após a aplicação

e revelação com DAB (3,3 diaminobenzidina) e contracorados com hematoxilina. As imagens foram capturadas por uma câmera de vídeo Sony, acoplada ao microscópio Olympus BX-50, com a objetiva 40X e submetidas ao aplicativo GIMP 2.0 para quantificação usando o histograma RGB (vermelho-verde-azul). Este se baseia na intensidade da luminescência, em que os tons de pixel da imagem variam de 0 (menos luminescência) a 255 (branco absoluto – maior luminescência) (Oberholzer et al. 1996; Lee et al. 2001). A contagem foi realizada usando um retículo WEIBEL de 25 pontos, seguido por uma ocular de 10x. Foram utilizadas três lâminas de cada um dos grupos, em que foram analisados 10 túbulos seminíferos, com uma objetiva de 10x. Em cada campo, 300 células do epitélio seminífero foram contadas e transformadas em porcentagem de células marcadas (Weibel 1963).

2.7 Dosagem hormonal

De cada espécime, foram coletadas amostras de sangue por meio de punção cardíaca do ventrículo esquerdo. As amostras foram submetidas às devidas análises dos níveis séricos do hormônio testosterona em pg/mL (picograma por mililitro) em um laboratório comercial.

2.8 Análises estatísticas

Inicialmente, foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para averiguar se a distribuição dos dados era normal. Após isso, utilizou-se o teste não paramétrico U de Mann-Whitney para avaliar os parâmetros dos testículos e epidídimos, bem como a dosagem hormonal ($p < 0,05$). Para as análises imuno-histoquímicas utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$). As médias e os desvios padrões desses parâmetros foram analisados por meio do programa SPSS (*Statistical Package of the Social Sciences*, SPSS inc. Chicago, EUA) versão 15.0.

3 RESULTADOS

Os testículos de *P. discolor*, exibiram a presença de células da linhagem espermatogênica (espermatogônias, espermatócitos, espermátides arredondadas e alongadas) e de células de Sertoli, no compartimento tubular; bem como células de Leydig, no compartimento intertubular durante os meses secos (Fig.1A) e chuvosos (Fig.1B). As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) foram visualizadas por meio de pontos escuros intranucleares nas espermatogônias, espermatócitos e espermátides. Esses pontos foram encontrados tanto de forma isolada, quanto agrupada nos meses secos (Fig. 2A) e chuvosos (Fig. 2B).

Os epidídimos são constituídos pelo ducto epididimário (epitélio e lúmen) e interstício (tecido conjuntivo e vasos sanguíneos). No ducto, há as regiões da cabeça (CA), do corpo (CP) e da cauda (CAU), de modo que se constatou concentração de espermatozoides nas regiões do CP e, principalmente, na CAU. O epitélio é do tipo pseudoestratificado com estereocílios, e possui diferentes tipos celulares, em que foi observado a presença das células principais (CPr), basais (CBa) e apicais (CAp). As CPr possuem forma colunar e situa-se desde a membrana basal do ducto até o lúmen; já as CBa encontram-se na parte basal do epitélio e possuem núcleo com formato alongado; e as CAp têm núcleo com forma que varia de oval a esférica, cuja localização deste encontra-se na porção apical do epitélio. Isso foi constatado em meses secos (Fig. 3) e chuvosos (Fig. 4).

A histomorfometria testicular revelou que de todos os parâmetros avaliados, apenas os EPC ($p=0,001$) e as EAR ($p=0,006$) foram significativos, com médias maiores nos meses secos (Fig. 5A). Na dosagem dos níveis séricos de testosterona (Fig. 5B), e na imunomarcção com PCNA (Fig. 6) e receptor de andrógeno (AR) (Fig. 7) não houve diferenças significativas entre os meses. Na citologia, as espermatogônias apresentaram

diferenças nos parâmetros: área da região organizadora de nucléolo ocupada na célula (ANOROC), área da célula (AC), porcentagem do núcleo ocupada pela região organizadora de nucléolo (PNONOR) e porcentagem da célula ocupada por núcleo (PCON) (Tab. 1). Nos espermátócitos e nas espermátides, todos os parâmetros avaliados apresentaram médias maiores nos meses chuvosos (Tab. 2 e 3).

Na proporção volumétrica do epidídimo, o epitélio (Ep) e o lúmen (Lu) da cabeça (CA), corpo (CP) e cauda (CAU) demonstraram médias maiores nos meses secos. Já os vasos sanguíneos (VS) e o tecido conjuntivo (TC) dessas regiões apresentaram médias maiores em meses chuvosos (Tab. 4). Na altura do epitélio (AE), diâmetro do túbulo (DT) e diâmetro do lúmen (DL) da CA, CP e CAU, houve diferenças ao longo dos meses secos. Os parâmetros relacionados ao lúmen e túbulo epididimário apresentaram um aumento progressivo, à medida que se direcionava da região da cabeça à cauda. Em contrapartida, os do epitélio, evidenciaram uma diminuição gradual da cabeça à cauda, a qual se revelou como a região mais ampla dentre as três consideradas (Tab. 5).

As células principais (CPr) foram as mais abundantes, seguida das basais (CBa) e as menos abundantes foram as células apicais (CAp). Na região da cabeça, foi encontrada uma maior distribuição de CAp em meses secos. Na região do corpo, as CBa apresentaram diferenças maiores nos meses chuvosos, enquanto que as CAp em meses secos. Na cauda, as CPr e CAp tiveram médias maiores em meses secos, já as CBa em meses de chuva (Tab. 6).

4 DISCUSSÃO

A espécie *Phyllostomus discolor* apresentou atividade esteroidogênica ao longo de ambos os períodos. Certamente, ocorreu uma atuação simultânea da testosterona com o hormônio folículo estimulante (FSH) expelido pela hipófise, que se liga a receptores específicos na membrana das células de Sertoli. Como estas são reguladores do processo de espermatogênese, atuam na nutrição e suporte dos mecanismos bioquímicos das células germinativas, bem como secretam substâncias como a proteína de ligação de andrógenos (ABP), que contribuem no aumento da proliferação e diferenciação celular, auxiliando a manutenção desse processo. Assim, quando há a liberação do hormônio luteinizante (LH), as células de Leydig são estimuladas a secretarem a testosterona em quantidades crescentes que atravessam os capilares sanguíneos e linfáticos até chegar ao epitélio seminífero. Então, pelos resultados obtidos, *P. discolor* realiza esses mecanismos de maneira contínua independentemente da época considerada (Counis et al. 2005; Ross & Pawlina 2008; Shupe et al. 2011; Beguelini et al. 2013b; 2015; Morais et al. 2013a, 2014a, 2017; Lima Junior et al. 2018b).

Com base no percentual do quantitativo de células, apenas os espermatócitos e as espermátides arredondadas demonstraram diferenças, indicando que essa espécie apresentou maior atividade no final do seu processo de espermatogênese durante os meses secos, para logo na sequência ocorrer a espermiogênese. Isso pode ser explicado porque os espermatócitos passam por duas divisões meióticas até darem origem às espermátides em estágio inicial, o que faz essa espécie começar o processo de diferenciação dessas espermátides ainda durante esses meses, completando-o através da transformação em espermátides alongadas e, conseqüentemente, espermatozoides durante os meses chuvosos (Russell et al. 1990; Ross & Pawlina 2008).

Além da contagem das células, é necessário considerar as variações que acontecem no meio intracelular através das regiões organizadoras de nucléolo (NORs), que na maior parte dos parâmetros das espermatogônias, e em todos dos espermatócitos e espermátides, foram maiores em meses chuvosos. Como o nucléolo é uma estrutura encontrada no núcleo e está relacionada à síntese proteica, a espécie *P. discolor* apresentou maior atividade na produção de proteínas nesses tipos celulares durante os meses de elevados índices pluviométricos. Isso se explica pela relação direta com o número de NORs, de forma que quanto maior for esse quantitativo, maior será a atividade (Derenzini et al. 1994; Ruschoff et al. 1994; Ribeiro et al. 2015). A quantidade de NORs também está relacionada de forma inversamente proporcional ao tempo do ciclo celular, durante o qual ocorrem modificações na morfologia dos nucléolos advindas da movimentação, crescimento e proximidade estabelecida entre essas estruturas na célula. Essas identificações são possíveis, devido às proteínas não histonas apresentarem sítio de ligação com o RNAr e possuírem atração pelo nitrato de prata, que faz com que entrem em reação e constituam grânulos de nucléolos que podem se apresentar isoladamente ou em grupos (Russell et al. 1990; Freitas & Serafim 1998; Matsumoto, 1996; De Rooij & Gootegoed 1998; Treré 2000; Peruquetti et al. 2008; 2010; Beguelini et al. 2011b).

Ainda durante os meses chuvosos, *P. discolor* apresentou nos epidídimos um maior suporte de tecido conjuntivo e uma maior vascularização para manter a temperatura adequada nesses órgãos e garantir a viabilidade dos espermatozoides até estarem prontos para serem expelidos pela ejaculação. Nos meses secos, o aumento do ducto epididimário e epitélio, indicou maior funcionalidade das células que o constituem, assim como o aumento do ambiente luminal revelou um período de preparação para receber as células reprodutoras masculinas nas regiões da cabeça, corpo e cauda (Cervantes et al. 2008; Robaire & Hamzeh 2011; Beguelini et al. 2015; Robaire & Hinton 2015; Castro et al. 2017).

Nos meses secos, o aumento das células apicais em todas as regiões do epidídimo, está relacionado a uma maior proteção dos espermatozoides aos ataques eletrofilicos, já que essas células possuem diversas enzimas proteolíticas (Serre & Robaire 1998; Hermo & Robaire 2002; Cornwall 2009). Já as células principais aumentaram na região da cauda em meses secos, o que se explica por uma maior atuação na separação de substâncias como a glicerofosfolina, o ácido siálico e as glicoproteínas, presentes no fluido do epidídimo. Além também de secretarem e absorverem diversas substâncias, fagocitarem espermatozoides degenerados, bem como controlarem a homeostasia de acordo com as condições locais em que essa espécie está inserida (Oliveira et al. 2013; Beguelini et al. 2015; Robaire & Hinton, 2015). As células basais apresentaram-se mais elevadas no corpo e cauda em meses chuvosos, o que pode estar associado a uma maior afinidade dessas células nesse período pelo processo de acidificação do lúmen, o qual é fundamental especialmente na região da cauda, pois possibilitará que os espermatozoides sejam maturados permaneçam inativos e estocados por períodos diversos em um microambiente luminal com condições ideais para sobrevivência e motilidade dessas células (Beguelini et al. 2010; 2015; Kim et al. 2015; Roy et al. 2016; Castro et al. 2017).

Diante dessas constatações, *P. discolor* possui flexibilidade nas suas condições morfofisiológicas ao longo do ano. As variações constatadas ou até mesmo a ausência destas, na atividade de alguns parâmetros testiculares e epididimários, indicam que essa espécie está empenhada em organizar seja o quantitativo de células ou toda a maquinaria do núcleo e dos componentes do citoplasma, para ofertar condições adequadas que garantam a fertilidade de suas células reprodutoras durante o ciclo reprodutivo. Uma das situações a que isso pode estar relacionado, refere-se ao sistema de harém e acasalamento poligínico, para assegurar a cópula de acordo com a demanda de fêmeas em fase reprodutiva (Beguelini et al. 2013b; Morais et al. 2013a; 2014a; 2017; Lima Junior et al. 2018b).

Essa plasticidade acontece também porque em ambientes urbanizados, os morcegos são mais adaptáveis às condições de abrigo e alimentação existentes; e como essa espécie é onívora, passa a incluir diferentes itens em sua dieta que varia de acordo com o que encontra disponível em determinada época. Isso influencia a reprodução da espécie que necessita obter e armazenar energia que seja suficiente durante a estação de acasalamento, uma vez que os mecanismos envolvidos no processo de espermatogênese requerem elevado dispêndio energético. Essa estocagem de energia, associada ao padrão metabólico da espécie faz com que os machos possam alocar as demandas necessárias para manutenção do seu ciclo reprodutivo em consonância com o das fêmeas. Por conta desses aspectos, muitos parâmetros avaliados não foram significativos, pois os machos de *P. discolor* necessitam está sempre se ajustando à reprodução com base nas variações ambientais que ocorrem (Barros et al. 2013; Morais et al. 2013a; 2014a; 2017; Esbérard et al. 2014; Lima Junior et al. 2014; 2018a; Russo & Ancillotto 2015).

Em conclusão, embora *P. discolor* tenha apresentado algumas variações na sua atividade reprodutiva entre os meses secos e chuvosos, nota-se que essa espécie possui estratégias que a faz ser adaptável para se reproduzir em qualquer época do ano. Esse ajuste está relacionado com a necessidade da espécie para acasalar e gerar prole em épocas que sejam adequadas, diante das condições ambientais ofertadas em área urbanizada no interior do estado de Pernambuco.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida ao primeiro autor durante o doutorado.

5 LITERATURA CITADA

- ANTHONY, E. L. P. 1988. Age determination in bats. In: KUNZ, T. H. ed. Ecological and behavioral methods for the study of bats. Washington, Smithsonian Institution 47 – 58.
- ARANDAS, M. J. G. et al. 2019. Seasonal influence on testicular morphophysiological parameters of bat *Carollia perspicillata* in fragments of the Atlantic Forest, northeastern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 39 (6): 429 – 433.
- ASFORA, M. C., M. LIMA, & M. R. S. LACERDA. 2017. Diagnóstico da seca 2011-2016 em Pernambuco: impactos e políticas de mitigação. *Parcerias Estratégicas*, Brasília, DF 22 (44): 247 – 274.
- BARROS, M. S. et al. 2013. Seasonal variation of energy reserves and reproduction in neotropical free-tailed bats *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Brazilian Journal of Biology* 73 (3): 629 – 635.
- BEGUELINI, M. R., B. F. S. SERGIO, F. L. J. LEME, S. R. TABOGA, & E. MORIELLE-VERSUTE. 2010. Morphological and morphometric characteristics of the epididymis in the Neotropical bats *Eumops glaucinus* and *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Chiroptera Neotropical* 16 (2): 769 – 779.
- BEGUELINI, M. R., R. M. GOES, S. R. TABOGA, & E. MORIELLE-VERSUTE. 2013c. 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* 26: 834 – 846.
- BEGUELINI, M. R., C. C. I. PUGA, F. F. MARTINS, A. H. S. BETOLI, S. R. TABOGA, & E. MORIELLE-VERSUTE. 2013a. Morphological Variation of Primary Reproductive Structures in Males of Five Families of Neotropical Bats. *The Anatomical Record* 296: 156 – 167.

- BEGUELINI, M. R., C. C. I. PUGA, S. R. TABOGA, & E. MORIELLE-VERSUTE. 2013b. Annual reproductive cycle of males of the flat-faced fruit-eating bat, *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). *General and Comparative Endocrinology* 185: 80 – 89.
- BEGUELINI, M. R., R. M. GOES, P. RAHAL, E. MORIELLE-VERSUTE, & S. R. TABOGA. 2015. Impact of the Processes of Total Testicular Regression and Recrudescence on the Epididymal Physiology of the Bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *PLOS One* 1 – 18.
- BEGUELINI, M. R., S. R.C. MARCHESIN, M.T.V. AZEREDO-OLIVEIRA, & E. MORIELLE-VERSUTE. 2011b. Nucleolar behavior during meiosis in four species of Phyllostomid bats (Chiroptera, Mammalia). *Genetics and Molecular Research*, 10: 552–565.
- BEHMER, O. A., E. M. C. TOLOSA, & A. G. F. NETO. 1976. *Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica*. Edart, Universidade de São Paulo, São Paulo. 239p.
- BELLEANNEE, C., V. THIMON, & R. SULLIVAN. 2012. Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell Tissue Research* 349 (3): 717 – 31.
- BREDT, A., & W. UIEDA. Bats from urban and rural environments of the Distrito Federal, mid-western Brazil. 1996. *Chiroptera Neotropical* 2 (2): 54 – 57.
- CASTRO, M. M. et al. 2017. Ultrastructure and morphometric features of epididymal epithelium in *Desmodus rotundus*. *Micron* 102: 35 – 43.
- CERVANTES, M. I., E. ARENAS-RIOS, M. A. LEÓN-GALVÁN, R. LÓPEZ-WILCHIS , D. AMBRIZ, & A. ROSADO . 2008. Spermatozoa Epididymal Maturation in the Mexican Big-Eared Bat (*Corynorhinus Mexicanus*). *Systems Biology in Reproductive Medicine* 54: 196 – 204.

- CHACUR, M.G.M. et al. 2015. Avaliação da técnica de coloração AgNOR em testículos de ovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 67 (2): 447-454.
- CHRISTANTE, C. M. et al. 2015. Structure, histochemistry and seasonal variations of the male reproductive accessory glands in the Pallas's mastiff bat, *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Reproduction, Fertility and Development*, 27: 313 - 322.
- COOPER, T. 1999. Epididymis. En: E. Knobil y DJ Neill, ed. *Encyclopedia of reproduction*. Academic Press 2:1 - 17.
- CORNWALL, G. A. 2009. New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update* 15 (2): 213 – 227.
- COSTA, C. 2012. Uma Floresta de oportunidades: um novo olhar sobre a Mata Atlântica do Nordeste. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 56 p.
- COUNIS, R. et al. 2005. Gonadotropin – Releasing Hormone and the control of gonadotrope function. *Reproduction Nutrition Development* 45: 243 – 254.
- CRICHTON, E. G., & P. H. KRUTZSCH. 2000. *Reproductive Biology of Bats*. Academic Press. 510 p.
- DERENZINI, M., V. SIRRI, & D. TRERÈ. 1994. Nucleolar organizer regions in tumor cells. *The Cancer Journal*, 7: 71-74.
- DE ROOIJ, D. G., & J. A. GOOTEGOED. 1998. Spermatogonial stem cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 10: 694 – 701.
- ESBÉRARD, C. E. L., J. L. LUZ, L. M. COSTA, & H. G. BERGALLO. 2014. Bats (Mammalia, Chiroptera) of an urban park in the metropolitan area of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. *Iheringia, Série Zoologia* 104: 59 – 69.
- FARIA, D., R. R. LAPS, J. BAUMGARTEN, & M. CETRA. 2006. Bat and bird assemblages from forests and shade cacao plantations in two contrasting landscapes

- in the Atlantic Forest of southern Bahia, Brazil. *Biodiversity and Conservation* 15 (2): 587 – 612.
- FERREIRA, M., A. SOLDATI, S. S. S. RODRIGUES, & L. A. BENJAMIN. 2018. Implications of body condition and seasonality on morphological and functional parameters of testes of *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Reproduction, Fertility and Development* 30:1029 – 1037.
- FREITAS, R. A., & F. M. A. SERAFIM. 1998. Regiões organizadoras nucleolares (AgNORs) em cisto dentífero e ceratocisto odontogênico. *Revista da Pós-Graduação*, 5 (3): 202-5.
- GUPTA, B., S. CHANDRA, V. RAJ, & V. GUPTA 2016. Quantitative analysis of Argyrophilic Nucleolar organizer regions in odontogenic cysts and tumor – A comparative study. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* 8(2): 94–97.
- HERMO, L., & ROBAIRE, B. 2002. Epididymal cell types and their functions. In: Robaire B., Hinton B. T., editors. *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publisher 6: 81 – 102.
- KIM, B., J. ROY, W. W. SHUM, N. DA SILVA, & S. BRETON. 2015. Role of testicular luminal factors on Basal cell elongation and proliferation in the mouse epididymis. *Biology of Reproduction* 9: 1 – 11.
- LEE, E. S., J. H. KIM, S. IM, K. B. LEE, S. SOHN, & W. H. KANG. 2001. Application of computerized image analysis in pigmentary skin diseases. *International Journal of Dermatology* 40: 45 – 9.
- LIMA JUNIOR, N. B., M. J. G. ARANDAS, K. S. N. MARINHO, F. C. A. AGUIAR JÚNIOR; A. R. M. PONTES, & K. R. P. SANTOS. 2014. Histomorfometria testicular do morcego *Phyllostomus discolor* (Chiroptera: Phyllostomidae) em áreas de Mata

- Atlântica de Pernambuco. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science 51 (3): 263 – 270.
- LIMA JUNIOR, N. B. et al. 2018b. Analysis of the reproductive stage and ovarian histomorphometry of *Dermanura cinerea* (Chiroptera: Phyllostomidae) in an Atlantic Forest fragment of Pernambuco, northeastern Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira 38 (1): 167 – 174.
- LIMA JUNIOR, N. B. et al. 2018b. Estágio reprodutivo, histologia e morfometria sazonal do testículo de *Dermanura cinerea* (Chiroptera: Phyllostomidae) em fragmento de Mata Atlântica no Litoral Sul de Pernambuco, Brasil. Iheringia, Série Zoologia 108 (0).
- MATSUMOTO, A.M. 1996. Spermatogenesis. Pp. 360–384, in Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology (E.Y. ADASHI, J.A. ROCK, Z. ROSENWAKS, eds). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- MORAIS, D. B., M. S. BARROS, M. B. D. FREITAS, T. A. R. PAULA, & S. L. P. MATTA. 2014a. Histomorphometric characterization of the intertubular compartment in the testes of the bat *Sturnira lilium*. Animal Reproduction Science 147 (3 – 4): 180 – 186.
- MORAIS, D. B. et al. 2013a. Organization and seasonal quantification of the intertubular compartment in the bat *Molossus molossus* (Pallas, 1776) testis. Microscopy Research and Technique, 76 (1): 94 – 101.
- MORAIS, D. B., T. A. R. PAULA, M. S. BARROS, M. K. BALARINI, M. B. D. FREITAS, & S. L. P. MATTA. 2013b. Stages and duration of the seminiferous epithelium cycle in the bat *Sturnira lilium*. Journal of Anatomy 222: 372 – 379.
- MORAIS, D. B., L. C. H. P. PUGA, T. A. R. PAULA, M. B. D. FREITAS, & S. L. P. MATTA. 2017. The spermatogenic process of the common vampire bat *Desmodus rotundus* under a histomorphometric view. PLoS ONE 12 (3): e0173856.

