



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



Caracterização histomorfométrica de testículos de quatro espécies de morcego frequentes na região de Cerrado do Distrito Federal nas estações seca e chuvosa.

Mestranda: Juliana Lis Mendes de Brito

Orientadora: Dr^a Carolina Madeira Lucci

2014

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em ordem cronológica, inicio meus agradecimentos aos meus pais, sem o apoio de vocês eu não teria chegado tão longe, principalmente minha mãe que nunca deixou de acreditar em mim e me apoiar mesmo que em algum momento não tenha concordado com alguma escolha minha. E aos meus irmãos, que mesmo sem entender a minha área, sempre mostraram interesse em saber como estavam as coisas com o mestrado.

Agradeço as minhas inspiradoras, aquelas que dentro da área acadêmica insistiram, conversaram comigo e me apoiaram para que eu entrasse no mestrado. Ita de Oliveira e Silva, obrigada por ficar horas conversando comigo, tirando minhas dúvidas e me aconselhando a seguir por este rumo. Eliana Pinheiro, obrigada por me dar a chance de trabalhar com você sem nem me conhecer, por ter me ensinado tantas coisas aqui na UnB, e por ter me guiado até o mestrado. E enfim obrigada Carolina Lucci, minha orientadora, por ter me acolhido, me escolhido, me orientado em momentos muito desorientados, por ter me ensinado, por ter me aceito de braços abertos em seu grupo de estudo. Obrigada por ter me dado a chance de realizarmos este trabalho juntas, e ainda por cima por ainda me querer trabalhando com você no doutorado.

Aos meus amigos, que são a família que eu escolhi, nem sei como agradecer a ajuda que foi tanta, durante todo o meu mestrado. Vocês mais do que ninguém acompanharam todo o processo durante esses dois anos. Quero agradecer em especial à Marcella Motta, que quando tudo parecia só dar errado, sentou do meu lado durante vários dias para me dar apoio, e me ajudar a organizar tudo que estava dando errado, amiga eu te disse várias vezes e repito, se não fosse você eu não teria terminado. Agradeço uma mulher muito especial para mim, Vanessa Nicolau, você começou a fazer parte da minha vida em um momento crítico, enfrentou junto comigo várias discussões, e me ajudou em vários momentos de desespero, agradeço a você por ser quem você é para mim desde que nos conhecemos. Ana Carolina Arcanjo, obrigada por mesmo distante ter sido capaz de me ajudar, e por sempre se preocupar comigo, por sempre ser meu anjo da guarda. Agradeço também a todos meus amigos que já vieram me trazer lanche, já me levaram para descansar um pouco, jogaram futebol comigo para me distrair e sempre se interessaram em saber como estavam as coisas, Rafael Gomes, Rodrigo Ramalho, Daniel Ferreira, Caroline Vieira, Marcelle Lemos, Gustavo Silva, Marina Cavalcanti, Caroline Nogueira, Rafaela Santos, Isabela Lopes, Jivago, Ana Paula, Rafael Maior, obrigada mesmo.

Aos amigos da UnB, quero agradecer a duas amigas que dividem a sala comigo, e que super me deram apoio nos momentos finais, Vanessa Peripolli por ter me ajudado diversas vezes com a estatística, acho até que você não aguenta mais o meu banco de dados gigante, e Flávia de Paula e Silva que também me ajudou com a estatística, e muito mais, sempre que pode sentou do meu lado para me dar uma luz quando eu estava perdida. Agradeço também Márcia Cristina e Ingrid, que me ajudaram muito durante as minhas análises com a microscopia eletrônica. Rafael Bonadio que sempre me ajudou na UnB quando necessário. Agradeço a todo nosso grupo de pesquisa, principalmente ao Jivago, que além de um grande amigo foi quem me ensinou todo o processamento, e toda a parte prática do nosso trabalho.

Agradeço também ao programa de Pós graduação de Biologia Animal, aos professores coordenadores e que fazem parte do programa, aos colegas do programa e aos colaboradores Capes e CNPQ, pelo financiamento que ajudou na conclusão do nosso trabalho. Por fim agradeço ao grupo de pesquisa da professora Carolina Lucci (CFS), grupo de pesquisa da professora Sônia Bao (CEL), grupo de pesquisa da professora Ludmilla Aguiar (ZOO), grupo de pesquisa da professora Connie (FAV) e ao laboratório da professora Carla Araujo (GEM).