- MORAIS, P. H. F., J. A. ÁLVARES, L. JATOBÁ, & D. A. H. BASTOS. 2011. História da Vitória de Santo Antão: 1983 a 2010. 1.ed. Vitória de Santo Antão: CEPE, 595 p.
- MURRAY, A.W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclings revisited. *Cell*, 116: 221-234.
- PERUQUETTI, R.L., I.M. ASSIS, S.R. TABOGA, & M.T. AZEREDO-OLIVEIRA. 2008. Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. *Micron* 39: 419-425.
- PERUQUETTI, R.L., S.R. TABOGA, & M.T. Azeredo-Oliveira. 2010. Characterization of Mongolian gerbil chromatoid bodies and their correlation with nucleolar cycle during spermatogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*, 45: 399-406.
- OBERHOLZER, M., M. OSTREICHER, H. CHRISTEN, & M. BRUHMANN.1996. Methods in quantitative image analysis. *Histochemistry and Cell Biology* 105: 333 – 355.
- OLIVEIRA, R. L., A. J. SILVA, A. B. GERMÁN, & A. C. MAHECHA. 2013. Differential expression and seasonal variation on aquaporins 1 and 9 in the male genital system of big fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. *General and Comparative Endocrinology* 186: 116 – 125.
- REIS, N. R., A. L. PERACCHI, A. W. PEDRO, & I. P. LIMA. 2011. Mamíferos do Brasil. 2ed. Londrina, Editora da Universidade Estadual de Londrina. 439p.
- RIBEIRO, C.V., A.C. VASCONCELOS, & J.S. ANDRADE FILHO. 2015. Apoptosis and expression of argyrophilic nucleolus organizer regions in epithelial neoplasms of the larynx. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 81: 158 –166.
- RIEDER, N., & K. SCHMIDT. 1987. *Morphologische Arbeitsmethoden in der Biologie*. Germany: Verlagsgesellschaft mbH.
- ROBAIRE, B., & HAMZEH, M. 2011. Androgen action in the epididymis. *Journal of Andrology*, 32: 592 – 599.

- ROBAIRE, B., & B. T. HINTON. 2015. The Epididymis. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (4th edition). Academic Press 691 – 771.
- ROSS, M. H., & W. PAWLINA. 2008. Histologia: texto e atlas: em correlação com biologia celular e molecular. 5. ed. Rio de Janeiro; Buenos Aires [Argentina]: Guanabara Koogan: Panamericana.
- ROY, J. et al. 2016. Tyrosine kinase-mediated axial motility of basal cells revealed by intravital imaging. Nature Communications, p.1 – 11.
- RUSCHOFF, J., G. FAUSER, R. KNÜCHEL, & F. HOFSTÄDTER. 1994. AgNOR quantification with special reference to staining patterns. Zentralblatt für Pathologie, 140: 23-30.
- RUSSELL, L. D., ETTLIN, R. A., SINHA HIKIM, A. P., CLEGG, E. D. Mammalian spermatogenesis 1990. In: Russell, L.D., Ettlín, R. A., Sinha Hikim, A. P., Clegg, E. D. (Eds). Histological and histopathological evaluation of the testis Cache River Press, Clearwater, Florida, p. 1 – 40.
- RUSSO, D., & ANCILLOTTO, L. 2015. Sensitivity of bats to urbanization: a review. Mammalian Biology 80 (3):205–212.
- SERRE, V, & B. ROBAIRE. 1998. Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. Biology of Reproduction 58: 497 – 513.
- SHUPE, J., J. CHENG, J, P. PURI, N. KOSTEREVA, & W. H. WALKER. 2011. Regulation of sertoli – germ cell adhesion and sperm release by FSH and nonclassical testosterone signaling. Molecular Endocrinology 25 (2): 238 – 52.
- SOUZA, A. C. F. et al. 2018. Reproductive functions in *Desmodus rotundus*: A comparison between seasons in a morphological context. PLoS ONE 13 (10) e0205023.

- STRAUBE, F.C., & G. V. BIANCONI. 2002. Sobre a grandeza e a unidade utilizada para estimar esforço de captura com utilização de redes-de-neblina. *Chiroptera Neotropical* 8: 1-2.
- TOBÓN, A. R., E. ARENA-RÍOS, & M. A. LÉON-GALVÁN, M. A. 2010. El almacenamiento prolongado de espermatozoides en el epidídimo, adaptación que permite sincronizar el periodo de apareamientos en murciélagos. *ContactoS* 78: 58 – 64.
- TRERÉ, D. 2000. AgNOR staining and quantification. *Micron*, 31: 127-131.
- WEIBEL, E.R. 1963. Princípios e métodos para o estudo morfométrico do pulmão e outros órgãos. *Laboratory Investigation* 12: 131 – 155.
- WILLIG, M. R. et al. 2007. Phyllostomid bats of lowland Amazonia: Effects of habitat alteration on abundance. *Biotropica* 39 (6): 737 – 746.

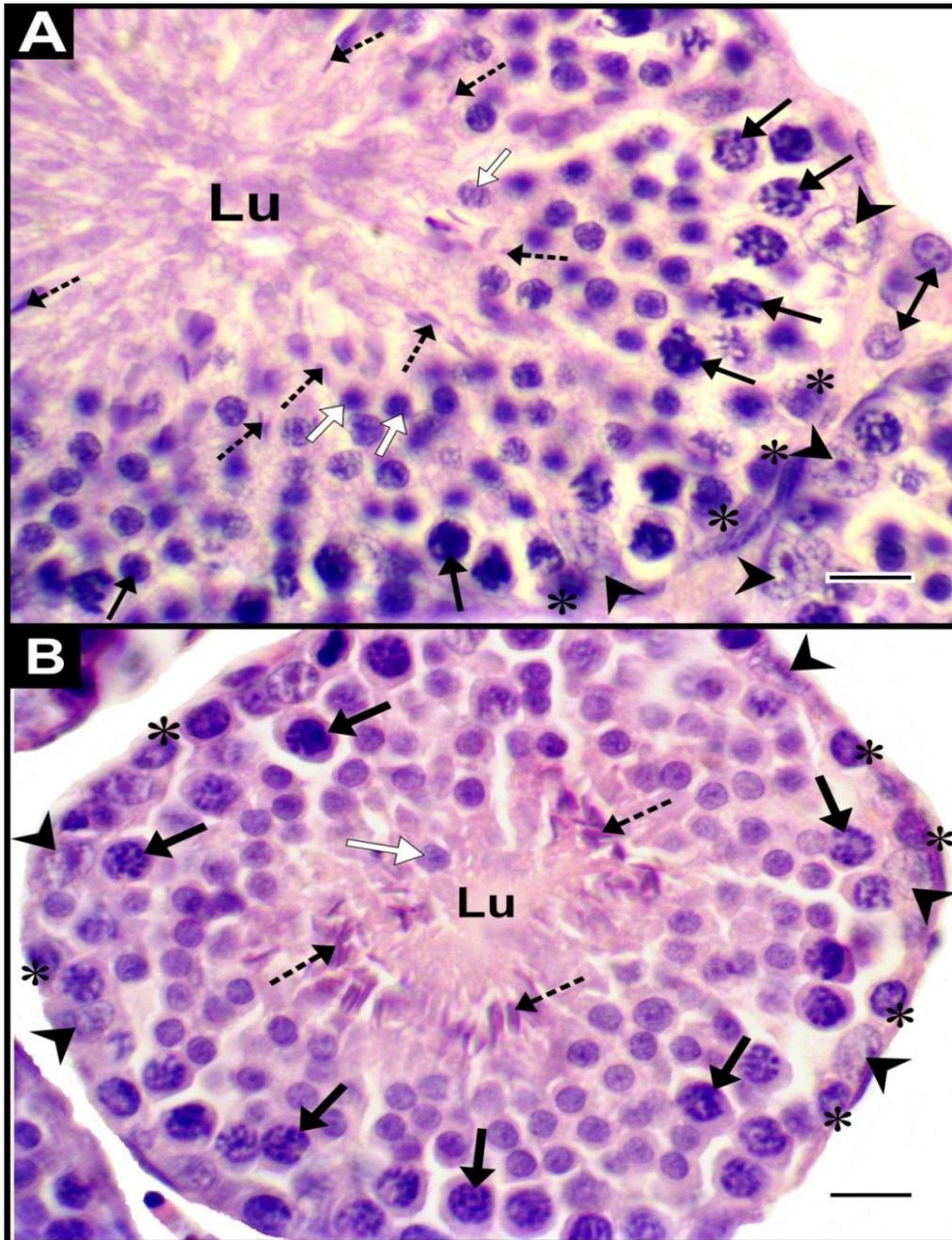


Fig. 1: Fotomicrografias dos testículos de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos (A) e chuvosos (B) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Observar o epitélio seminífero com células de Sertoli (cabeça de seta) e da linhagem espermatogênica em diferentes estágios de maturação – espermatogônias (asteriscos), espermatócitos (setas pretas), espermátides arredondadas (setas brancas), espermátides alongadas (setas pontilhadas) –, e o lúmen (Lu) no compartimento tubular. Notar também as células de Leydig (seta de duas cabeças) distribuídas ao longo do compartimento intertubular. Coloração: Hematoxilina – Eosina . Barras de escala = 10 μ m.

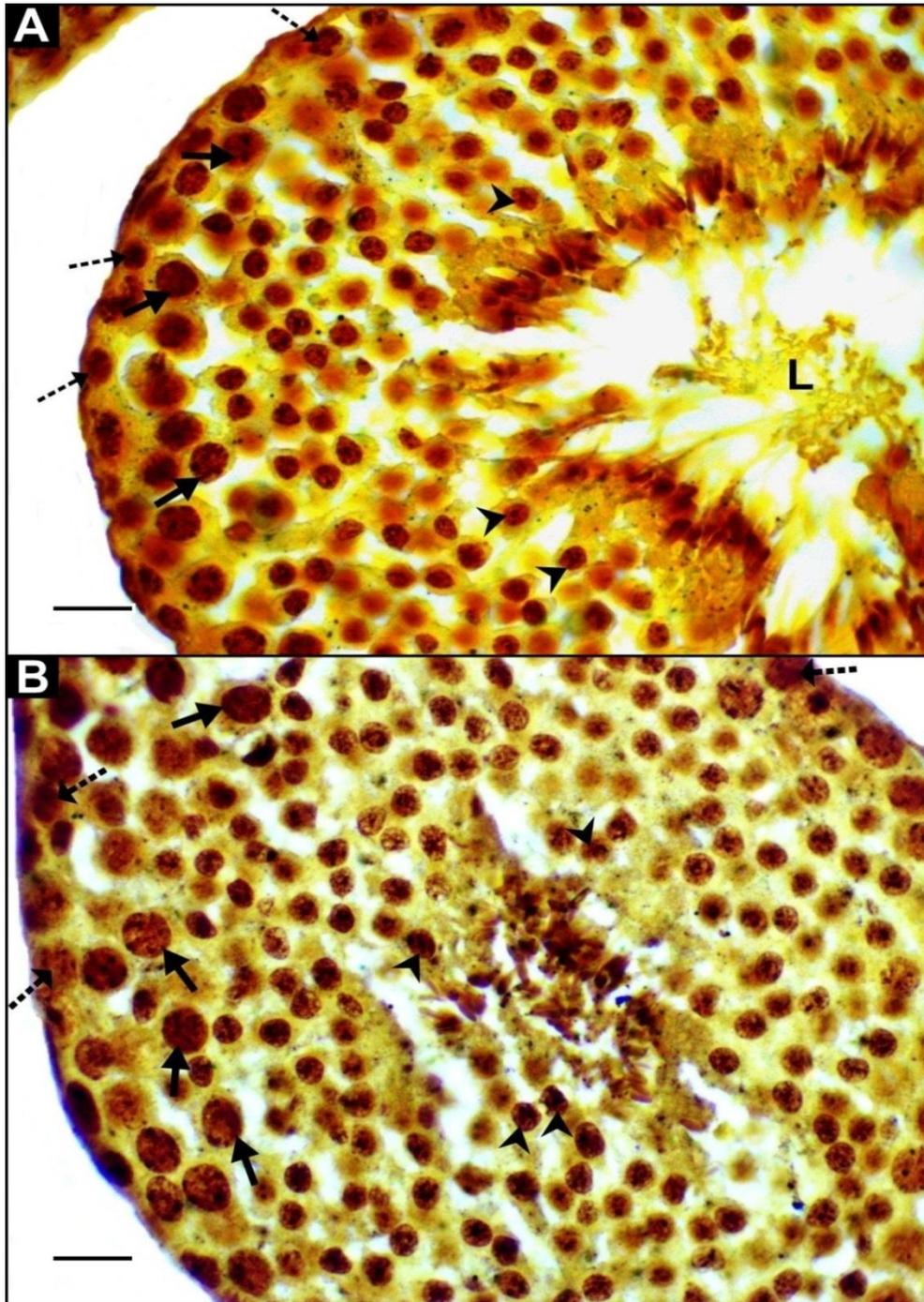


Fig. 2: Fotomicrografias dos túbulos seminíferos dos testículos de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos (A) chuvosos (B) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Observar as Regiões organizadoras de nucléolos (NORs) – pontos escuros – no interior dos núcleos das células da linhagem espermatogênica em diferentes estágios de maturação no epitélio germinativo. Espermatogônias (setas pontilhadas), espermatócitos (setas contínuas), espermatídes (ponta de setas). L=Lúmen. Coloração: AgNOR. Barras de escala = 10 μ m.

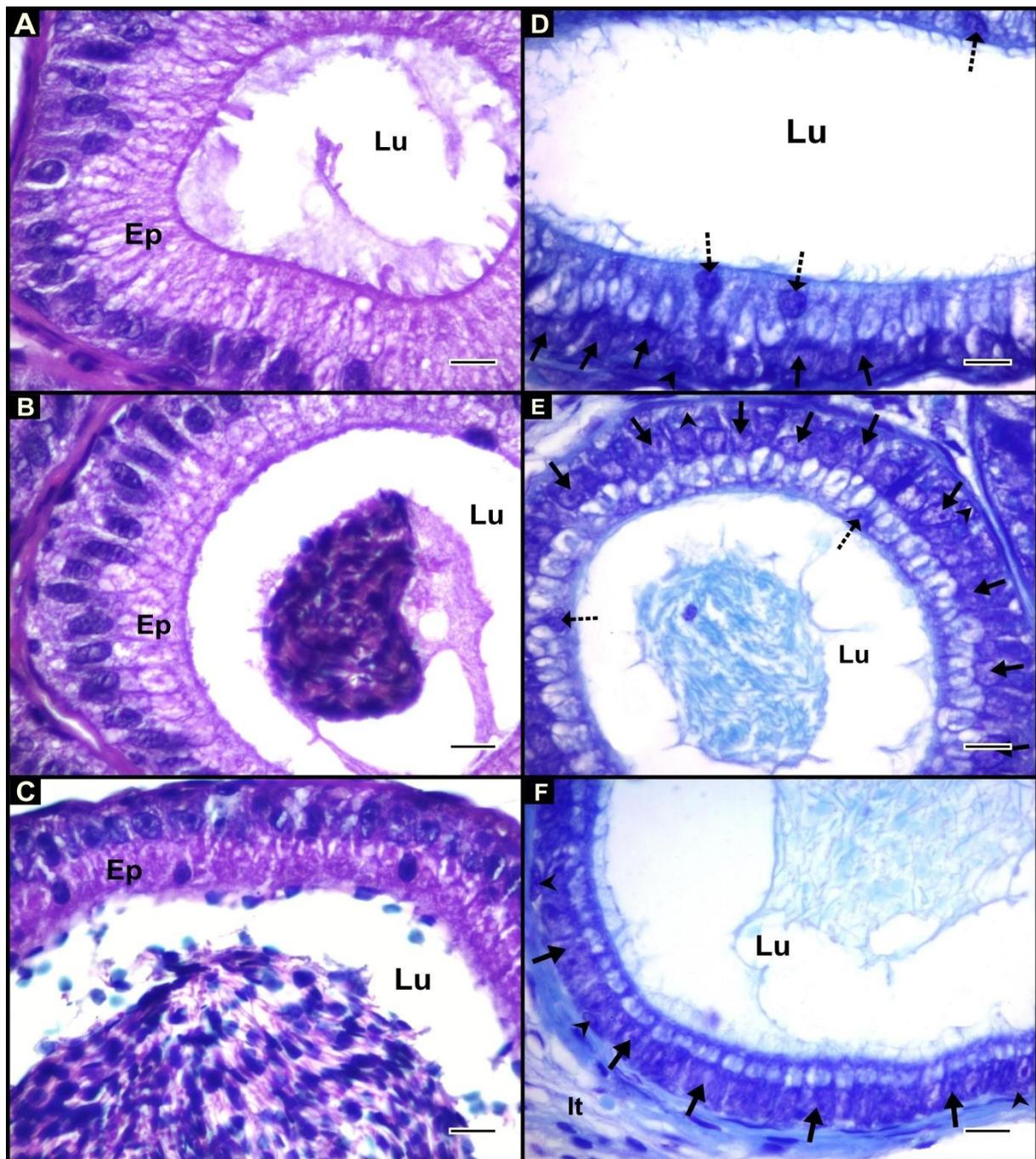


Fig. 3: Fotomicrografias das três regiões (cabeça – A e D; corpo – B e E; cauda – C e F) do epidídimo de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Notar o epitélio (Ep) e Lúmen (Lu) em cada uma dessas regiões. Observar também os tipos celulares encontrados no epitélio: células principais (setas pretas), células basais (cabeça de seta) e células apicais (setas pontilhadas). Colorações: H. E. (A, B e C) e azul de toluidina com borato de sódio (D, E e F). Barras de escala = 10 µm.

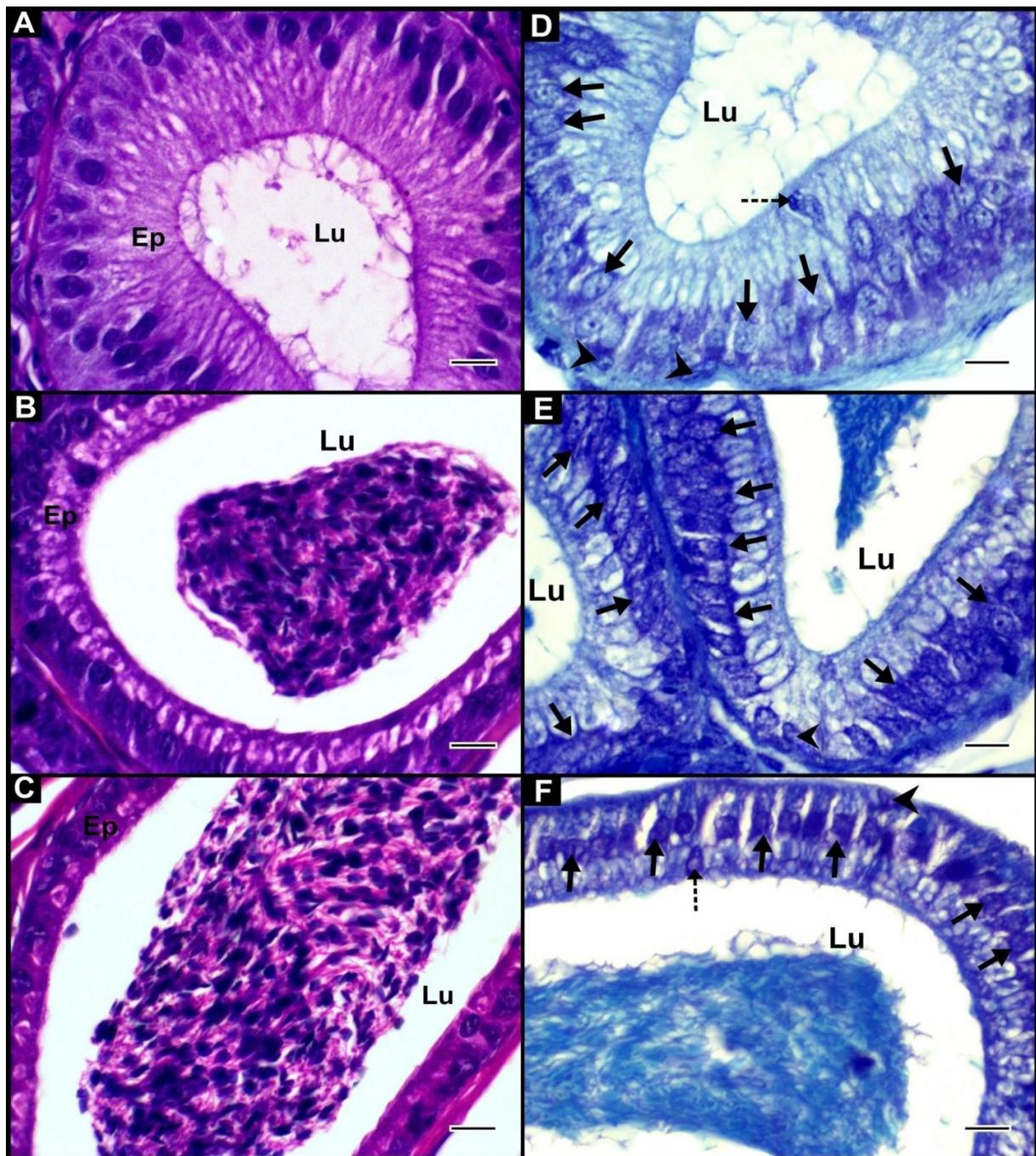


Fig. 4: Fotomicrografias das três regiões (cabeça – A e D; corpo – B e E; cauda – C e F) do epidídimo de *Phyllostomus discolor* coletados em meses chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Notar o epitélio (Ep) e Lúmen (Lu) em cada uma dessas regiões. Observar também os tipos celulares encontrados no epitélio: células principais (setas pretas), células basais (cabeça de seta) e células apicais (setas pontilhadas). Colorações: H. E. (A, B e C) e azul de toluidina com borato de sódio (D, E e F). Barras de escala = 10 μ m.

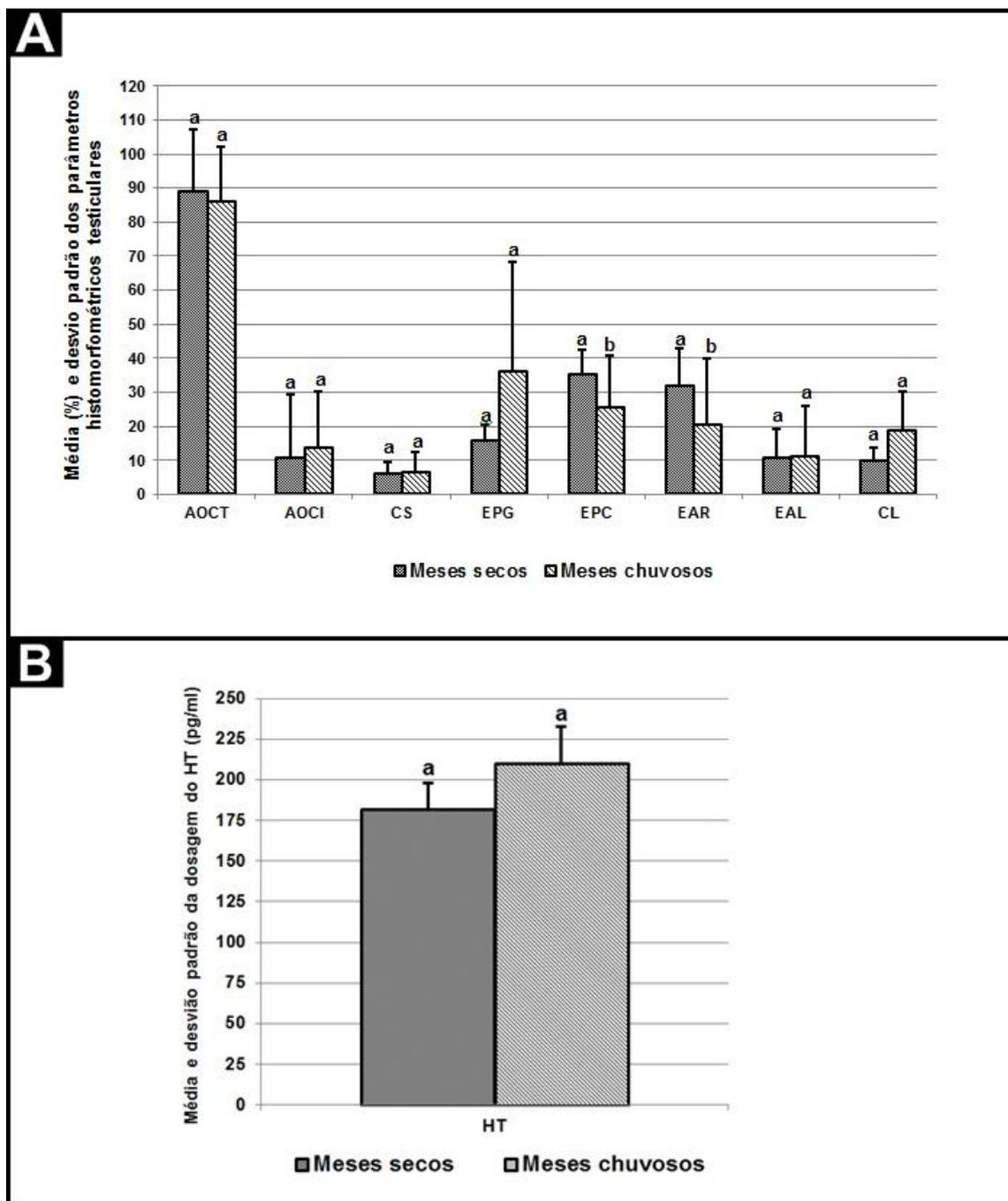


Fig. 5: Parâmetros histomorfológicos testiculares (A) e dosagem do hormônio testosterona – HT (B) de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. AOCT (área de ocupação do compartimento tubular), AOI (área de ocupação do compartimento intertubular), CS (células de Sertoli), EPG (espermatozóides), EPC (espermatozóitos), EAR (espermatozóides arredondados), EAL (espermatozóides alongados) e CL (células de Leydig). Médias seguidas por letras diferentes (a, b), em cada parâmetro, diferem significativamente entre si pelo teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

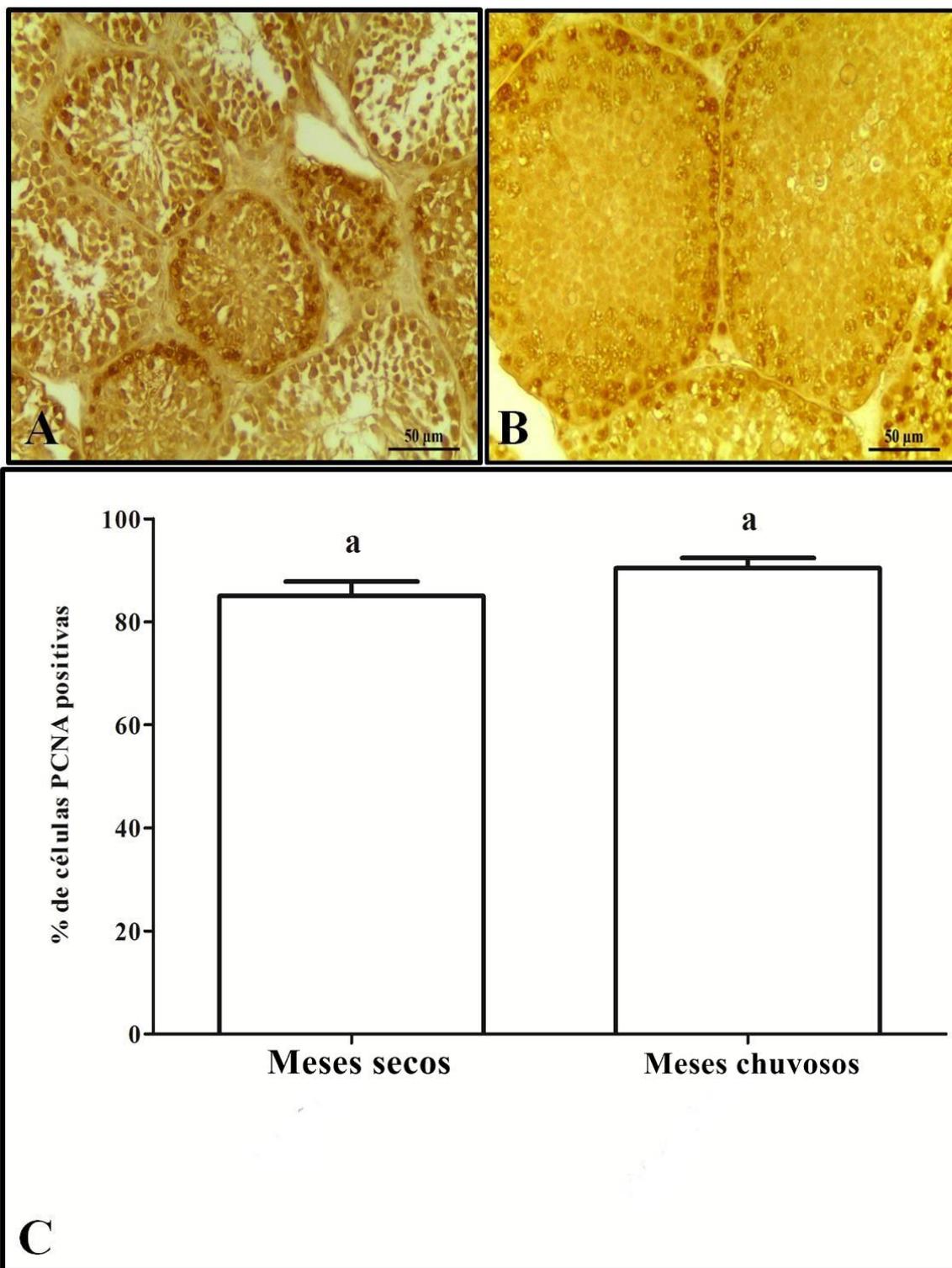


Fig. 6: Imuno-histoquímica do PCNA nos testículos de *P. discolor* coletados nos meses chuvosos (A) e secos (B). Observar ainda a quantificação, em percentual, de células PCNA positivas nos meses secos e chuvosos (C) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$).

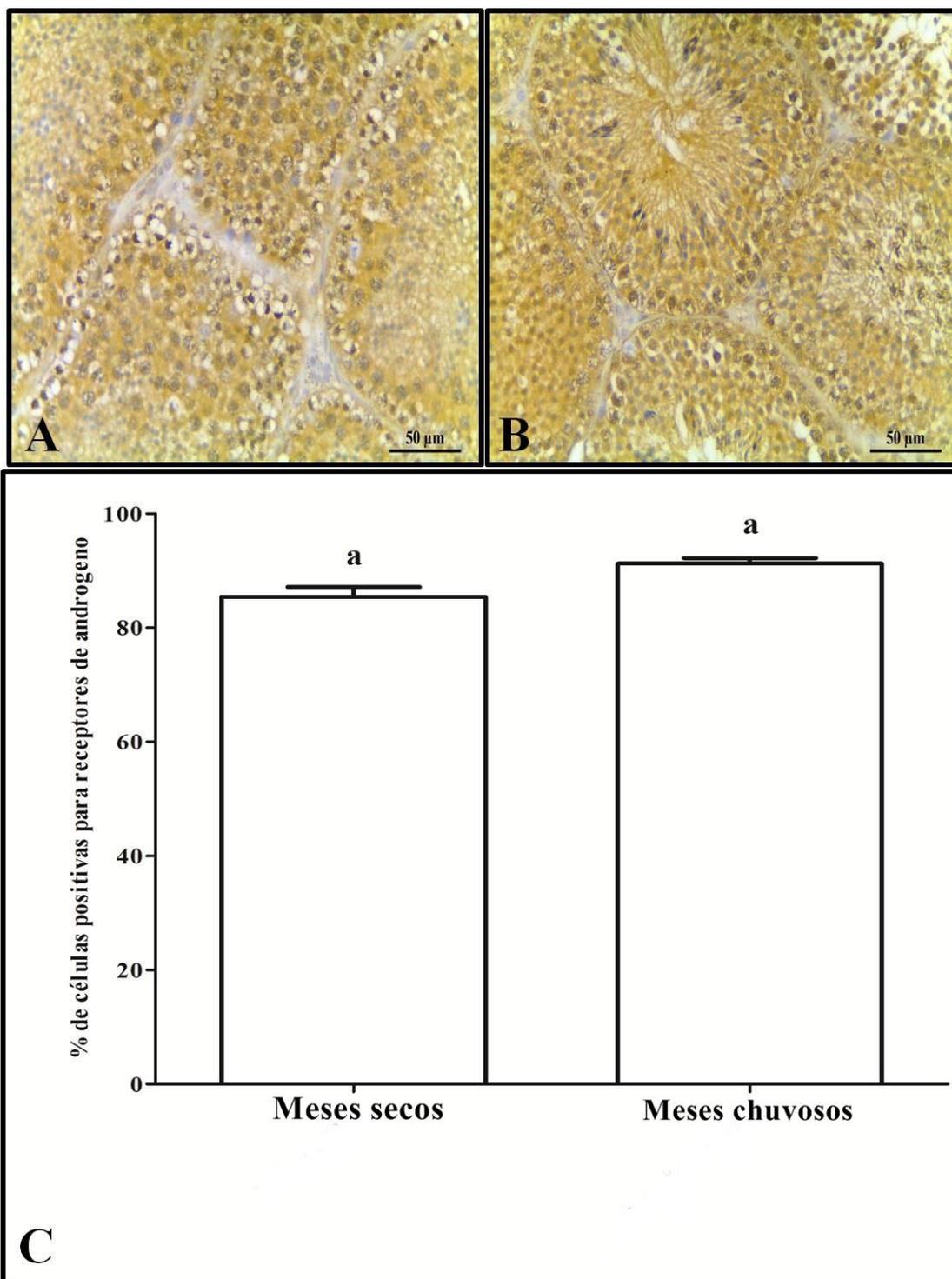


Fig. 7: Imuno-histoquímica do receptor de andrógeno nos testículos de *P. discolor* coletados nos meses chuvosos (A) e secos (B) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Observar ainda a quantificação, em percentual, de células positivas para receptores de andrógeno nos meses secos e chuvosos (C). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$).

Tabela 1

Parâmetros citomorfométricos avaliados nas espermatogônias de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Número de região organizadora de nucléolo por célula (NNORC), área da região organizadora de nucléolo ocupada na célula (ANOROC), área do núcleo da célula (ANC), área da célula (AC), porcentagem do núcleo ocupada pela região organizadora de nucléolo (PNONOR) e porcentagem da célula ocupada por núcleo (PCON).

Parâmetros citomorfométricos	Meses secos (n=06)	Meses chuvosos (n=06)	Valor de p
	Média e Desvio padrão	Média e Desvio padrão	
NNORC	3,37 ± 1,77 ^a	3,34 ± 1,98 ^a	0,274
ANOROC (µm ²)	1,08 ± 0,75 ^a	2,25 ± 1,17 ^b	< 0,001
ANC (µm ²)	17,21 ± 5,17 ^a	17,57 ± 5,76 ^a	0,554
AC (µm ²)	27,79 ± 7,61 ^a	27,08 ± 8,05 ^b	0,041
PNONOR (%)	6,50 ± 4,67 ^a	13,41 ± 6,90 ^b	< 0,001
PCON (%)	62,11 ± 9,30 ^a	64,72 ± 7,86 ^b	< 0,001

Letras sobrescritas diferentes (a, b) na mesma linha indicam diferença significativa (p <0,05) para o mesmo parâmetro analisado pelo teste U de Mann-Whitney.

Tabela 2

Parâmetros citomorfométricos avaliados nos espermatócitos de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Número de região organizadora de nucléolo por célula (NNORC), área da região organizadora de nucléolo ocupada na célula (ANOROC), área do núcleo da célula (ANC), área da célula (AC), porcentagem do núcleo ocupada pela região organizadora de nucléolo (PNONOR) e porcentagem da célula ocupada por núcleo (PCON).

Parâmetros citomorfométricos	Meses secos (n=06)	Meses chuvosos (n=06)	Valor de p
	Média e Desvio padrão	Média e Desvio padrão	
NNORC	3,68 ± 2,10 ^a	5,14 ± 2,95 ^b	< 0,001
ANOROC (µm ²)	1,34 ± 0,89 ^a	3,42 ± 1,91 ^b	< 0,001
ANC (µm ²)	23,34 ± 7,25 ^a	31,29 ± 9,35 ^b	< 0,001
AC (µm ²)	38,23 ± 11,68 ^a	45,69 ± 11,75 ^b	< 0,001
PNONOR (%)	6,05 ± 3,90 ^a	11,13 ± 5,67 ^b	< 0,001
PCON (%)	61,58 ± 9,38 ^a	68,03 ± 7,66 ^b	< 0,001

Letras sobrescritas diferentes (a, b) na mesma linha indicam diferença significativa (p <0,05) para o mesmo parâmetro analisado pelo teste U de Mann-Whitney.

Tabela 3

Parâmetros citomorfométricos avaliados nas espermátides de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Número de região organizadora de nucléolo por célula (NNORC), área da região organizadora de nucléolo ocupada na célula (ANOROC), área do núcleo da célula (ANC), área da célula (AC), porcentagem do núcleo ocupada pela região organizadora de nucléolo (PNONOR) e porcentagem da célula ocupada por núcleo (PCON).

Parâmetros citomorfométricos	Meses secos (n=06)	Meses chuvosos (n=06)	Valor de p
	Média e Desvio padrão	Média e Desvio padrão	
NNORC	2,29 ± 1,26 ^a	2,90 ± 1,59 ^b	< 0,001
ANOROC (µm ²)	0,66 ± 0,44 ^a	1,33 ± 0,94 ^b	< 0,001
ANC (µm ²)	7,81 ± 2,52 ^a	10,59 ± 3,27 ^b	< 0,001
AC (µm ²)	14,83 ± 4,72 ^a	18,10 ± 4,76 ^b	< 0,001
PNONOR (%)	9,04 ± 6,26 ^a	12,38 ± 7,31 ^b	< 0,001
PCON (%)	53,51 ± 10,89 ^a	58,47 ± 10,08 ^b	< 0,001

Letras sobrescritas diferentes (a, b) na mesma linha indicam diferença significativa (p <0,05) para o mesmo parâmetro analisado pelo teste U de Mann-Whitney.

Tabela 4

Proporção volumétrica (%) do epitélio (Ep), lúmen (Lu), vasos sanguíneos (VS) e tecido conjuntivo (TC) das regiões do epidídimo (cabeça – CA, corpo – CP e cauda – CAU) de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.

Regiões do epidídimo	Parâmetros histomorfométricos	Meses secos	Meses chuvosos	Valor de p
		(n=06)	(n=06)	
		Média e desvio padrão	Média e desvio padrão	
CA	Ep (%)	63,54 ± 6,15 ^a	56,71 ± 13,12 ^b	0,025
	Lu (%)	20,17 ± 5,66 ^a	13,17 ± 6,95 ^b	<0,001
	VS (%)	0,03 ± 0,13 ^a	0,21 ± 0,46 ^b	0,006
	TC (%)	16,26 ± 5,50 ^a	29,91 ± 17,08 ^b	<0,001
CP	Ep (%)	57,40 ± 6,74 ^a	51,94 ± 10,04 ^b	0,004
	Lu (%)	30,09 ± 7,58 ^a	24,81 ± 15,24 ^a	0,126
	VS (%)	0,01 ± 0,11 ^a	0,15 ± 0,46 ^b	0,005
	TC (%)	12,50 ± 4,81 ^a	23,10 ± 17,52 ^b	0,010
CAU	Ep (%)	42,79 ± 12,89 ^a	38,49 ± 9,99 ^b	0,013
	Lu (%)	37,82 ± 11,72 ^a	26,94 ± 15,35 ^b	<0,001
	VS (%)	0,16 ± 0,71 ^a	0,27 ± 0,51 ^b	0,008
	TC (%)	19,23 ± 14,45 ^a	34,30 ± 16,77 ^a	<0,001

Letras sobrescritas diferentes (a, b) na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$), para o mesmo parâmetro analisado, pelo teste U de Mann-Whitney.

Tabela 5

Parâmetros histomorfométricos (altura do epitélio – AE, diâmetro do túbulo – DT e diâmetro do lúmen – DL) avaliados nas regiões do epidídimo (cabeça – CA, corpo – CP e cauda – CAU) de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.

Regiões do epidídimo	Parâmetros histomorfométricos	Meses secos	Meses chuvosos	Valor de p
		(n=06)	(n=06)	
		Média e desvio padrão	Média e desvio padrão	
CA	AE (µm)	30,28 ± 8,72 ^a	26,07 ± 13,23 ^b	0,045
	DT (µm)	132,74 ± 27,93 ^a	107,84 ± 47,53 ^b	0,002
	DL (µm)	72,28 ± 18,92 ^a	54,09 ± 27,42 ^b	<0,001
CP	AE (µm)	24,06 ± 4,84 ^a	21,16 ± 6,07 ^b	<0,001
	DT (µm)	124,83 ± 25,45 ^a	112,89 ± 43,52 ^a	0,330
	DL (µm)	81,23 ± 21,87 ^a	70,88 ± 36,88 ^a	0,103
CAU	AE (µm)	20,02 ± 4,08 ^a	16,74 ± 5,23 ^b	<0,001
	DT (µm)	141,78 ± 30,78 ^a	126,19 ± 48,30 ^b	0,014
	DL (µm)	103,30 ± 29,07 ^a	89,77 ± 48,08 ^b	0,006

Letras sobrescritas diferentes (a, b) na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$), para o mesmo parâmetro analisado, pelo teste U de Mann-Whitney.

Tabela 6

Distribuição relativa (%) das células principais (CPr), basais (CBa) e apicais (CAp) das três regiões do epidídimo (cabeça – CA, corpo – CP e cauda – CAU) de *Phyllostomus discolor* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.