RESUMO

A caracterização histomorfométrica dos testículos de morcegos de quatro diferentes espécies comumente encontradas na região de Cerrado, do Distrito Federal foi realizada durante as estações de seca e chuva, visando um maior conhecimento sobre os padrões reprodutivos sazonais destes animais. Machos das espécies *Artibeus lituratus*, *Platyrrhinus lineatus*, *Sturnira lilium* e *Carollia perspicillata* foram coletados, eutanasiados e pesados. Os testículos e epidídimos foram retirados, pesados e medidos. Foi realizado um lavado do epidídimo direito para a retirada dos espermatozoides, que foram então fixados e processados para a microscopia eletrônica de varredura. Os testículos e epidídimos esquerdos foram fixados e processados para histologia, cinco lâminas foram montadas e coradas para cada animal e analisadas em microscópio de luz. Foram analisados os parâmetros de área do túbulo, área da luz do túbulo, diâmetro do túbulo, diâmetro da luz do túbulo e altura do epitélio. Foi calculado também o índice Gonadossomático (IGS) e calculada a relação entre área tubular/área intersticial. Todos os dados obtidos foram expressos pela Média \pm Erro Padrão da Média, foi empregada a Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, com um critério de significância mínimo de 5%. Todos os dados foram comparados tanto entre as espécies como entre as estações do ano. O peso corporal foi significativamente maior durante a estação de seca para as quatro espécies. O IGS foi significativamente diferente entre as estações para todas as espécies, maior na estação chuvosa para *A. lituratus*, *P. lineatus* e *C. perspicillata*, e na estação seca somente para *S. lilium*. O peso e o comprimento testicular foram maiores na estação chuvosa para *A. lituratus* e *P. lineatus* e na estação seca para *S. lilium* e *C. perspicillata*, mostrando diferenças significativas entre as estações para todas as espécies. A espécie *A. lituratus* apresentou todos os parâmetros tubulares maiores de forma significativa em comparação com as outras espécies, nas duas estações, com exceção das áreas do túbulo e da luz do túbulo na seca. Somente *C. perspicillata* apresentou diferença significativa entre as estações para todos os parâmetros tubulares, sendo maiores durante a seca. Já para a relação área tubular/área intersticial somente o *C. perspicillata* apresentou relação significativamente maior na estação de seca. Foi possível observar espermatozoides nos túbulos seminíferos e epidídimos de todos os animais coletados, tanto na seca quanto na chuva. Os espermatozoides da espécie *A. lituratus* apresentou uma cabeça em forma de seta, enquanto os das outras três espécies possuem a cabeça com formatos arredondados. Os espermatozoides de *P. lineatus* foram os maiores dentre os estudados. Concluindo, os espermatozoides das quatro espécies são semelhantes em formato da cabeça com a exceção da espécie *A. lituratus*. Existem diferenças significativas entre as quatro espécies estudadas em relação ao peso corporal, peso e comprimento testicular e parâmetros tubulares. No entanto não foi possível observar sazonalidade reprodutiva nos machos das quatro espécies estudadas nas condições de Cerrado do Distrito Federal.

PALAVRAS-CHAVE: Sazonalidade reprodutiva; Quirópteros; Morfologia; Morfometria; Espermatozoides.

ABSTRACT

The histomorphometric characterization of testicles from four species of bats commonly found in the savanna area of Distrito Federal (Brazil) was performed during the dry and wet seasons. Male bats from *Artibeus lituratus*, *Platyrrhinus lineatus*, *Sturnira lilium* and *Carollia perspicillata* species were collected, killed and weighted. Testicles and epididymides were removed, weighted and measured. The right epididymides were washed to collect spermatozoa, which were fixed and processed for scanning electron microscopy. Left testicles and epididymides were fixed and processed for histology, five sections were mounted and stained with hematoxylin and eosin and analyzed under a light microscope. The analyzed parameters were: tubular area and diameter, luminal area and diameter, and height of seminiferous epithelium. The gonadosomatic index (GSI) and the relation tubular area/interstitial tissue area were calculated. Data are presented as Mean \pm SEM, and compared between seasons and species using ANOVA and Tukey's test. Body weight was significantly higher on the dry season for the four species. GSI was significantly different between seasons for all four species, being higher on the wet season for *A. lituratus*, *P. lineatus* and *C. perspicillata*, and on the dry season for *S. lilium*. Testicular weight and length were higher on the wet season for *A. lituratus*, *P. lineatus* and on the dry season for *S. lilium* and *C. perspicillata*. The tubular parameters studied were significantly greater in *A. lituratus* than in the other three species, on both seasons, except for tubular and luminal areas on the dry season. All analyzed parameters differed between season only for *C. perspicillata*, being greater on the dry season. *C. perspicillata* also showed a higher relation tubular area/interstitial tissue area on the dry season. Spermatozoa were visible on seminiferous tubules and epididymides of all collected animals, in both seasons. Spermatozoa from *A. lituratus* presented an arrow-shaped head, while the head was round-shaped on the other three species. Spermatozoa from *P. lineatus* were bigger than the other studied sperm cells. In conclusion, the spermatozoa from the four studied species are similar, except for the shape of the head for *A. lituratus*. There are significant differences among species concerning body weight, testicle weight and length and tubular parameters. However, no reproductive seasonality could be observed on males from the four studied species on the savanna area of Distrito Federal, Brazil.