Regiões do epidídimo	Tipos celulares	Meses secos (n=06)	Meses chuvosos (n=06)	Valor de p
		Média e desvio padrão	Média e desvio padrão	
CA	CPr	78,02 ± 5,45 ^a	78,97 ± 4,32 ^a	0,391
	CBa	18,98 ± 5,64 ^a	20,05 ± 4,45 ^a	0,189
	CAp	3,00 ± 2,33 ^a	0,98 ± 1,35 ^b	<0,001
CP	CPr	79,52 ± 4,69 ^a	76,55 ± 7,75 ^a	0,060
	CBa	17,96 ± 4,54 ^a	21,17 ± 5,84 ^b	0,002
	CAp	2,52 ± 1,94 ^a	2,28 ± 3,39 ^b	0,013
CAU	CPr	81,84 ± 4,23 ^a	78,34 ± 7,78 ^b	0,034
	CBa	17,08 ± 3,80 ^a	21,24 ± 7,28 ^b	0,003
	CAp	1,08 ± 1,49 ^a	0,42 ± 1,38 ^b	0,001

Letras sobrescritas diferentes (a, b) na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$), para o mesmo parâmetro analisado, pelo teste U de Mann-Whitney.

CAPÍTULO III

**ARTIGO CIENTÍFICO II:
ESTÁGIOS REPRODUTIVOS E HISTOFISIOLOGIA OVARIANA EM
Artibeus planirostris (SPIX, 1823) (CHIROPTERA:
PHYLLOSTOMIDAE) NOS MESES SECOS E CHUVOSOS EM UM
MUNICÍPIO DA MESORREGIÃO DA MATA PERNAMBUCANA,
NORDESTE DO BRASIL**

ESTÁGIOS REPRODUTIVOS E HISTOFISIOLOGIA OVARIANA EM *Artibeus planirostris* (SPIX, 1823) (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE) NOS MESES SECOS E CHUVOSOS EM UM MUNICÍPIO DA MESORREGIÃO DA MATA PERNAMBUCANA, NORDESTE DO BRASIL

Nivaldo Bernardo de Lima Junior^{1*}, Ismaela Maria Ferreira de Melo¹, Fabricya Roberta da Silva¹, Erivaldo Alves Antonio¹, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior²; Katharine Raquel Pereira dos Santos²; Valéria Wanderley Teixeira¹ e Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹

¹Área de Morfologia, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Brasil.

*[Correspondência: Nivaldo Bernardo de Lima Junior <nivaldobernardo@hotmail.com>]

²Núcleo de Biologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Brasil.

Título curto: REPRODUÇÃO EM FÊMEAS DE *A. planirostris*.

RESUMO. Nesse estudo, investigaram-se os estágios reprodutivos e a histofisiologia ovariana em fêmeas adultas de *Artibeus planirostris* no município de Vitória de Santo Antão – Pernambuco, Nordeste do Brasil. Foram capturadas ao longo de uma noite em cada mês (novembro/2016 a novembro/2017). Com base na média mensal da precipitação, foi realizado um agrupamento dos meses secos (setembro a fevereiro) e chuvosos (março a agosto). Através da morfologia externa corporal, as fêmeas foram classificadas em inativas, grávidas, lactantes e pós-lactantes. Apenas as inativas (n=13) foram eutanasiadas para as análises morfofisiológicas. Amostras sanguíneas foram obtidas para dosagem de estrógeno e, após a eutanásia, os ovários foram coletados e processados com base na técnica histológica de rotina. Na morfometria, consideraram-se: a área do ovário, a presença e a área dos folículos ovarianos (primário unilaminar e multilaminar, antral e de Graaf), bem como a quantificação do corpo lúteo. Na imuno-histoquímica foi utilizado o PCNA. Os resultados apresentaram fêmeas grávidas apenas em meses secos, contudo as inativas, lactantes e pós-lactantes foram coletadas em meses secos e chuvosos. A dosagem de estrógeno e a presença de células PCNA positivas foram maiores nos meses chuvosos. A ocorrência do folículo de Graaf foi somente nesses meses, enquanto que o corpo lúteo foi encontrado em todos os espécimes dos meses secos. Embora *A. planirostris* tenha preferência por entrar em período gestacional em meses secos e acasalar da metade para o final dos meses chuvosos, essa espécie apresentou adaptabilidade influenciada pelas variações ambientais durante todo o ciclo reprodutivo, indicando uma poliestria assazonal.

Palavras-chaves: morcego, morfofisiologia, ovário, padrão reprodutivo, sazonalidade.

ABSTRACT. Reproductive stages and ovarian histophysiology in *Artibeus planirostris* (Spix, 1823) (Chiroptera: Phyllostomidae) in the dry and rainy months in a municipality of the Mesorregião in Mata Pernambucana, northeastern Brazil. In this study, reproductive stages and ovarian histophysiology were investigated in adult females of *Artibeus planirostris* in the municipality of Vitória de Santo Antão - Pernambuco, Northeast Brazil. They were captured over one night each month (November / 2016 to November / 2017). Based on the monthly average of precipitation, the dry (September to February) and rainy (March to August) months were grouped. Through external body morphology, females were classified as inactive, pregnant, lactating and post-lactating. Only the inactive (n=13) were euthanized for morphophysiological analysis. Blood samples were obtained for estrogen measurement and, after euthanasia, the ovaries were collected and processed based on routine histological technique. In morphometry, were considered: the area of the ovary, the presence and the area of the ovarian follicles (unilaminar and multilaminar primary, antral and Graaf), as well as the quantification of the corpus luteum. In immunohistochemistry, PCNA was used. The results showed pregnant females only in dry months, however inactive, lactating and post-lactating females were collected in dry and rainy months. The dosage of estrogen and the presence of positive PCNA cells were higher in the rainy months. The occurrence of the Graaf follicle was only in these months, whereas the corpus luteum was found in all specimens from the dry months. Although *A. planirostris* has a preference for entering gestational periods in dry months and mating from half to the end of the rainy months, this species showed adaptability influenced by environmental variations throughout the reproductive cycle, indicating a non-seasonal polyestry.

Key words: bat, morphophysiology, ovary, reproductive pattern, seasonality.

1 INTRODUÇÃO

A crescente urbanização tem causado modificações nítidas no ambiente natural. Isso acarreta diminuição significativa na diversidade da flora e fauna original, sobretudo, em área de Mata Atlântica. Apesar disso, muitas espécies da ordem Chiroptera apresentam uma ampla plasticidade para adaptar-se a esses ambientes que se encontram sob intensa atuação antrópica (Esbérard 2003a; b; Lima 2008; Russo & Ancillotto 2015; Nunes et al. 2017).

Essas intervenções humanas podem influenciar os processos morfofisiológicos desses organismos, como é o caso da reprodução dos morcegos que habitam em locais próximos a áreas urbanizadas, uma vez que esses mamíferos possuem características peculiares cujas estratégias e padrões reprodutivos estão intrinsicamente associados a diferentes fatores bióticos e abióticos existentes em determinado bioma. Assim, sua reprodução pode variar a depender da localidade e espécie considerada (Crichton & Krutzsch 2000; Melo et al. 2012; Silva de Araújo & Bernard 2016; Nunes et al. 2017).

Os padrões reprodutivos dos quirópteros são definidos com base, principalmente, na atividade reprodutiva das fêmeas, já que são elas que irão entrar em período gestacional, amamentar e ter o cuidado parental com sua prole. Na região Neotropical são definidos quatro padrões: monoestria sazonal (apenas um único pico reprodutivo ao longo do ano), poliestria sazonal (caracterizado por ocorrer de maneira contínua durante a maior parte do ano, com múltiplos picos reprodutivos), poliestria sazonal bimodal (ocorrência de dois picos reprodutivos ao longo do ano) e poliestria assazonal (a reprodução acontece durante todo o ano) (Taddei 1980; Willig 1985a; b; Zortéa 2003).

No Brasil, a maioria dos estudos que investigam sobre a reprodução das diversas espécies de morcegos fêmeas, em diferentes áreas geográficas e biomas, abordam a morfologia externa corporal para classificação do estágio reprodutivo (Gomes & Uieda 2004; Costa et al. 2007; Rocha et al. 2010; Godoy et al. 2014; Sato et al. 2015). Sabe-se que

considerar apenas essa classificação para definir padrões e estratégias reprodutivas tornam limitadas as inferências, sendo necessária a utilização de outros parâmetros associados como a histologia, a morfometria, a dosagem hormonal e a imuno-histoquímica (Beguelini et al. 2013b; Lima Junior et al. 2014).

Os estudos com enfoque na histofisiologia reprodutiva da ordem Chiroptera revelam-se como restritos no território nacional, especialmente quando se considera a atividade ovariana das diferentes espécies desses mamíferos (Araújo et al. 2013; Bueno et al. 2018; Farias et al. 2018; Rodrigues et al. 2019). Atualmente, no estado de Pernambuco, o único estudo existente, com abordagem histomorfométrica das gônadas femininas, é o da espécie *Dermanura cinerea* (Gervais 1856) (Lima Junior et al. 2018a), coletada em uma área de Mata Atlântica situada no Litoral Sul desse estado.

Diante da diversidade de espécies de morcegos, *Artibeus planirostris* (Spix 1823) faz parte da família Phyllostomidae, subfamília Stenodermatinae e apresenta hábito alimentar frugívoro (Hollis 2005). Na região nordeste do Brasil, em biomas de Cerrado e Caatinga, foi relatada a ocorrência de poliestria sazonal bimodal (Willig 1985a; b; Hollis 2005). No sudeste do Brasil, Beguelini et al. (2013b) constataram dois picos acentuados de atividade espermatogênica relacionados com a sincronização do ciclo reprodutivo das fêmeas. No entanto, ainda não foi verificada se existem variações na reprodução das fêmeas dessa espécie, nos meses de baixos e elevados índices pluviométricos, em área de Mata Atlântica localizada próxima ao perímetro urbanizado no estado de Pernambuco.

Dentro dessa perspectiva, objetivou-se investigar os estágios reprodutivos e a histofisiologia do ovário da espécie *A. planirostris* coletadas em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e animais

As coletas foram realizadas nas dependências do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (IFPE) - *Campus* de Vitória de Santo Antão (coordenadas geográficas: 08° 07' 05'' de latitude sul e 35° 17' 29'' de longitude oeste). Esse município integra a Mesorregião da Mata Pernambucana. O clima é quente e úmido do tipo tropical chuvoso, e a vegetação é formada predominantemente por formações de Floresta Estacional Semidecidual e de Floresta Ombrófila Densa (Morais et al. 2011; Costa 2012).

A captura dos animais foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por meio da Licença permanente para coleta de material zoológico com o seguinte número no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO): 22418-1. Além disso, esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) com o seguinte número de processo: 23076. 039757/2016-81.

Foram utilizadas apenas fêmeas adultas da espécie *Artibeus planirostris*, cuja idade foi determinada por meio da observação do grau de ossificação dos metacarpos e falanges das asas, de acordo com a metodologia de Anthony (1988).

Os animais foram capturados por meio de 05 redes de neblina (12 m de comprimento x 3 m de altura). As coletas foram realizadas ao longo de uma noite, em cada mês, durante 13 meses (novembro/2016 a novembro/2017). O esforço de captura foi de 11700 m². h (Straube & Bianconi 2002).

2.2 Informações meteorológicas

Os dados meteorológicos referentes às médias mensais da precipitação (mm), temperatura (C°) e umidade do ar (%) foram disponibilizados pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) – 3° Distrito de Meteorologia. Esses dados foram referentes à estação meteorológica da cidade de Recife – Pernambuco, uma vez que cada estação possui representação para uma circunferência com raio de 150 km a partir da estação.

As médias mensais da precipitação foram relacionadas com os dados reprodutivos. Assim, foram agrupados os meses secos (setembro a fevereiro) e chuvosos (março a agosto), seguindo o mesmo padrão do que já se tem definido, em outros estudos, em área de Mata Atlântica de Pernambuco (Lima Junior et al. 2014; Asfora et al. 2017).

2.3 Definição do estágio reprodutivo

Inicialmente, as fêmeas foram classificadas por meio do estágio reprodutivo, o qual foi definido pela apalpação do abdômen, bem como pela visualização da morfologia das mamas e mamilos. Foram organizadas em quatro grupos: inativas (aquelas que estavam com o abdômen normal e sem mamilos aparentes), grávidas (nas que, através da apalpação do abdômen, notou-se a existência de feto), lactantes (aquelas cujos mamilos encontravam-se com ausência de pelos e notória presença de secreção, constatada por meio de uma leve compressão, com uma pinça, nesses órgãos) e pós-lactantes (nas que foi verificada a ausência de leite nos mamilos e recuperação dos pelos em torno destes) (Racey 1988; Gannon & Willig 1992; Esbérard 2002; Zortéa 2003; Gomes & Uieda 2004; Lima Junior et al. 2018a).

2.4 Procedimento de eutanásia dos espécimes

Apenas as fêmeas classificadas como inativas (n=13), de acordo com a morfologia externa, foram eutanasiadas. O protocolo seguiu os procedimentos éticos da experimentação animal. Para tanto, foi aplicada em cada animal selecionado uma anestesia na área da região intraperitoneal constituída por pentobarbital sódico com concentração de 40 mg/kg⁻¹. Posteriormente, foi inoculada uma solução saturada de cloreto de potássio (Morais et al. 2013b).

2.5 Coleta de sangue e dos órgãos

Depois da aplicação da anestesia, amostras de sangue foram coletadas, de cada uma das fêmeas inativas, por meio de punção cardíaca do ventrículo esquerdo. Após a eutanásia, foi feito um pequeno corte no abdômen direcionando-se até a região inguinal para a remoção dos ovários. Esse procedimento foi realizado com bisturi e pinças de microdissecação que auxiliaram na divulsão dos tecidos.

2.6 Dosagem hormonal

As amostras de sangue foram coletadas para a dosagem de estrógeno em pg/mL (picograma por mililitro). Para tanto, foi empregado o método de Fluoroimunoensaio, de modo que as devidas análises foram realizadas em um laboratório comercial.

2.7 Histologia

Depois dos ovários serem coletados, passaram pelo processo de fixação em formalina neutra tamponada (NBF) a 10% com duração de 24 horas. Após isso, foram conservados em

álcool 70% e glicerinado a 5% até serem processados de acordo com a técnica histológica, passando pelas etapas de desidratação, diafanização e impregnação (Behmer et al. 1976; Rieder & Schmidt 1987). Sequencialmente, passaram pela etapa de inclusão em blocos de parafina, os quais foram cortados no micrótomo em espessura de 4 μm . Esses cortes foram semi-seriados, com intervalo de 40 μm entre um corte e outro (Lima Junior et al. 2018a) e a coloração empregada foi a Hematoxilina – Eosina (H. E.). As lâminas histológicas confeccionadas foram analisadas em microscopia óptica.

2.8 Morfometria

As lâminas histológicas dos ovários foram fotografadas com o auxílio do programa *ISCapture* instalado em um computador. Para tanto, foi conectada uma câmera entre o computador e o microscópio óptico que possibilitou a reprodução e captura das imagens. Para as análises histomorfométricas utilizou-se o programa *ImageJ*.

Nas análises morfométricas foram consideradas a área do ovário, o número de folículos ovarianos em diferentes estágios de maturação – primário unilaminar (FPU), primário multilaminar (FPM), antral (FAT) e de Graaf, maduro ou pré-ovulatório (FGA) –, e corpo lúteo (CLU) (Farias et al. 2018). Foi mensurada também a área de cada um desses tipos de folículos. A área do ovário foi mensurada em milímetros quadrados (mm^2) e foram utilizadas 10 fotomicrografias no aumento total de 40X por animal, enquanto que a área de cada folículo foi medida em micrômetros quadrados (μm^2), utilizando-se 10 fotomicrografias em aumento total de 100X por espécime. Essas imagens foram capturadas de forma ordenada da margem esquerda à direita de cada corte do ovário presente na lâmina histológica. Além disso, para evitar fotografar os mesmos tipos de folículos ovarianos foram utilizados cortes semi-seriados, de acordo com a metodologia de Lima Junior et al. (2018a).

2.9 Imuno-histoquímica (PCNA)

As lâminas dos ovários foram desparafinizadas e reidratadas. Após isso, passaram pelo processo de recuperação antigênica, em que se utilizou o tampão citrato (pH 6,0) em temperatura elevada no micro-ondas (10 minutos). A inibição da peroxidase endógena foi feita em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada. O bloqueio da reação antígeno – anticorpo inespecífica foi feito mediante incubação das lâminas em Tris / BSA (albumina sérica bovina) a 5% (30 minutos). Foi utilizado o anticorpo primário PCNA (Santa Cruz Biotechnology) que foi diluído em Tris / BSA a 5% (1:100). As lâminas foram organizadas em câmara úmida e colocadas em overnight na geladeira. No dia seguinte, as lâminas foram tratadas com o anticorpo secundário (30 minutos). A reação antígeno-anticorpo foi verificada através de um precipitado com coloração marrom, depois de entrar em contato e ser revelado com DAB (3,3 diaminobenzidina) e contracolorados com hematoxilina. As imagens foram capturadas por uma câmera de vídeo Sony, acoplada ao microscópio Olympus BX-50, com a objetiva 40X e submetidas ao aplicativo GIMP 2.0 para quantificação usando o histograma RGB (vermelho-verde-azul). Este se baseia na intensidade da luminescência, em que os tons de pixel da imagem variam de 0 (menos luminescência) a 255 (branco absoluto – maior luminescência) (Oberholzer et al. 1996; Lee et al. 2001). A contagem foi realizada usando um retículo WEIBEL de 25 pontos, seguido por uma ocular de 10x. Foram utilizadas três lâminas dos meses secos e três dos meses chuvosos, em que foram analisados quatro campos nos ovários com uma objetiva de 10x. Em cada campo, 300 células dos folículos ovarianos foram contadas e transformadas em porcentagem de células marcadas (Weibel 1963).

2.10 Estatística

As amostras não apresentaram uma distribuição normal de acordo com o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Assim, os resultados morfométricos e hormonal foram submetidos no programa SPSS (*Statistical Package of the Social Sciences*, inc. Chicago, EUA) versão 15.0. Foram utilizados o teste U de Mann-Whitney, para a área do ovário e dosagem de estrógeno; e o teste Qui-Quadrado (X^2) para verificar o número de folículos em diferentes estágios de maturação, bem como do corpo lúteo entre os meses secos e chuvosos. Além disso, para a imuno-histoquímica foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

Ao longo do período considerado, foram coletadas 33 fêmeas, de modo que o número por estágio reprodutivo variou da seguinte forma: inativas (n=13), grávidas (n=08), lactantes (n=07) e pós-lactantes (n=05) (Fig. 1).

Das 13 fêmeas inativas, 04 foram coletadas em meses secos e 09 em meses chuvosos. Os ovários de *A. planirostris*, possuem morfologia circular ou em elipse, revestidos externamente por um epitélio simples que varia de cúbico a pavimentoso, e subjacente a este, observa-se a túnica albugínea de tecido conjuntivo denso não modelado. Esse órgão é composto por duas regiões: a medula (situada na parte mais central desse órgão) e o córtex (localizado mais periféricamente em torno da medula). Na região medular, pode ser encontrado tecido conjuntivo do tipo frouxo, vasos sanguíneos e linfáticos, bem como nervos. Já no córtex, há os folículos ovarianos em diferentes estágios de maturação no tecido conjuntivo dessa região e, a depender da fase reprodutiva, também pode ser encontrado o corpo lúteo. Os limites entre ambas às regiões não apresentam uma distinção precisa (Fig. 2).

Na histomorfometria da área do ovário, não ocorreu diferença significativa ($p=0,248$) entre os meses secos ($=2,01 \text{ mm}^2$) e chuvosos ($=2,08 \text{ mm}^2$). Em relação à presença dos folículos, não houve diferença em nenhuma das análises realizadas. Os folículos primários multilaminar (FPM) e antral (FAT), bem como o corpo lúteo (CLU) foram encontrados tanto em meses secos quanto chuvosos. Os folículos primários unilaminar (FPU) estiveram presentes em todos os espécimes de todos os meses considerados, por isso não fez parte do teste Qui-quadrado.

Nos meses secos, os FPM estiveram presentes em todos os espécimes, já nos chuvosos foram encontrados em sete e ausentes em dois animais. Os FAT foram identificados somente em um espécime dos meses secos e inexistentes em três animais, enquanto que nos meses de chuva ocorreram em cinco espécimes e ausentes em quatro. Nenhum FGA foi encontrado nos meses secos, ocorrendo apenas em três animais (sendo um folículo em cada) dos meses chuvosos. Os CLU foram constatados em todos os espécimes dos meses secos e estiveram presentes em quatro dos meses chuvosos (Tab. 1).

Na análise descritiva da área dos folículos, as maiores médias dos FPU e FPM foram encontradas em meses secos (novembro/2017), enquanto que as médias dos FAT e FGA foram mais elevadas em meses chuvosos (julho/2017) (Tab. 2).

A dosagem hormonal de estrógeno apresentou médias maiores ($p=0,045$) em meses chuvosos quando comparada aos meses secos (Fig. 3). De forma semelhante, os resultados da imuno-histoquímica indicaram diferença significativa, com a ocorrência de um maior percentual de células PCNA positivas também nos meses chuvosos (Fig. 4).

4 DISCUSSÃO

A morfologia externa corporal de *A. planirostris*, indicou picos de gravidez nos meses de outubro e, principalmente, novembro, que são meses do início do período seco. Por outro lado, houve a ocorrência de fêmeas em diferentes estágios reprodutivos (inativas, lactantes e pós-lactantes), tanto em meses secos quanto chuvosos. Ao que parece, as fêmeas dessa espécie têm preferência por entrar em estágio de prenhez durante os meses secos, de modo que possam amamentar e ter o cuidado parental com a sua prole no início dos meses chuvosos. Assim, posteriormente, irão ovular e acasalar no final desses meses para que possam iniciar uma nova gestação nos meses secos (Lima Junior et al. 2018a).

Esses achados reforçam as investigações realizadas por Taddei (1976), na região noroeste do estado de São Paulo, que diz que, como o período gestacional de *A. planirostris* é de aproximadamente três meses e meio, o ovário dessa espécie pode apresentar ainda funcionalidade ao longo da gestação e, como consequência, uma nova ovulação poderá ocorrer logo em seguida ao parto (Rodrigues et al. 2019). Inferências semelhantes foram confirmadas por Beguelini et al. (2013b), em bioma de Cerrado, também no estado de São Paulo, onde verificou-se que o processo de espermatogênese de *A. planirostris* é ativo durante todo ano, indicando um ciclo reprodutivo contínuo, em que as fêmeas podem ter mais de uma gravidez por ano.

A caracterização anatômica e histológica do ovário de *A. planirostris* seguiu o padrão já descrito para essa espécie, por Bueno et al. (2018), e também por Rodrigues et al. (2019) para *Artibeus lituratus* que é do mesmo gênero que a espécie do presente estudo. Assim, produz somente um ovócito em cada ciclo reprodutivo e, conseqüentemente, apenas um corpo lúteo, que quando presente ocupa a maior parte da área do ovário, conforme pôde ser observado em

nosso estudo. Com isso, *A. planirostris* tem apenas um filhote em cada ciclo (Fleming et al. 1972; Taddei 1976; Bueno et al. 2018).

A presença de folículo maduro apenas em meses chuvosos, assim como a ocorrência de médias maiores na área desse tipo de folículo, principalmente no mês de julho confirma uma organização do córtex desse órgão para que *A. planirostris* possa acasalar, preferencialmente, da metade para o final dos meses chuvosos. Associado a isso, há também um aumento nos níveis de estrógeno. Como o folículo de Graaf é o que alcança o estágio de desenvolvimento mais avançado, irá ovular quando os níveis desse hormônio se elevarem e estimular a hipófise a liberar quantidades consideráveis de hormônio luteinizante (LH) que induzirá o rompimento desse folículo e a consequente expulsão do ovócito em meses chuvosos. Essas inferências são complementadas pela ocorrência do corpo lúteo, em todos os espécimes dos meses secos, confirmando a ovulação nos meses anteriores. Essa glândula temporária secreta hormônios, principalmente a progesterona, que atuará na manutenção da camada interna do útero, a fim de receber e manter o conceito durante os meses secos, caso haja fecundação (Downey et al. 1998; Martins et al. 2008; Saraiva et al. 2010; Bueno et al. 2018).

Os achados da imuno-histoquímica indicaram que nos meses de chuva houve uma maior proliferação nas células dos folículos ovarianos, pois essa imunomarcção aumenta com a ação estrogênica. E, de fato, houve um aumento nos níveis de estrógeno durante esses meses que possivelmente estimulou uma maior proliferação celular (Narkar et al. 2006). Esse aumento indica também uma imunorreção prevalente, principalmente, nas células da granulosa e da teca dos folículos, de modo que a positividade encontrada revela que os folículos avaliados não se encontram em processo de atresia (Oktay et al. 1995). Como houve folículo de Graaf apenas em meses chuvosos, ao que tudo indica, ele suprimiu o desenvolvimento dos demais folículos, mediado pela atuação dos níveis de estrógeno e provavelmente também da inibina, que é expressa nas células da granulosa e da teca, na

supressão da produção do hormônio folículo-estimulante (FSH) pela hipófise durante esses meses (Santos et al. 2009; Barret et al. 2014).

Além da morfologia externa corporal, os demais parâmetros analisados em *A. planirostris* (histomorfometria, imuno-histoquímica e dosagem hormonal) evidenciaram a importância destes, pois apresentaram características morfofisiológicas peculiares dentro do grupo das fêmeas classificadas como inativas de acordo com a morfologia externa corporal. Assim, considerar apenas esta análise na determinação da reprodução de uma espécie, pode induzir a conclusões imprecisas, já que, por exemplo, as características iniciais de gestação não podem ser identificadas dessa forma, sendo necessárias investigações celulares e teciduais para se compreender com maior segurança e detalhes o ciclo reprodutivo do animal (Bredt et al. 1999; Gomes & Uieda 2004; Lima Junior et al. 2014; 2018a).

Essas constatações indicam que as fêmeas de *A. planirostris*, possuem um ciclo reprodutivo adaptável, de acordo com as variações pluviométricas. Como essa espécie é frugívora, a oferta de recursos alimentares tende a ser maior em meses de chuvas, pois favorecem a frutificação de diferentes tipos de plantas existentes, inclusive em ambientes antropizados, o que é importante, pois a amamentação e o cuidado parental necessitam de elevado suporte energético (Loudon & Racey 1987; Farias et al. 2018; Lima Junior et al. 2018a). Essas sensibilidades às mudanças ambientais indicam ainda que o controle da reprodução dessa espécie é regulado pela fisiologia das fêmeas, que determinarão quando entrará em período de cópula e ovulação, o que fará com que os machos se adaptem a esse processo (Beguelini et al. 2013b).

Embora as fêmeas de *A. planirostris* tenha demonstrado preferência para entrar em período gestacional em meses secos e, possivelmente, amamentar e ter o cuidado parental no início dos meses chuvosos, essa espécie apresentou uma reprodução ajustável ao longo de todo o ciclo reprodutivo anual. Isso foi verificado tanto pela presença de fêmeas em diferentes

estágios reprodutivos nos mesmos meses, quanto pelas variações nas características histofisiológicas do ovário ao longo do período considerado. Logo, a espécie *A. planirostris* apresentou um padrão reprodutivo do tipo assazonal em área de perímetro urbanizado de Pernambuco.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida ao primeiro autor durante o doutorado.

5 LITERATURA CITADA

- ANTHONY, E. L. P. 1988. Age determination in bats. In: KUNZ, T. H. ed. Ecological and behavioral methods for the study of bats. Washington, Smithsonian Institution 47 – 58.
- ARAÚJO, R. A., B. D. AMARO, S. A. TALAMONI, & H. P. GODINHO. 2013. Seasonal reproduction of yellowish Myotis, *Myotis levis* (Chiroptera: Vespertilionidae), from a Neotropical highland. *Journal of Morphology* 274 (11): 1230 – 1238.
- ASFORA, M. C., M. LIMA, & M. R. S. LACERDA. 2017. Diagnóstico da seca 2011-2016 em Pernambuco: impactos e políticas de mitigação. *Parcerias Estratégicas*, Brasília, DF 22 (44): 247 – 274.
- BARRETT, K. E., S. M. BARMAN, S. BOITANO, & H. L. BROOKS. 2014. *Fisiologia médica de Ganong*. 24^a ed. Porto Alegre (RS): McGraw-Hill.
- BEGUELINI, M. R., C. C. I. PUGA, S. R. TABOGA, & E. MORIELLE-VERSUTE. 2013b. Annual reproductive cycle of males of the flat-faced fruit-eating bat, *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). *General and Comparative Endocrinology* 185: 80 – 89.

- BEHMER, O. A., E. M. C. TOLOSA, & A. G. F. NETO. 1976. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. Edart, Universidade de São Paulo, São Paulo. 239p.
- BREDT, A., W. UIEDA, & E. D. MAGALHÃES. 1999. Morcegos cavernícolas da região do Distrito Federal, centro-oeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera). *Revista Brasileira de Zoologia* 16 (3): 731 – 770.
- BUENO, L. M., D. L. CAUN, M. T. COMELIS, M. R. BEGUELINI, S. R. TABOGA, & E. MORIELLE-VERSUTE. 2018. Ovarian morphology and folliculogenesis and ovulation process in the flat-faced fruit-eating bat *Artibeus planirostris* and the Argentine brown bat *Eptesicus furinalis*: A comparative analysis. *Acta Zoologica* 1 – 12.
- COSTA, C. 2012. Uma Floresta de oportunidades: um novo olhar sobre a Mata Atlântica do Nordeste. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 56 p.
- COSTA, L. M., J. C. ALMEIDA, & C. E. L. ESBÉRARD. 2007. Dados de reprodução de *Platyrrhinus lineatus* em estudo de longo prazo no Estado do Rio de Janeiro (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae). *Iheringia, Série Zoologia* 97 (2): 152 – 156.
- CRICHTON, E. G., & P. H. KRUTZSCH. 2000. Reproductive Biology of Bats. Academic Press. 510 p.
- DOWNEY, B. R., J. E. MOOTOO, & S. E. DOYLE. 1998. A role for lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in porcine ovulation. *Animal Reproduction Science* 49 (4): 269 – 279.
- ESBÉRARD, C. E. L. 2002. Composição da colônia e reprodução de *Molossus rufus* em refúgio no sudeste do Brasil (Mammalia, Molossidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 19 (4): 1153 – 1160.
- ESBÉRARD, C. E. L. 2003a. Diversidade de morcegos em área de Mata Atlântica regenerada no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zoociências* 5 (2): 189 – 204.

- ESBÉRARD, C. E. L. 2003b. Marcação e deslocamento em morcegos. *Divulgação do Museu de Ciências e Tecnologia* 2: 23 – 24.
- FARIAS, T. O., S. A. TALAMONI, & H. P. GODINHO. 2018. Reproductive Dynamics of the Nectarivorous Geoffroy's Tailless Bat *Anoura geoffroyi* (Glossophaginae) in a Highland Neotropical Area of Brazil, with Evidence of a Mating Period. *Acta Chiropterologica* 20 (1): 251 – 261.
- FLEMING, T. H., E. T. HOOPER, & D. E. WILSON. 1972. Three central American bat communities: structure, reproductive cycles and movement patterns. *Ecology* 53: 555 – 569.
- GANNON, M. R., & M. R. WILLIG. 1992. Bat reproduction in the Luquillo Experimental Forest of Puerto Rico. *Southwest Naturalist* 37 (4): 414 – 419.
- GODOY, M. S., W. D. CARVALHO, & C. E. L. ESBÉRARD. 2014. Reproductive biology of the bat *Sturnira lilium* (Chiroptera, Phyllostomidae) in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 74: 913 – 922.
- GOMES, M. N., & W. UIEDA. 2004. Abrigos diurnos, composição de colônias, dimorfismo sexual e reprodução do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (E. Geoffroy) (Chiroptera, Phyllostomidae) no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21 (3): 629 – 638.
- HOLLIS, L. 2005. *Artibeus planirostris*. *Mammalian species* 775: 1 – 6.
- LEE, E. S., J. H. KIM, S. IM, K. B. LEE, S. SOHN, & W. H. KANG. 2001. Application of computerized image analysis in pigmentary skin diseases. *International Journal of Dermatology* 40: 45 – 9.
- LIMA, I. P. 2008. Espécies de Morcegos (Mammalia, Chiroptera) registradas em parques nas áreas urbanas do Brasil e suas implicações no uso deste ambiente. P.71 – 85. In: REIS,

- N. R., A. L. PERACCHI, & G. A. S. D. SANTOS (Org.). Ecologia de Morcegos. Londrina: Technical Books Editora.
- LIMA JUNIOR, N. B., M. J. G. ARANDAS, K. S. N. MARINHO, F. C. A. AGUIAR JÚNIOR; A. R. M. PONTES, & K. R. P. SANTOS. 2014. Histomorfometria testicular do morcego *Phyllostomus discolor* (Chiroptera: Phyllostomidae) em áreas de Mata Atlântica de Pernambuco. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science 51 (3): 263 – 270.
- LIMA JUNIOR, N. B. et al. 2018a. Analysis of the reproductive stage and ovarian histomorphometry of *Dermanura cinerea* (Chiroptera: Phyllostomidae) in an Atlantic Forest fragment of Pernambuco, northeastern Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira 38 (1): 167 – 174.
- LOUDON, A. S. I., & P. A. RACEY. 1987. Reproductive Energetics in Mammals. Symposia of the Zoological Society of London 57. 371p.
- MARTINS, F. S., J. R. V. SILVA, A. P. R. RODRIGUES, & J. R. FIGUEIREDO. 2008. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. Revista Brasileira de Reprodução Animal 32 (1): 36 – 39.
- MELO, B. E. S., M. S. BARROS, T. F. CARVALHO, T. S. AMARAL, & M. B. FREITAS. 2012. Energy reserves of *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae) in two areas with different degrees of conservation in Minas Gerais, Brazil. Brazilian Journal of Biology 72 (1): 181 – 187.
- MORAIS, D. B., T. A. R. PAULA, M. S. BARROS, M. K. BALARINI, M. B. D. FREITAS, S. L. P. MATTA. 2013b. Stages and duration of the seminiferous epithelium cycle in the bat *Sturnira lilium*. Journal of Anatomy 222: 372 – 379.
- MORAIS, P. H. F., J. A. ÁLVARES, L. JATOBÁ, & D. A. H. BASTOS. 2011. História da Vitória de Santo Antão: 1983 a 2010. 1.ed. Vitória de Santo Antão: CEPE, 595 p.

- NARKAR, M., S. KHOLKUTE, S. CHITLANGE, & T. NANDEDKAR. 2006. Expression of steroid hormone receptors, proliferation and apoptotic markers in primate endometrium. *Molecular and Cellular Endocrinology* 246: 107 – 13.
- NUNES, H. L., F. L. ROCHA, & P. CORDEIRO-ESTRELA. 2017. Bats In Urban Areas Of Brazil: Roosts, Food Resources And Parasites In Disturbed Environments. *Urban Ecosystems* 20 (4) 953 – 969.
- OBERHOLZER, M., M. OSTREICHER, H. CHRISTEN, & M. BRUHLMANN. 1996. Methods in quantitative image analysis. *Histochemistry and Cell Biology* 105: 333 – 355.
- OKTAY, K., R. S. SCHENKEN, & J. F. NELSON. 1995. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biology of Reproduction* 53 (2): 295-301.
- RACEY, P. A. 1988. Reproductive assessment in bats. In: Kunz T.H. (Ed.). *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. Washington, DC, Smithsonian Institution Press 31 – 43.
- RIEDER, N., & K. SCHMIDT. 1987. *Morphologische Arbeitsmethoden in der Biologie*. Germany: Verlagsgesellschaft mbH.
- ROCHA, P. A., J. S. MIKALOUSKAS, S. F. GOUVEIA, V. V. B. SILVEIRA, & A. L. PERACCHI. 2010. Morcegos (Mammalia, Chiroptera) capturados no Campus da Universidade Federal de Sergipe, com oito novos registros para o estado. *Biota Neotropica* 10 (3): 183 – 188.
- RODRIGUES, A. F., C. S. SANTIAGO, E. MORIELLE-VERSUTE, S. R. TABOGA, & M. R. BEGUELINI. 2019. Morphological variation of the female reproductive organs of the bat *Artibeus lituratus* during its different reproductive phases. *Journal of Morphology* 280: 1141 – 1155.

- RUSSO, D., & L. ANCILLOTTO. 2015. Sensitivity of bats to urbanization: A review. *Mammalian Biology* 80: 205 – 212.
- SANTOS, T. 2009. Fisiologia do ovário e da Fecundação. Oliveira CF. *Manual de Ginecologia* 1: 39 – 56.
- SARAIVA, M. V. A., M. H. T. MATOS, L. R. FAUSTINO, J. J. H. CELESTINO, J. R. V. SILVA, J. R. FIGUEIREDO. 2010. Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 34 (4): 206 – 221.
- SATO, T. M., M. C. CARVALHO-RICARDO, W. UIEDA, F. C. PASSOS. 2015. Comunidade de morcegos da Estação Experimental de Itirapina. *Papéis Avulsos de Zoologia* 55 (1): 1 – 11.
- SILVA DE ARAUJO, M. L. V., & E. BERNARD. 2016. Green remnants are hotspots for bat activity in a large Brazilian urban area. *Urban Ecosystems* 19: 287 – 296.
- STRAUBE, F.C., & G. V. BIANCONI. 2002. Sobre a grandeza e a unidade utilizada para estimar esforço de captura com utilização de redes-de-neblina. *Chiroptera Neotropical* 8: 1-2.
- TADDEI, V. A. 1976. The reproduction of some Phyllostomidae (Chiroptera) from the northwestern region of the state of São Paulo. *Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo* 1: 313 – 330.
- TADDEI, V. A. 1980. Biologia reprodutiva de Chiroptera: Perspectivas e problemas. *Inter-Facies Escritos e Documentos* 6: 1 – 18.
- WEIBEL, E.R. 1963. Princípios e métodos para o estudo morfométrico do pulmão e outros órgãos. *Laboratory Investigation* 12: 131 – 155.
- WILLIG, M. R. 1985a. Reproductive patterns of bats from Caatingas and Cerrado Biomes in Northeast Brazil. *Journal of Mammalogy* 66 (4):668 – 681.

WILLIG, M.R. 1985b. Reproductive activity of female bats from Northeastern Brazil. *Bat Research News* 26: 17 – 20.

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

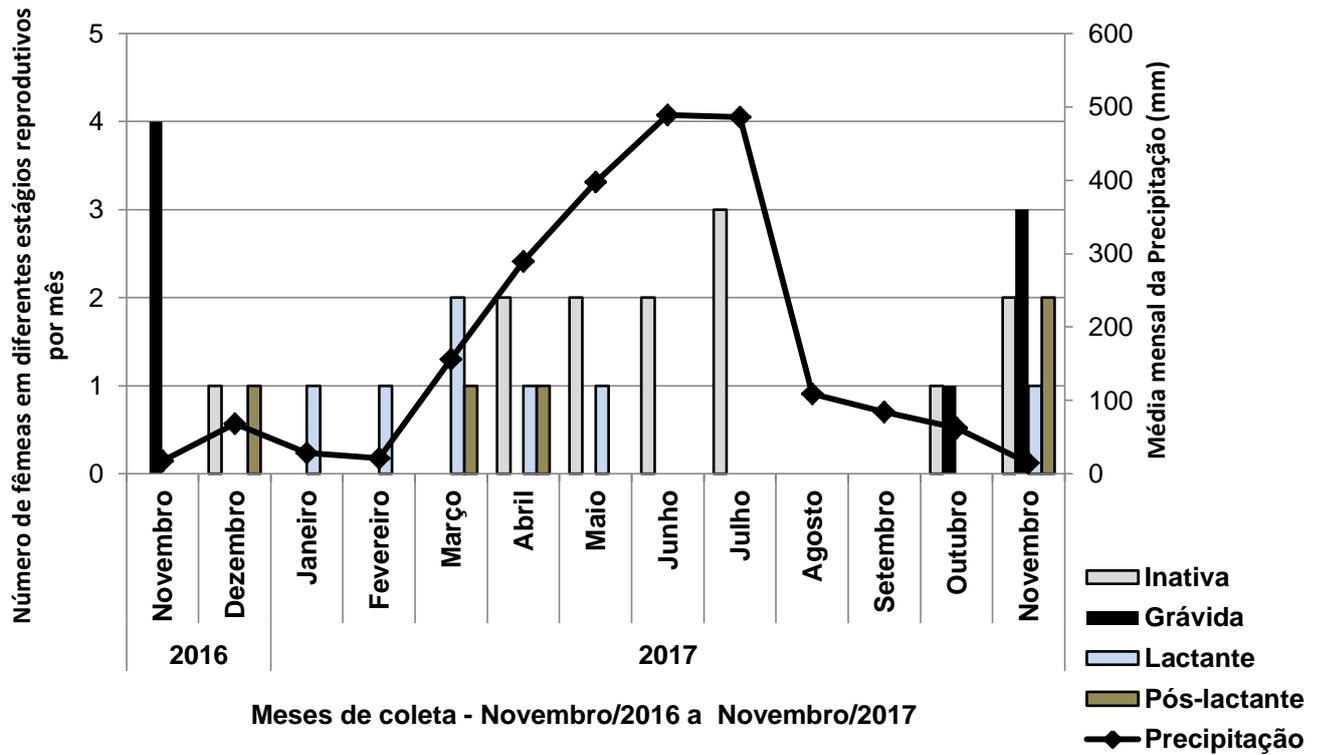


Fig. 1: Relação entre a precipitação mensal e o número de fêmeas de *Artibeus planirostris*, em diferentes estágios reprodutivos, capturadas no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.