KEYWORDS: Reproductive seasonality; Chiroptera; Morphology; Morphometry; Spermatozoa.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Os Morcegos e o cerrado	2
2.1.1 A reprodução dos morcegos	2
2.2 Testículo e Epidídimo	4
2.3 Morfologia testicular	5
2.3.1 Células de Sertoli	7
2.3.2 Células de Leydig	7
2.4 Espermatogênese	8
2.4.1 As espermatogônias	9
2.4.2 Mitose	10
2.4.3 Meiose	10
2.5 Espermiogênese	11
2.6 Espermatozoide	13
2.7 Ciclo do epitélio seminífero	15
2.8 A espermatogênese nos morcegos	16
3 JUSTIFICATIVA	18
4 OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo Geral	19
4.2 Objetivos Específicos	19
5. MATERIAL E MÉTODOS	20
5.1 Aprovação por Comitê de ética	20
5.2 Captura dos animais	20
5.2.1 Áreas e períodos do estudo	20

5.3 Coleta dos órgãos -----	21
6. RESULTADOS -----	24
7. DISCUSSÃO-----	28
8 CONCLUSÃO -----	37
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	38

1 INTRODUÇÃO

Morcegos constituem um dos maiores e mais diversificados grupos de mamíferos existentes. São os únicos mamíferos capazes de voar, e só não são encontrados nas regiões frias do círculo Ártico (HILL & SMITH, 1988).

Cerca de 70% de todas as espécies de morcegos se alimentam de insetos noturnos nocivos a plantações e outras espécies de pragas como os mosquitos (MILLER, 2006). As outras espécies se distribuem em polinívoros, hematófagos, carnívoros, nectarívoros e frugívoros. Os morcegos frugívoros possuem um importante papel na colonização de habitats destruídos com plantas pioneiras, tornando possível a reprodução das plantas que dominam os diversos tipos de solos existentes (FLEMING, 1988). Além disso, os frugívoros são espécies chave para a manutenção da biodiversidade das plantas e para regenerar grandes áreas de florestas desmatadas pelas atividades humanas (MILLER, 2006).

Os morcegos possuem uma longevidade que pode chegar a até 30 anos, o que é considerado muito em comparação com outros animais do mesmo porte, sua taxa de reprodução é alta, sua ninhada é pequena, e o início da sua maturidade sexual é tardia (GAISLER, 1989).

Os animais utilizados no presente estudo pertencem à família Phyllostomidae, que apresenta como característica marcante a presença de uma folha nasal membranosa e em forma de lança ou folha, na extremidade do focinho (NOWAK, 1994). As quatro diferentes espécies analisadas pertencem a subfamílias diferentes, e por esse motivo possuem características diferenciadas.

Em regiões neotropicais a família Phyllostomidae é a predominante (FENTON *et al.*, 1992), é uma das três maiores entre os quirópteros, e possuem hábitos alimentares muito diversos (HILL & SMITH, 1988), e é a família mais descrita em estudos da quiropterofauna já realizados (BARROS *et al.*, 2006; FENTON, 1992; REIS *et al.*, 1993).

Visando entender melhor os padrões reprodutivos, e as estratégias de reprodução utilizadas, o presente projeto pretende estudar machos de quatro espécies de morcegos fitófagos: *Artibeus lituratus*, *Platyrrhinus lineatus*, *Sturnira lilium* e *Carollia perspicillata*. Todas essas espécies se alimentam de frutos ou pólen e néctar e ocorrem amplamente no DF sendo encontradas comumente em ambientes degradados, nativos, rurais e urbanos (PACHECO *et al.*, 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Os Morcegos e o cerrado

O Distrito Federal está localizado no Domínio do Cerrado, que é a segunda maior área brasileira, superada apenas pela Amazônia. O Cerrado é considerado a mais diversificada savana tropical do mundo. O Cerrado ocupa cerca de 21% do território nacional e é apontado como a última fronteira agrícola do planeta (KLINK & MACHADO, 2005). Possui uma elevada diversidade biológica, sendo 44% da sua flora endêmica (MYERS *et al.*, 2000).

O clima do Cerrado é estacional e bem definido, com um período chuvoso de outubro a março, seguido por um período seco de abril a setembro. As temperaturas são geralmente amenas ao longo do ano, variando sempre entre 22 °C e 27 °C (KLINK & MACHADO, 2005).