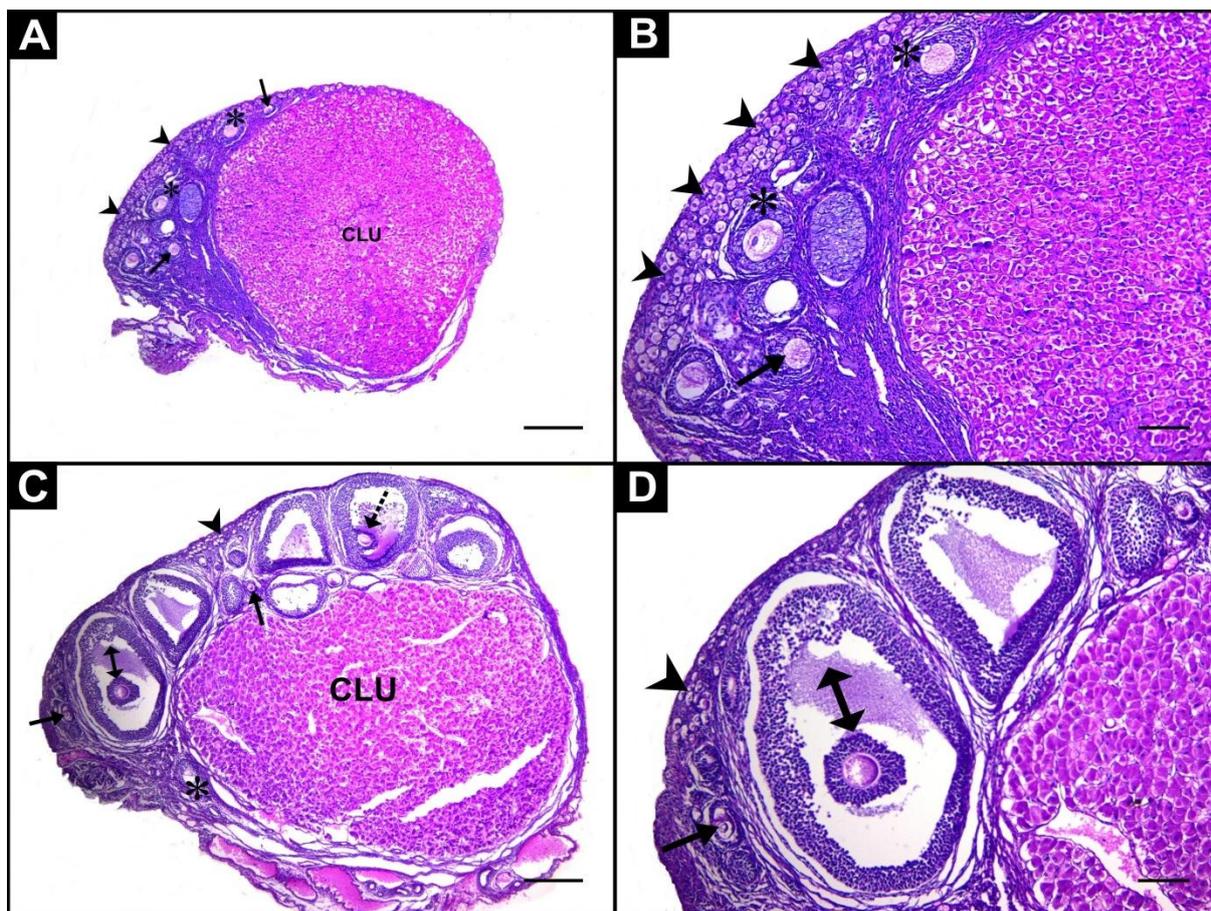


Fig. 2: Fotomicrografias dos ovários de *Artibeus planirostris* coletados em meses secos (A – B) e chuvosos (C – D) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Notar a presença de folículos ovarianos em diferentes estágios de maturação – folículos primordiais (cabeça de seta), folículo primário unilaminar (seta preta); folículo primário multilaminar (asterisco); folículo antral (seta pontilhada), folículo de Graaf (seta de duas cabeças) – e corpo lúteo (CLU). Coloração: H. E. Barras de escala = 300 μ m (A, C) e 100 μ m (B, D).

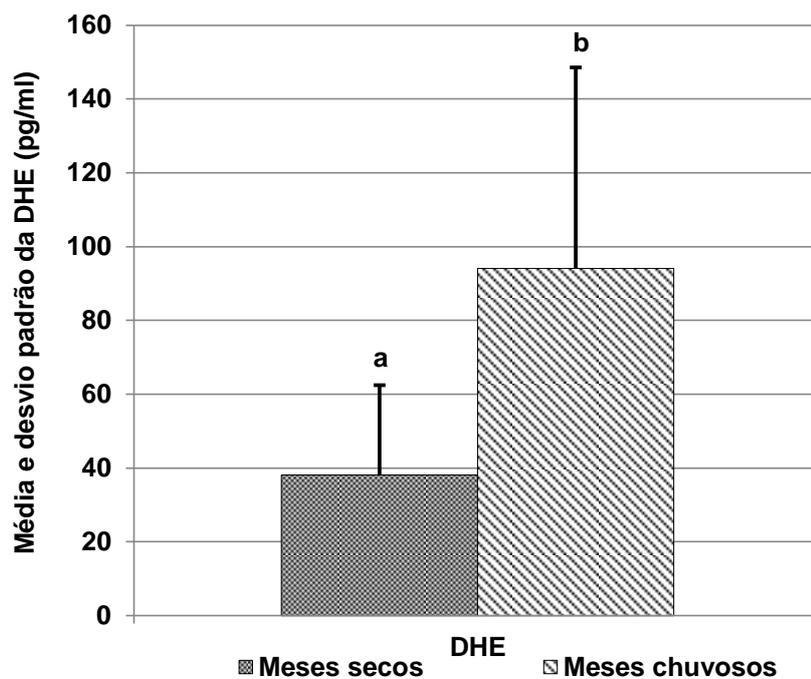


Fig. 3: Dosagem hormonal de estrógeno (DHE) de fêmeas de *Artibeus planirostris* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Médias seguidas por letras diferentes (a, b), diferem significativamente entre si pelo teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

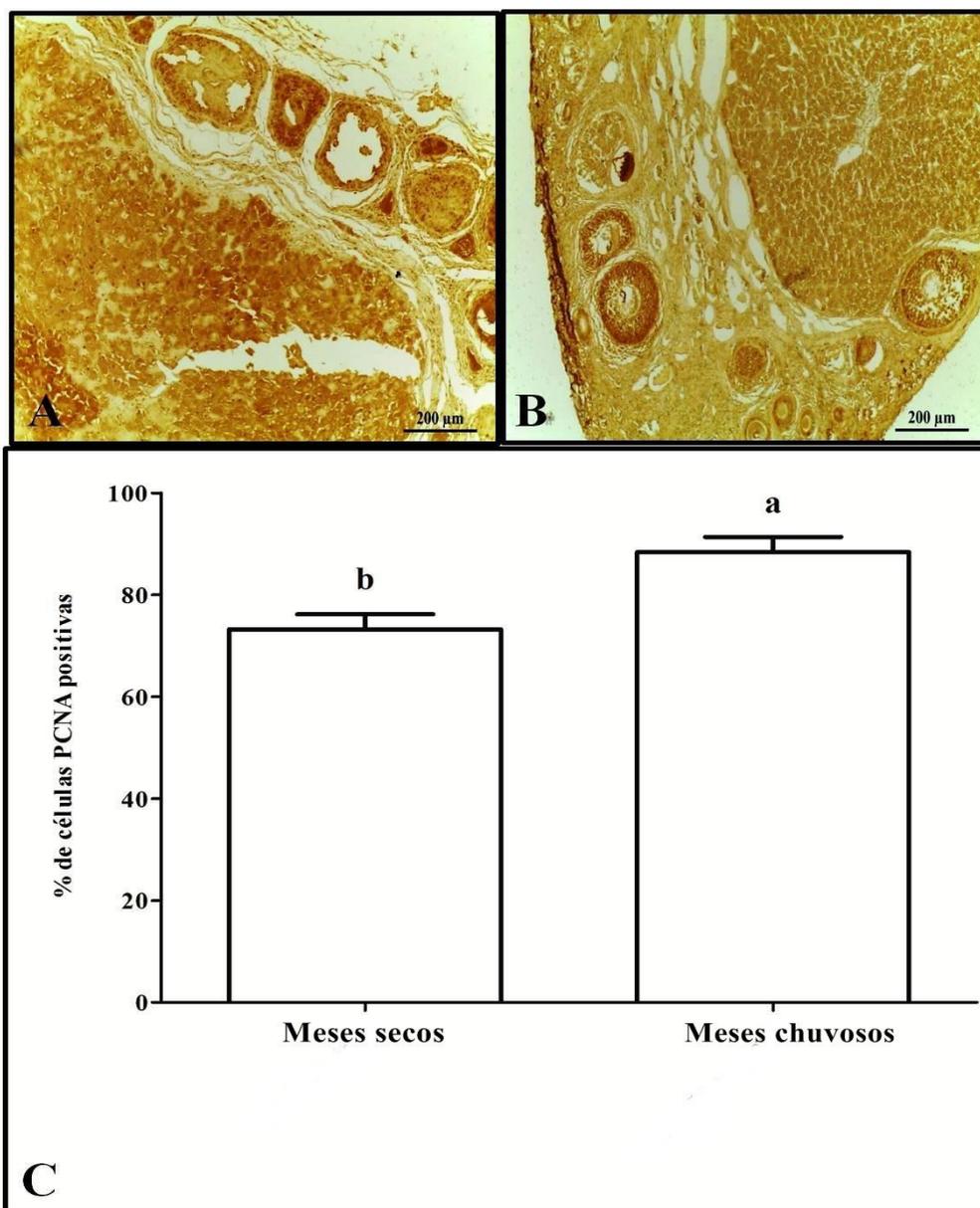


Fig. 4: Imuno-histoquímica do PCNA nos ovários de *Artibeus planirostris* coletados nos meses chuvosos (A) e secos (B) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Observar ainda a quantificação, em percentual, de células PCNA positivas em cada uma das estações (C). Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$).

Tabela 1

Números de folículo primário multilaminar (FPM), folículo antral (FAT), folículo de Graaf (FGA) e corpo lúteo (CLU) encontrados nas fêmeas inativas de *Artibeus planirostris*, coletadas em meses secos e chuvosos no Município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.

Quantitativo	Meses secos		Meses chuvosos		Total	Valor de p
	N (%)		N (%)			
FPM	7 (20,6%) ^a		27 (79,4 %) ^a		34 (100,0%)	0,475
FAT	2 (22,2%) ^a		7 (77,8 %) ^a		9 (100,0%)	0,377
FGA	0 (0,0%) ^a		3 (100,0 %) ^a		3 (100,0%)	0,188
CLU	4 (50,0%) ^a		4 (50,0%) ^a		8 (100,0%)	0,057

Letras sobrescritas iguais (a, a) na mesma linha indicam ausência de diferença significativa ($p < 0,05$) para o mesmo parâmetro analisado pelo teste de Qui-quadrado (X^2).

Tabela 2

Média da área (μm^2) dos folículos ovarianos: primário unilaminar (FPU), primário multilaminar (FPM), antral (FAT) e de Graaf (FGA) de *Artibeus planirostris* coletados no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.

Tipos de Folículos	Meses secos (2016)		Meses chuvosos (2017)			Meses secos (2017)	
	Dez.	Abr.	Mai.	Jun.	Jul.	Out.	Nov.
FPU	6939,68	3100,67	6210,03	4032,42	5955,76	5336,27	7767,73
FPM	34922,00	13161,15	33369,62	17131,17	35417,84	18261,28	39137,55
FAT	*	83796,75	81079,78	40013,07	86838,24	45096,52	*
FGA	*	*	*	89261,94	134997,58	*	*

* Folículo ausente no mês considerado.

CAPÍTULO IV

ARTIGO CIENTÍFICO III:

SAZONALIDADE TESTICULAR E EPIDIDIMÁRIA DE *Artibeus planirostris* (SPIX, 1823) (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE) EM UM MUNICÍPIO DA MESORREGIÃO DA MATA PERNAMBUCANA, NORDESTE DO BRASIL

SAZONALIDADE TESTICULAR E EPIDIDIMÁRIA DE *Artibeus planirostris* (SPIX, 1823) (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE) EM UM MUNICÍPIO DA MESORREGIÃO DA MATA PERNAMBUCANA, NORDESTE DO BRASIL

Nivaldo Bernardo de Lima Junior^{1*}, Ismaela Maria Ferreira de Melo¹, Fabricya Roberta da Silva¹, Erivaldo Alves Antonio¹, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior², Katharine Raquel Pereira dos Santos², Valéria Wanderley Teixeira¹ e Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹

¹Área de Morfologia, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Brasil.

*[Correspondência: Nivaldo Bernardo de Lima Junior <nivaldobernardo@hotmail.com>]

²Núcleo de Biologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Brasil.

Título curto: REPRODUÇÃO EM MACHOS DE *A. planirostris*.

RESUMO. Esse estudo avaliou a sazonalidade testicular e epididimária de *Artibeus planirostris* em Vitória de Santo Antão – Mesorregião da Mata Pernambucana, Nordeste brasileiro. O Instituto Nacional de Meteorologia forneceu os dados da precipitação, através da qual se estabeleceram meses secos (setembro a fevereiro) e chuvosos (março a agosto). Foram capturados machos adultos (n=16) em meses secos (n=08) e chuvosos (n=08), ao longo de uma noite por mês, no período de novembro de 2016 a novembro de 2017. Após a anestesia, foram coletadas amostras sanguíneas para dosagem de testosterona e, depois da eutanásia, testículos e epidídimos foram removidos e processados de acordo com a técnica histológica laboratorial. Na histomorfometria testicular, quantificaram-se: células de Leydig e de Sertoli, espermatogônias, espermátocitos, espermátides arredondadas e alongadas. Essas quantificações foram transformadas em percentual. Nos epidídimos, mensuraram-se a altura do epitélio, os diâmetros do túbulo e do lúmen. Na imuno-histoquímica, foi avaliada as células PCNA positivas do epitélio seminífero. Os resultados revelaram maior proliferação celular, e um aumento significativo nas células de Sertoli e espermatogônias em meses chuvosos. Nos meses secos, ocorreu aumento significativo nos espermátocitos, espermátides arredondadas e alongadas, bem como nos parâmetros das regiões da cabeça e corpo do epidídimo. As células de Leydig, a testosterona e os parâmetros da cauda do epidídimo, não apresentaram diferenças entre o agrupamento dos meses secos e chuvosos. Apesar dessas variações com alguns picos, de maneira geral, *A. planirostris* apresentou ampla adaptabilidade no seu ciclo reprodutivo, com atividade esteroidogênica e espermatogênica, em meses de baixos e elevados índices pluviométricos.

Palavras-chaves: condições ambientais, epidídimo, histomorfometria gonadal, morcego, testosterona.

ABSTRACT. Testicular and epididymal seasonality of *Artibeus planirostris* (Spix, 1823) (Chiroptera: Phyllostomidae) in a municipality of Mesorregião in Mata Pernambucana, northeast Brazil. This study evaluated the testicular and epididymal seasonality of *Artibeus planirostris* in Vitória de Santo Antão - Mesoregion of Mata Pernambucana, Northeastern Brazil. The National Institute of Meteorology provided precipitation data, through which dry (September to February) and rainy (March to August) months were established. Adult males (n=16) were captured in dry (n=08) and rainy (n=08) months, over one night per month, from November 2016 to November 2017. After anesthesia, blood samples were collected for testosterone dosage and, after euthanasia, testes and epididymis were removed and processed according to the laboratory histological technique. In testicular histomorphometry, Leydig and Sertoli cells, spermatogonia, spermatocytes, rounded and elongated spermatids were quantified. These quantifications were transformed into a percentage. In the epididymis, the height of the epithelium, the diameters of the tubule and the lumen were measured. In immunohistochemistry, PCNA positive cells from the seminiferous epithelium were evaluated. The results revealed greater cell proliferation and a significant increase in Sertoli cells and spermatogonia in rainy months. In the dry months, there was a significant increase in spermatocytes, rounded and elongated spermatids, as well as in the parameters of the caput and corpus regions of the epididymis. Leydig cells, testosterone, and cauda parameters of the epididymis, showed no differences between the dry and rainy months. Despite these variations with some peaks, in general, *A. planirostris* showed ample adaptability in its reproductive cycle, with steroidogenic and spermatogenic activity, in months of low and high rainfall.

Key words: bat, environmental conditions, epididymis, gonadal histomorphometry, testosterone.

1 INTRODUÇÃO

Os morcegos são mamíferos voadores que desempenham papéis ecológicos importantes nos diferentes biomas que habitam (Kunz et al. 2011; Nogueira et al. 2014). A forma e os locais em que se encontram distribuídos, influenciam o forrageamento e a biologia reprodutiva das diferentes espécies. Assim, os eventos que ocorrem no trato reprodutor desses animais, ainda apresentam limitações, tendo em vista a ampla quantidade de espécies no mundo (Bredt et al. 1999; Barros et al. 2006; Reis et al. 2006).

Esses animais possuem considerável flexibilidade em relação a sua reprodução, principalmente, àquelas espécies que se encontram situadas na região neotropical (Balmori 1999; Reis et al. 2011). Essa plasticidade pode envolver mudanças morfofisiológicas nos testículos e epidídimos, que estão associadas geralmente às condições ambientais que, a depender da sua área de ocorrência, podem ser variáveis ao longo do ano e interferir no ciclo reprodutivo desses mamíferos (Crichton & Krutzsch 2000; Zortéa 2003; Lee & Mori 2004; Beguelini et al. 2012; Araújo et al. 2013; Martins et al. 2015).

Apesar de no território brasileiro terem sido realizados alguns estudos sobre a morfofisiologia testicular e epididimária dos quirópteros, ainda são desconhecidos os padrões e as estratégias reprodutivas desempenhadas por muitas outras espécies no país. Até mesmo aquelas espécies, nas quais se verificaram como é o seu comportamento reprodutivo em determinada área, podem apresentar um padrão totalmente diverso em outra localidade. Com isso, há diversos fatores relacionados que podem influenciar a sazonalidade da espermatogênese e da esteroidogênese nas gônadas, assim como a maturação, a viabilidade e o armazenamento dos espermatozoides nos epidídimos (Beguelini et al. 2013d; 2015; Morais et al. 2014b; 2017; Lima Junior et al. 2014; 2018b; Castro et al. 2017; Campolina-Silva et al. 2018; Ferreira et al. 2018; Souza et al. 2018; Arandas et al. 2019).

Dentre as espécies de morcegos encontradas no Brasil, *Artibeus planirostris* (Spix 1823) pertence à família Phyllostomidae e subfamília Stenodermatinae, apresenta hábito alimentar predominantemente frugívoro e tem importante função na regeneração de matas, por meio da dispersão de sementes de várias espécies de plantas (Oliveira & Lemes 2010; Reis et al. 2011). No território nacional, algumas investigações inferiram sobre a atividade reprodutiva dos machos dessa espécie em outros biomas (Beguelini et al. 2009; 2013a; b), contudo, ainda não se sabe quais os efeitos da sazonalidade sobre as gônadas masculinas e epidídimos dessa espécie, em área de perímetro urbanizado no estado de Pernambuco.

Tendo em vista esses aspectos, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a sazonalidade nos testículos e epidídimos de *A. planirostris*, através da histomorfometria, imuno-histoquímica e dosagem hormonal, em meses secos e chuvosos, em um município da Mata Pernambucana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e animais utilizados

Esse estudo foi desenvolvido na área pertencente ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco – IFPE – *Campus* do município de Vitória de Santo Antão (08° 07' 05'' de latitude sul e 35° 17' 29'' de longitude oeste). Esse município faz parte da Mesorregião da Mata Pernambucana e Microrregião de Vitória de Santo Antão. O clima dessa região é quente e úmido do tipo tropical chuvoso. A vegetação é formada predominantemente por formações de Floresta Estacional Semidecidual e de Floresta Ombrófila Densa (Morais et al. 2011; Costa 2012).

A coleta dos animais foi licenciada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO (Nº: 22418-1) do Instituto Chico Mendes de Conservação da

Biodiversidade – ICMBio. A realização dos procedimentos experimentais obteve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE com o seguinte número de processo: 23076.039757/2016-81.

Essas coletas ocorreram ao longo de uma noite, por mês, durante os meses de novembro de 2016 a novembro de 2017, de forma que em cada noite de captura foram utilizadas 05 redes de neblina de 12 m de comprimento x 3 m de altura. Com isso, o esforço de captura foi de 11700 m². h de acordo com a metodologia de Straube & Bianconi (2002).

Foram utilizados apenas animais machos e adultos (n=16) da espécie *A. planirostris*, capturados em meses secos (n=08) e chuvosos (n=08). A idade de cada um dos espécimes coletados foi definida através de observações embasadas no grau de ossificação das epífises, tanto dos metacarpos quanto das falanges das asas (Anthony 1988).

2.2 Meteorologia

Os dados meteorológicos referentes às médias da precipitação (mm), temperatura (C°) e umidade do ar (%), foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia – INMET (3° Distrito). Foi considerada a estação meteorológica do município de Recife – Pernambuco, que é a mais próxima de Vitória de Santo Antão, posto que cada estação possui representação com raio de 150 km de circunferência.

Por meio das médias mensais da precipitação, foi possível estabelecer meses com índices pluviométricos baixos (meses secos – setembro a fevereiro) e meses com índices pluviométricos elevados (meses chuvosos – março a agosto). Esse agrupamento foi definido tendo como base o que já se tem publicado em outras investigações, para essas áreas de Mata Atlântica de Pernambuco (Lima Junior et al. 2014; Asfora et al. 2017).

2.3 Eutanásia dos animais e coleta dos órgãos

Todos os espécimes machos de *A. planirostris* considerados no estudo foram eutanasiados seguindo a metodologia de Moraes et al. (2013b), em que inicialmente foi aplicada anestesia, com fármaco pentobarbital sódico, na região intraperitoneal do corpo com concentração de 40 mg/kg⁻¹. Em seguida, foi inoculada uma solução saturada constituída por cloreto de potássio.

Após a eutanásia, os testículos e epidídimos foram coletados. Para tanto, foi realizada uma incisão na pele da região inguinal, com o auxílio de instrumentos adequados de microdissecação, que possibilitou a exposição e remoção desses órgãos.

2.4 Análises histológicas e morfométricas

Os testículos e os epidídimos de *A. planirostris* passaram pelo processo de fixação em solução de formalina a 10% neutra tamponada (NBF) por um período de 24 horas. Em seguida, foram conservados em solução de álcool a 70% - glicerizada a 5% e processados de acordo com a técnica histológica de rotina (Behmer et al. 1976; Rieder & Schmidt 1987). Os órgãos foram inclusos em blocos de parafina e cortados em micrótomo com espessura de 4 µm (micrômetros).

As lâminas histológicas produzidas a partir dos cortes de ambos os órgãos, foram coradas por Hematoxilina – Eosina (H. E.) e fotografadas em aumento total de 400X (testículos) e de 100X (epidídimos) no programa *ISCapture*, cujo *software* estava instalado em um computador, ao qual foi acoplado um microscópio óptico para captura das fotomicrografias. As medidas e contagens dos parâmetros considerados nos órgãos, foram realizadas através do programa *ImageJ*.

Nos testículos, consideraram-se os túbulos seminíferos que possuíam todos os tipos celulares da linhagem espermatogênica, e células de Sertoli. Assim, foi quantificado o número de: células de Sertoli (CS), espermatogônias (EPG), espermatócitos (EPC), espermátides arredondadas (EAR) e espermátides alongadas (EAL), de forma que um total de dez túbulos seminíferos por espécime foi considerado. Enquanto que no compartimento intertubular, foram quantificadas as células de Leydig (CL) em dez fotomicrografias diferentes por animal (Lima Junior et al. 2018b). A contagem de todos esses tipos celulares, posteriormente, foi transformada e apresentada em porcentagem (%).

Nos epidídimos, os seguintes parâmetros histomorfométricos foram mensurados: altura do epitélio (AE), diâmetro do túbulo (DT) e diâmetro do lúmen (DL). A AE foi determinada por meio da média aritmética de quatro medidas do epitélio de cada túbulo, partindo desde a base até a sua superfície apical, de modo que cada uma dessas medidas estava situada diametralmente oposta entre si. As medidas dos três parâmetros considerados foram realizadas em cada uma das regiões do epidídimo. Foram considerados 20 cortes transversais do túbulo desse órgão, para cada região por animal (Castro et al. 2017).

2.5 Análise imuno-histoquímica (PCNA)

As lâminas dos testículos foram submetidas aos processos de desparafinização e reidratação. Depois passaram pela etapa de recuperação antigênica, na qual se utilizou o tampão citrato (pH 6,0) em temperatura elevada no micro-ondas, por um tempo de 10 minutos. Após isso, foi induzida a inibição da peroxidase endógena, por meio do peróxido de hidrogênio a 3%, durante 30 minutos. Foi utilizado o anticorpo primário PCNA (Santa Cruz Biotechnology). O bloqueio da reação antígeno – anticorpo inespecífica foi feito mediante incubação das lâminas em solução de Tris/BSA (albumina sérica bovina) a 5%. A diluição do anticorpo foi feita também em Tris/BSA a 5% (1:100). As lâminas foram organizadas em

câmara úmida em overnight na geladeira. No dia seguinte, foi colocado sobre os cortes o anticorpo secundário durante 30 minutos. Foi possível verificar a reação antígeno – anticorpo através do precipitado originado em cor marrom, depois de serem revelados com DAB (3,3 diaminobenzidina), bem como contracolorados com a hematoxilina. Depois de montadas, as lâminas tiveram as imagens capturadas por uma câmera de vídeo Sony, acoplada ao microscópio Olympus BX-50, com a objetiva 40x e submetidas ao aplicativo GIMP 2.0 para quantificação usando o histograma RGB (vermelho-verde-azul). Este se baseia na intensidade da luminescência, em que os tons de pixel da imagem variam de 0 (menos luminescência) a 255 (branco absoluto – maior luminescência) (Oberholzer et al. 1996; Lee et al. 2001). A contagem foi realizada usando um retículo WEIBEL de 25 pontos, seguido por uma ocular de 10x. Foram utilizadas três lâminas de cada um dos grupos, nas quais foram analisados 10 túbulos seminíferos, com uma objetiva de 10x. Em cada campo, 300 células do epitélio seminífero foram contadas e transformadas em porcentagem de células marcadas (Weibel 1963).

2.6 Dosagem hormonal

De cada animal foi coletada amostra de sangue, através de punção cardíaca do ventrículo esquerdo. Essas amostras foram encaminhadas para análise dos níveis séricos do hormônio testosterona em pg/mL (picograma por mililitro), em um laboratório comercial, seguindo o método da quimioluminescência.

2.7 Análises estatísticas

Os dados histomorfométricos testiculares e epididimários, assim como a dosagem hormonal dos meses secos e chuvosos, foram analisados no programa SPSS (*Statistical Package of the Social Sciences*, SPSS inc. Chicago, EUA) versão 15.0. Esses dados foram submetidos

inicialmente ao teste de Kolmogorov-Smirnov com o intuito de saber se a distribuição era normal. Na sequência foi utilizado o teste U de Mann-Whitney, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Na análise imuno-histoquímica, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

De acordo com as análises histológicas, os testículos de *A. planirostris* apresentaram células da linhagem espermatogênica e de Sertoli, nos túbulos seminíferos, bem como células de Leydig no intertúbulo, ao longo dos meses secos e chuvosos (Fig. 1). Enquanto que nos epidídimos, três regiões foram identificadas (cabeça, corpo e cauda), de forma que se observou maior concentração de espermatozoides na região da cauda, tanto em meses de elevados quanto de baixos índices pluviométricos (Fig. 2).

As análises morfométricas das gônadas indicaram que *A. planirostris* apresentou percentuais maiores e significativos das células de Sertoli (CS) e das espermatogônias (EPG) em meses chuvosos, ao passo que os espermatócitos (EPC), as espermatídes arredondadas (EAR) e as espermatídes alongadas (EAL) foram maiores e significantes em meses secos. As células de Leydig não apresentaram diferenças entre o agrupamento dos meses secos e chuvosos (Fig. 3).

Na dosagem do hormônio testosterona, não houve diferença significativa ($p = 0,721$) entre as médias obtidas para os meses secos (159,59 pg/mL) e chuvosos (171,75 pg/mL). Enquanto que na imuno-histoquímica ocorreu diferença significativa, com maior percentual de células PCNA positivas encontradas em meses chuvosos, sobretudo, na base do epitélio seminífero (Fig. 4).

Nos resultados morfométricos do epidídimo, a altura do epitélio (AE), o diâmetro do túbulo (DT) e o diâmetro do lúmen (DL), das regiões da cabeça e corpo, apresentaram médias maiores e significativas em meses secos. Enquanto que na região da cauda, nenhum dos parâmetros analisados (AE, DT e DL) foi significativo (Tab. 1).

4 DISCUSSÃO

Durante os meses chuvosos, a espécie *Artibeus planirostris* apresentou maior atividade na fase mitótica de sua espermatogênese, bem como um investimento significativo na nutrição e suporte das células da linhagem espermatogênica em desenvolvimento. Como as espermatogônias passam por diferentes divisões para dar origem a outros tipos celulares, e as células de Sertoli precisam sustentar a espermatogênese, faz-se necessário uma elevada demanda energética. Essas observações coincidiram também com a maior proliferação celular verificada na parte mais basal do epitélio seminífero, o que reforça a hipótese de que essa espécie desempenha maior atividade mitótica em meses de índices pluviométricos elevados, os quais ofertarão condições adequadas para os mecanismos morfofisiológicos testiculares (Barros et al. 2013; Beguelini et al. 2013b; 2015; Campolina-Silva et al. 2018).

Nesses meses chuvosos, as células de Sertoli de *A. planirostris* podem atuar em uma maior liberação dos seus produtos de secreção, como a proteína de ligação de andrógenos (ABP), para que fiquem concentradas em maior quantidade do lúmen dos túbulos seminíferos nos meses secos seguintes, pois favorecerá as células da linhagem espermatogênica em estágio final de diferenciação. Apesar disso, não houve variações nas concentrações dos níveis séricos de testosterona, nem no percentual de células de Leydig, de forma que ambos não apresentaram alterações correspondentes entre os meses. Isso pode ser explicado pelo fato de que a secreção desse hormônio parece está associada à capacidade individual das células de Leydig. Assim, o citoplasma e o núcleo dessas células podem apresentar mudanças, nos seus respectivos volumes, que influenciam na secreção total de testosterona (Ross & Pawlina 2008; Morais et al. 2013a; c; 2014a; 2017; Ferreira et al. 2018).

Nos meses secos, essa espécie apresentou maior atividade na diferenciação de espermatócitos e espermátides, revelando nas fases finais da sua espermatogênese (meiose e

espermiogênese), uma maior afinidade com as condições ambientais ofertadas durante os meses de baixos índices pluviométricos. Assim, nesse período ocorrem alterações morfológicas essenciais como formação do acrossoma, condensação da cromatina, fagocitose do excesso de citoplasma (corpo residual) até o total crescimento do flagelo dos espermatozoides diferenciados a partir das espermátides alongadas, para que possam ser direcionados ao ducto epididimário (Suphamongmee et al. 2008; Morais et al. 2013c; Farias et al. 2014; Lima Junior et al. 2018b).

Os resultados dos testículos complementam os encontrados para o ducto e o lúmen do epidídimo, que seguiram um padrão de aumento nas regiões da cabeça e corpo também em meses secos, revelando que ambas as regiões passam por modificações que contribuem na mobilidade progressiva, bem como na capacidade, dos espermatozoides recém espermiados, reconhecer e fertilizar o ovócito. Como a cauda desse órgão não apresentou diferenças entre os meses, tudo indica que essa região apresenta um ambiente ideal para garantir o armazenamento adequado e suficiente dos espermatozoides, em qualquer época do ano durante um tempo considerável (Serre & Robaire 1998; Aguilera-Merlo et al. 2005; Beguelini et al. 2010; Tobón et al. 2010; Beguelini et al. 2013c; Notini et al. 2015).

A adaptabilidade epididimária na região da cauda de *A. planirostris* está diretamente associada à testosterona que também não variou, pois a funcionalidade do epidídimo é controlada por um amplo complexo de hormônios, principalmente, a testosterona e seu produto de conversão – a di-hidrotestosterona – através da enzima 5 α -redutase. A presença desse hormônio é essencial na maturação e viabilidade das células reprodutoras masculinas, uma vez que contribuirá na modificação da cabeça dessas células por meio da adição do fator de decapacitação associado à superfície, com os glicoconjugados existentes no fluido epididimal, de modo que esse fator será liberado no processo de capacitação que acontece no trato reprodutor das fêmeas durante a cópula e antes da fecundação (Ross & Pawlina 2008;

Beguelini et al. 2013a; c; 2015; Robaire & Hinton, 2015; Castro et al. 2017; Ferreira et al. 2018).

Essa espécie apresentou um padrão reprodutivo semelhante, em um bioma de Cerrado degradado no estado de São Paulo, com atividade espermatogênica nos testículos e presença de espermatozoides viáveis na região caudal do epidídimo, durante todo o ano. Embora, em tal investigação tenha ocorrido dois picos de produção espermatogênica. E os nossos resultados demonstraram que *A. planirostris* também possui picos na sua atividade testicular e epididimária, contudo ao que se parece, está sempre ajustando sua reprodução de acordo com as condições ambientais que são ofertadas e, como estas são diversas, faz com que a morfofisiologia desses órgãos apresentem mudanças durante o ano. Concordamos também que essa plasticidade tem relações com o sistema de acasalamento poligínico e, possivelmente, com o ajustamento ao ciclo reprodutivo das fêmeas (Beguelini et al. 2010; 2013b; Lima Junior et al. 2018b; Souza et al. 2018).

Portanto, embora *A. planirostris* apresente algumas particularidades com médias maiores em determinados meses, essa espécie tem um considerável ajuste na sua reprodução e encontra-se fértil em ambos os períodos considerados. Com isso, possui atividade esteroidogênica que garanta o suprimento hormonal necessário para o acasalamento, independente das variações pluviométricas. Isso pôde ser comprovado pela presença de todos os tipos celulares (da linhagem espermatogênica e de Sertoli) encontrados nos túbulos seminíferos, assim como pelo armazenamento das células reprodutoras masculinas nos epidídimos, tanto nos meses secos quanto nos meses chuvosos, em área de perímetro urbanizado da Mesorregião da Mata Pernambucana.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida ao primeiro autor durante o doutorado.

5 LITERATURA CITADA

- AGUILERA-MERLO, C., E. MUÑOZ, S. DOMINGUEZ, L. SCARDAPANE, & R. PIEZZI. 2005. Epididymis of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): Morphological changes during the annual reproductive cycle. *Anatomical Record* 282: 83 –92.
- ANTHONY, E. L. P. 1988. Age determination in bats. In: KUNZ, T. H. ed. *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. Washington, Smithsonian Institution 47 – 58.
- ARANDAS, M. J. G. et al. 2019. Seasonal influence on testicular morphophysiological parameters of bat *Carollia perspicillata* in fragments of the Atlantic Forest, northeastern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 39 (6): 429 – 433.
- ARAÚJO, R. A., B. D. AMARO, S. A. TALAMONI, & H. P. GODINHO. 2013. Seasonal reproduction of yellowish Myotis, *Myotis levis* (Chiroptera: Vespertilionidae), from a Neotropical highland. *Journal of Morphology* 274 (11): 1230 – 1238.
- ASFORA, M. C., M. LIMA, & M. R. S. LACERDA. 2017. Diagnóstico da seca 2011-2016 em Pernambuco: impactos e políticas de mitigação. *Parcerias Estratégicas*, Brasília, DF 22 (44): 247 – 274.
- BALMORI, L. 1999. La reproducción em los quirópteros. *Revisiones em Mastozoología* 11: 17 – 34.

- BARROS, M. S. et al. 2013. Seasonal variation of energy reserves and reproduction in neotropical free-tailed bats *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Brazilian Journal of Biology* 73 (3): 629 – 635.
- BARROS, R. S., E. L. BISAGGIO; & R. C. BORGES. 2006. Morcegos (Mammalia, Chiroptera) em fragmentos florestais urbanos no Município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Sudeste do Brasil. *Biota Neotropica* 6 (1).
- BEGUELINI, M. R., R. M. GOES, P. RAHAL, E. MORIELLE-VERSUTE, & S. R. TABOGA. 2015. Impact of the Processes of Total Testicular Regression and Recrudescence on the Epididymal Physiology of the Bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *PLOS One* 1 – 18.
- BEGUELINI, M. R., R. M. GOES, S. R. TABOGA, & E. MORIELLE-VERSUTE. 2013c. 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* 26: 834 – 846.
- BEGUELINI, M. R., P. R. L. MOREIRA, K. C. FARIA, S. R. C. MARCHESIN, & E. MORIELLE-VERSUTE. 2009. Morphological Characterization of the Testicular Cells and Seminiferous Epithelium Cycle in Six Species of Neotropical Bats. *Journal of Morphology* 270: 943 – 953.
- BEGUELINI, M. R., C. C. I. PUGA, F. F. MARTINS, A. H. S. BETOLI, S. R. TABOGA, & E. MORIELLE-VERSUTE. 2013a. Morphological Variation of Primary Reproductive Structures in Males of Five Families of Neotropical Bats. *The Anatomical Record* 296: 156 – 167.
- BEGUELINI, M. R., C. C. I. PUGA, S. R. TABOGA, & E. MORIELLE-VERSUTE. 2013b. Annual reproductive cycle of males of the flat-faced fruit-eating bat, *Artibeus*

- planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). *General and Comparative Endocrinology* 185: 80 – 89.
- BEGUELINI, M. R., B. F. S. SERGIO, F. L. J. LEME, S. R. TABOGA, & E. MORIELLE-VERSUTE. 2010. Morphological and morphometric characteristics of the epididymis in the Neotropical bats *Eumops glaucinus* and *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Chiroptera Neotropical* 16 (2): 769 – 779.
- BEGUELINI, M. R., S. R. TABOGA, & E. MORIELLE-VERSUTE. 2012. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in Pallas's Mastiff bat, *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Microscopy Research and Technique*.
- BEGUELINI, M. R., S. R. TABOGA, & E. MORIELLE-VERSUTE. 2013d. 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* 76: 1035 – 1049.
- BEHMER, O. A., E. M. C. TOLOSA, & A. G. F. NETO. 1976. *Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica*. Edart, Universidade de São Paulo, São Paulo. 239p.
- BREDT, A., W. UIEDA, & E. D. MAGALHÃES. 1999. Morcegos cavernícolas da região do Distrito Federal, centro-oeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera). *Revista Brasileira de Zoologia* 16 (3): 731 – 770.
- CAMPOLINA-SILVA, G. H., R. A. HESS, & C. A. OLIVEIRA. 2018. Seasonal variation of cell proliferation and apoptosis in the efferent ductules and epididymis of the Neotropical bat *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae). *General and Comparative Endocrinology* 273: 3 – 10.
- CASTRO, M. M. et al. 2017. Ultrastructure and morphometric features of epididymal epithelium in *Desmodus rotundus*. *Micron* 102: 35 – 43.

- COSTA, C. 2012. Uma Floresta de oportunidades: um novo olhar sobre a Mata Atlântica do Nordeste. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 56 p.
- CRICHTON, E. G., & P. H. KRUTZSCH. 2000. Reproductive Biology of Bats. Academic Press. 510 p.
- FARIAS, T.O., A. A. NOTINI, S. A. TALAMONI, & H. P. GODINHO. 2014. Testis Morphometry and Stages of the Seminiferous Epithelium Cycle in an Epididymal Sperm-storing Neotropical Vespertilionid, *Myotis levis* (Chiroptera). *Anatomia, Histologia, Embryologia* 44 (5): 361 – 369.
- FERREIRA, M., A. SOLDATI, S. S. S. RODRIGUES, & L. A. BENJAMIN. 2018. Implications of body condition and seasonality on morphological and functional parameters of testes of *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Reproduction, Fertility and Development* 30: 1029 – 1037.
- LEE, E. S., J. H. KIM, S. IM, K. B. LEE, S. SOHN, & W. H. KANG. 2001. Application of computerized image analysis in pigmentary skin diseases. *International Journal of Dermatology* 40: 45 – 9.
- LEE, J. H., & T. MORI. 2004. Annual cycle of the seminiferous epithelium of *Myotis macrodactylus*. *Journal of Faculty of Agriculture, Kyushu University* 49 (2): 355 – 365.
- LIMA JUNIOR, N. B., M. J. G. ARANDAS, K. S. N. MARINHO, F. C. A. AGUIAR JÚNIOR; A. R. M. PONTES, & K. R. P. SANTOS. 2014. Histomorfometria testicular do morcego *Phyllostomus discolor* (Chiroptera: Phyllostomidae) em áreas de Mata Atlântica de Pernambuco. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 51 (3): 263 – 270.
- LIMA JUNIOR, N. B. et al. 2018b. Estágio reprodutivo, histologia e morfometria sazonal do testículo de *Dermanura cinerea* (Chiroptera: Phyllostomidae) em fragmento de Mata Atlântica no Litoral Sul de Pernambuco, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia* 108 (0).

- KUNZ, T. H., E. B. TORREZ, D. BAUER, T. LOBOVA, & T. H. FLEMING. 2011. Ecosystem services provided by bats. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1223 (1): 1 – 38.
- MARTINS, F. F., C. C. I. PUGA, M. R. BEGUELINI, E. MORIELLE-VERSUTE, P. S. L., VILAMAIOR, & S. R. TABOGA. 2015. Comparative Analysis of the Male Reproductive Accessory Glands of Bat Species From the Five Brazilian Subfamilies of the Family Phyllostomidae (Chiroptera). *Journal of Morphology* 276: 470 – 480.
- MORAIS, D. B., M. S. BARROS, M. B. D. FREITAS, T. A. R. PAULA, & S. L. P. MATTA. 2014a. Histomorphometric characterization of the intertubular compartment in the testes of the bat *Sturnira lilium*. *Animal Reproduction Science* 147 (3 – 4): 180 – 186.
- MORAIS, D. B., M. S. BARROS, T. A. R. PAULA, M. B. D. FREITAS, M. L. M. GOMES, & S. L. P. MATTA. 2014b. Evaluation of the cell population of the seminiferous epithelium and spermatid indexes of the bat *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae). *PloS One* 9 (7): e101759.
- MORAIS, D. B. et al. 2013c. Histomorphometric evaluation of the *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae) testis: The tubular compartment indices of sperm production. *Animal Reproduction Science* 140: 268 – 278.
- MORAIS, D. B. et al. 2013a. Organization and seasonal quantification of the intertubular compartment in the bat *Molossus molossus* (Pallas, 1776) testis. *Microscopy Research and Technique*, 76 (1): 94 – 101.
- MORAIS, D. B., T. A. R. PAULA, M. S. BARROS, M. K. BALARINI, M. B. D. FREITAS, & S. L. P. MATTA. 2013b. Stages and duration of the seminiferous epithelium cycle in the bat *Sturnira lilium*. *Journal of Anatomy* 222: 372 – 379.

- MORAIS, D. B., L. C. H. P. PUGA, T. A. R. PAULA, M. B. D. FREITAS, & S. L. P. MATTA. 2017. The spermatogenic process of the common vampire bat *Desmodus rotundus* under a histomorphometric view. PLOS One.
- MORAIS, P. H. F., J. A. ÁLVARES, L. JATOBÁ, & D. A. H. BASTOS. 2011. História da Vitória de Santo Antão: 1983 a 2010. 1.ed. Vitória de Santo Antão: CEPE, 595 p.
- NOGUEIRA, M. R., I. P. LIMA, R. MORATELLI, V. C. TAVARES, R. GREGORIN, & A. L. PERACCHI. 2014. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. Check List 10 (4): 808 – 821.
- NOTINI, A. A., T. O. FARIAS, S. A. TALAMONI, & H. P. GODINHO. 2015. Annual male reproductive activity and stages of the seminiferous epithelium cycle of the large fruit-eating *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae). Zoologia 32 (3): 195 – 200.
- OBERHOLZER, M., M. OSTREICHER, H. CHRISTEN, & M. BRUHLMANN. 1996. Methods in quantitative image analysis. Histochemistry and Cell Biology 105: 333 – 355.
- OLIVEIRA, A. K. M., & F. T. F. LEMES. 2010. *Artibeus planirostris* como dispersor e indutor de germinação em uma área do Pantanal do Negro, Mato Grosso do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Biociências 8 (1): 49 – 52.
- REIS, N. R., I. P. LIMA, & A. L. PERACCHI. 2006. Morcegos (Chiroptera) da área urbana de Londrina, Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia 19: 739 – 746.
- REIS, N. R., A. L. PERACCHI, A. W. PEDRO, & I. P. LIMA. 2011. Mamíferos do Brasil. 2ed. ed. 12 Londrina: [s.n.].
- RIEDER, N., & K. SCHMIDT. 1987. Morphologische Arbeitsmethoden in der Biologie. Germany: Verlagsgesellschaft mbH.
- ROBAIRE, B., & B. T. HINTON. 2015. The Epididymis. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (4th edition). Academic Press 691 – 771.

- ROSS, M. H., & W. PAWLINA. 2008. Histologia: texto e atlas: em correlação com biologia celular e molecular. 5. ed. Rio de Janeiro; Buenos Aires [Argentina]: Guanabara Koogan: Panamericana.
- SERRE, V., & B. ROBAIRE. 1998. Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. *Biology of Reproduction* 58: 497 – 513.
- SOUZA, A. C. F., et al. 2018. Reproductive functions in *Desmodus rotundus*: A comparison between seasons in a morphological context. *PLoS ONE* 13 (10) e0205023.
- STRAUBE, F.C., & G. V. BIANCONI. 2002. Sobre a grandeza e a unidade utilizada para estimar esforço de captura com utilização de redes-de-neblina. *Chiroptera Neotropical* 8: 1-2.
- SUPHAMUNGMEE, W., W. WEERACHATYANUKUL, T. POOMTONG, P. HANNA, & P. SOBHON. 2008. Morphological and biochemical alterations of abalone testicular germ cells and spawned sperm and their fertilizing ability. *Marine Biotechnology* 10: 593–601.
- TOBÓN, A. R., E. ARENA-RÍOS, & M. A. LÉON-GALVÁN, M. A. 2010. El almacenamiento prolongado de espermatozoides en el epidídimo, adaptación que permite sincronizar el periodo de apareamientos en murciélagos. *ContactoS* 78: 58 – 64.
- WEIBEL, E.R. 1963. Princípios e métodos para o estudo morfométrico do pulmão e outros órgãos. *Laboratory Investigation* 12: 131 – 155.
- ZORTÉA, M. 2003. Reproductive patterns and feeding habits of three nectarivorous bats (Phyllostomidae: Glossophaginae) from the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Biology* 63 (1): 159 – 168.

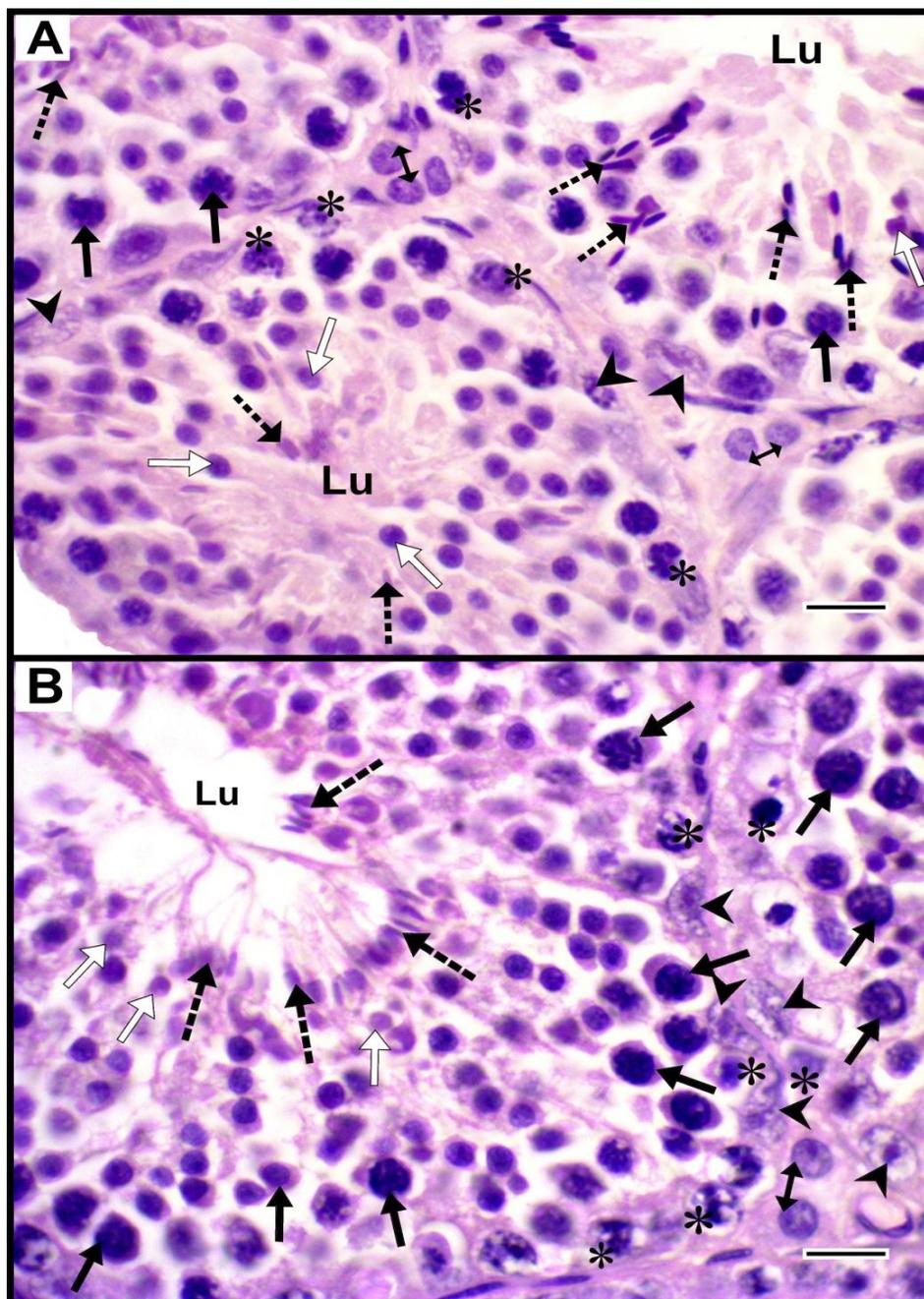


Fig. 1: Fotomicrografias dos testículos de *Artibeus planirostris* coletados em meses secos (A) e chuvosos (B) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Epitélio seminífero com células de Sertoli (cabeça de seta) e da linhagem espermatogênica – espermatogônias (asteriscos), espermatócitos (setas pretas), espermatídes arredondadas (setas brancas), espermatídes alongadas (setas pontilhadas) –, e o lúmen (Lu) no compartimento tubular. Notar também as células de Leydig (seta de duas cabeças) no compartimento intertubular. Coloração: Hematoxilina – Eosina. Barras de escala =10 µm.

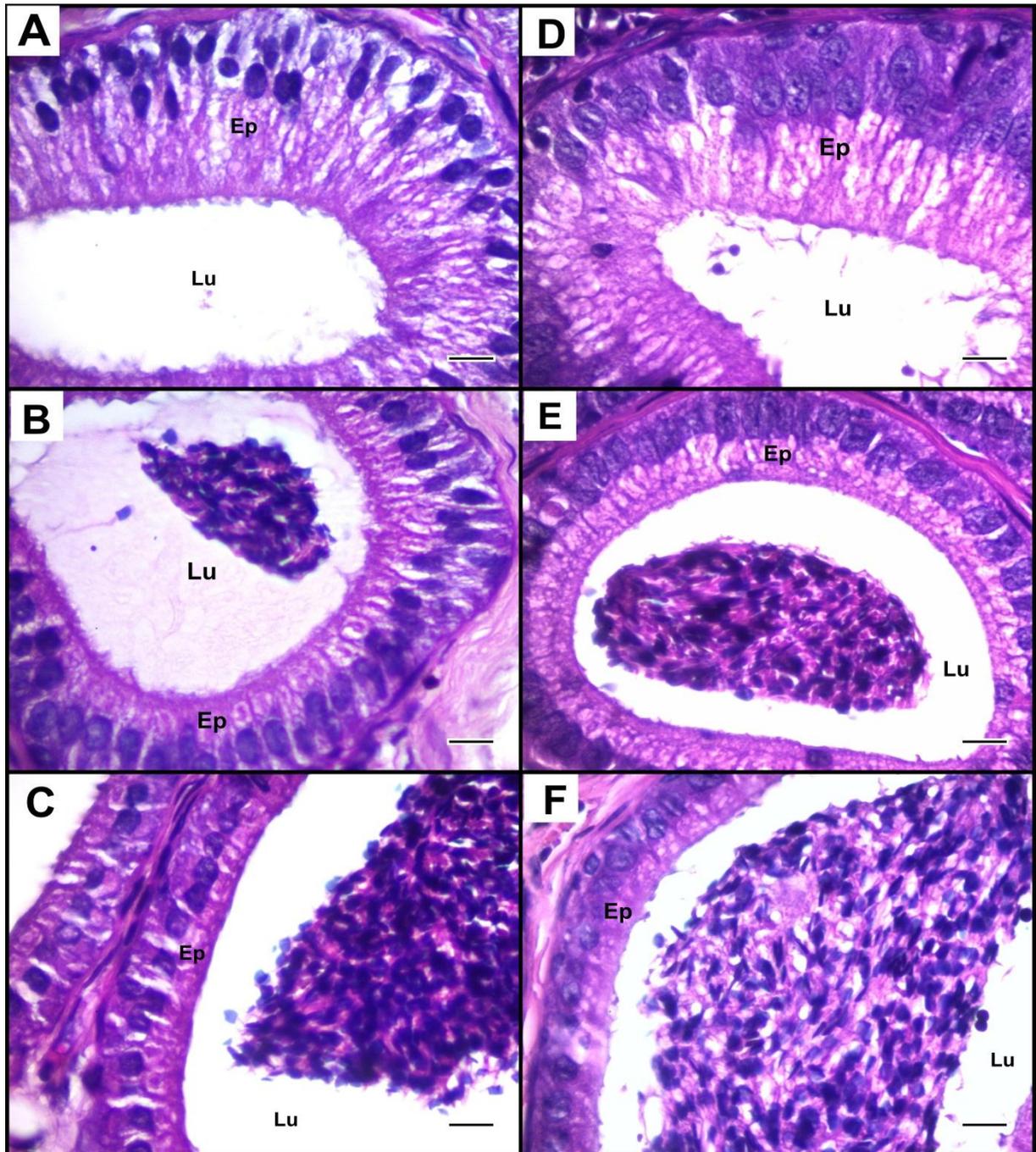


Fig. 2: Fotomicrografias das três regiões – cabeça (A, D), corpo (B, E) e cauda (C, F) – do epidídimo de *Artibeus planirostris* coletados em meses secos (A – C) e chuvosos (D – F) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Observar o epitélio (Ep) e Lúmen (Lu) em cada uma das regiões. Coloração: Hematoxilina – Eosina. Barras de escala = 10 µm.

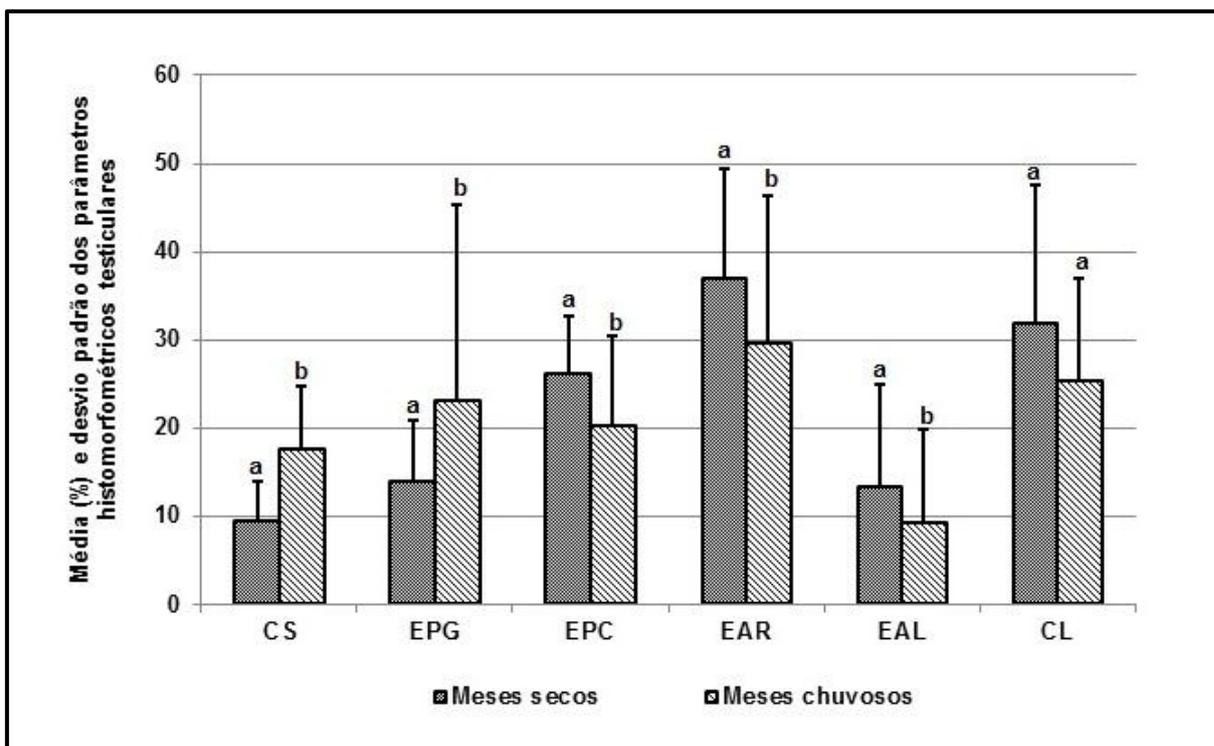


Fig. 3: Parâmetros histomorfométricos testiculares de *Artibeus planirostris* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. CS (células de Sertoli), EPG (espermatozóides), EPC (espermatozóides), EAR (espermatozóides arredondados), EAL (espermatozóides alongados) e CL (células de Leydig). Médias seguidas por letras diferentes (a, b) em cada parâmetro, diferem significativamente entre si pelo teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

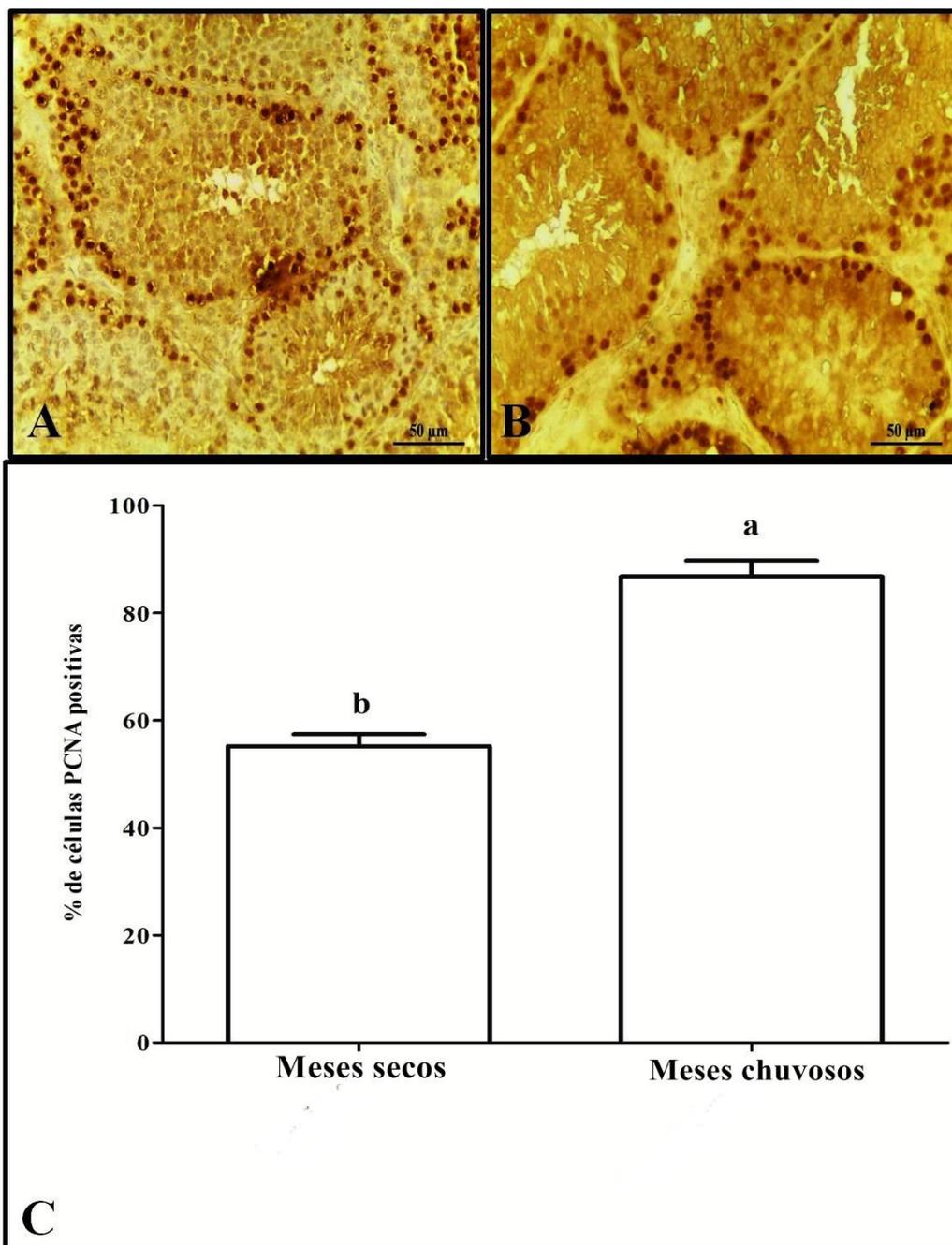


Fig. 4: Imuno-histoquímica do PCNA nos testículos de *Artibeus planirostris* coletados em meses chuvosos (A) e secos (B) no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Observar ainda a quantificação, em percentual, de células PCNA positivas em cada uma das estações (C). Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$).

Tabela 1

Parâmetros histomorfométricos (altura do epitélio – AE, diâmetro do túbulo – DT e diâmetro do lúmen – DL) avaliados nas regiões do epidídimo (cabeça – CA, corpo – CP e cauda – CAU) de *Artibeus planirostris* coletados em meses secos e chuvosos no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco.

Regiões do epidídimo	Parâmetros histomorfométricos	Meses secos	Meses chuvosos	Valor de p
		(n=08)	(n=08)	
		Média e desvio padrão	Média e desvio padrão	
CA	AE (µm)	26,14 ± 5,84 ^a	24,55 ± 5,98 ^b	0,021
	DT (µm)	123,99 ± 27,20 ^a	109,56 ± 27,63 ^b	<0,001
	DL (µm)	69,60 ± 19,72 ^a	57,65 ± 21,80 ^b	<0,001
CP	AE (µm)	22,62 ± 4,46 ^a	21,61 ± 5,55 ^b	0,026
	DT (µm)	120,54 ± 29,13 ^a	112,00 ± 30,37 ^b	0,018
	DL (µm)	73,27 ± 25,24 ^a	63,81 ± 27,84 ^b	0,001
CAU	AE (µm)	18,94 ± 4,97 ^a	18,35 ± 4,76 ^a	0,287
	DT (µm)	151,25 ± 45,12 ^a	156,44 ± 56,25 ^a	0,405
	DL (µm)	109,46 ± 46,68 ^a	113,77 ± 54,85 ^a	0,381

Letras sobrescritas diferentes (a, b) na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para o mesmo parâmetro histomorfométrico analisado pelo teste U de Mann-Whitney.

ANEXO

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 26 de abril de 2017.

Ofício nº 26 /17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Katharine Raquel Pereira dos Santos**
Centro Acadêmico de Vitória - CAV
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.039757/2016-81

Certificamos que a proposta intitulada "(Variações saxonais das glândulas pineal e tireóide na reprodução de morcegos neotropicais: parâmetros histológicos, morfométricos, imunohistoquímicos, hormonais e ultraestruturais)" registrada com o nº 23076.039757/2016-81 sob a responsabilidade de Prof.ª Katharine Raquel Pereira dos Santos - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 26/04/2017.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/05/2017 a 20/02/2020
Espécie/linhagem/raça	Chiroptera
Nº de animais	240
Peso/Idade	10 g adulto
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Zona urbana do município de Vitória de Santo Antão Pernambuco.

Atenciosamente

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584