As condições ambientais e os fatores endógenos estão fortemente associados com a reprodução dos morcegos (NEUWEILER, 2000), sendo fatores considerados cruciais para o sucesso das estratégias reprodutivas das espécies encontradas em latitudes temperadas, pois os morcegos têm seu ciclo reprodutivo associado proximamente com a temperatura ambiental. Fatores como a sazonalidade podem interferir no aspecto reprodutivo dos animais. Quando a disponibilidade de comida é abundante durante o ano, eles podem se reproduzir a qualquer momento, porém quando a quantidade de comida diminui, dependendo da estação do ano, o sucesso da espécie se reflete na capacidade de gerar filhotes em momentos propícios (CLARKE, 1981).

2.1.1 A reprodução dos morcegos

Em termos reprodutivos, os morcegos apresentam uma grande variação em relação ao número e duração dos ciclos estrais que podem ocorrer em um ano. Algumas espécies de morcegos são monoéstricas, com apenas um ciclo reprodutivo ao ano, neste caso, a duração do ciclo e a necessidade de ter os filhotes no início da primavera e verão são importantes, pois coincide com o momento em que as condições climáticas e as reservas de comida atingem os seus melhores níveis para o crescimento e desenvolvimento dos filhotes. Outras espécies de morcegos são poliéstricas, apresentando dois ou mais ciclos reprodutivos durante o ano, isso ocorre normalmente com espécies que vivem nos trópicos, devido a menor variação climática que não altera consideravelmente a disponibilidade de alimento (HILL & SMITH, 1988).

Fleming e colaboradores (1972) verificaram a existência de, pelo menos, quatro padrões reprodutivos diferentes em algumas espécies de morcegos existentes no Panamá e Costa Rica: monoestria sazonal, onde a cópula ocorre no do final de abril ou maio, época de seca, e os filhotes nascem em novembro ou dezembro, época de chuva; poliestria sazonal, que é um padrão comum em várias espécies de morcegos frugívoros, onde é possível observar dois picos de gravidez, lactação e nascimento; e poliestria contínua, onde há ciclos reprodutivos ativos durante todo o ano. Somente na espécie *Myotis nigricans* foi possível verificar uma gestação longa com um curto período de inatividade.

Os morcegos encontrados em climas tropicais, como o do Brasil, possuem três padrões reprodutivos: monoestria sazonal, poliestria sazonal e poliestria contínua (HAPPOLD & HAPPOLD, 1990). Como a sazonalidade, tanto do clima como da disponibilidade de alimento, e também as diferentes latitudes (tropical x temperada) parecem ser os fatores principais para determinar o momento da reprodução, as variações na reprodução destes animais são reflexo dos diferentes padrões de chuva e da severidade das épocas de seca. Logo, em diferentes regiões é possível encontrar padrões reprodutivos totalmente opostos para as mesmas espécies (RACEY & ENTWISTLE, 2000).

Todos os animais possuem ciclos reprodutivos favoráveis para o nascimento dos filhotes nas melhores épocas do ano (FLEMING *et al.*, 1972). No momento da reprodução, o mais importante, para os mamíferos em geral, é a disponibilidade alimento, que permite alcançar a demanda energética que a lactação e o crescimento dos filhotes necessitam (RACEY, 1982).

Por serem animais com gestação longa (entre 2 a 11 meses e meio), os morcegos não conseguem reagir rapidamente às flutuações ambientais de curto prazo, pois usam os sinais das mudanças sazonais previsíveis, o que permite aperfeiçoar o tempo da reprodução (HEIDEMAN, 2000). Assim, morcegos apresentam várias estratégias reprodutivas, o que torna a sua reprodução mais diversificada do que na maioria dos outros mamíferos (RACEY & ENTWISTLE, 2000).

Existem três estratégias reprodutivas mais comuns. A primeira é o oportunismo, quando os machos ficam ativos durante o ano todo, e as fêmeas só ficam férteis dependendo das ofertas energéticas do ambiente. A segunda relaciona o fotoperíodo com a reprodução sazonal. E a terceira envolve a existência de compostos vegetais secundários, indicativos do início do período com maior disponibilidade de alimento.

Do ponto de vista evolutivo, a partir do conhecimento do tamanho do mamífero, gênero, vida útil, estratégia alimentar e do habitat onde ele vive, é possível prever o controle reprodutivo relacionado com os princípios energéticos (BRONSON, 1985).

As estratégias reprodutivas dos morcegos são muito diferenciadas, pois existem variáveis que podem alterar suas características, como seu tipo de habitat, localização deste, condições climáticas e disponibilidade de abrigo e de alimentos. Desta forma espécies diferentes, no geral, apresentam estratégias reprodutivas diferentes (DWEYR, 1970).

Em locais onde o alimento é abundante durante o ano todo, os animais podem se reproduzir a qualquer momento, porém em locais onde a disponibilidade de alimento varia muito ao longo do ano, a reprodução só pode ocorrer de forma que os nascimentos ocorram durante o período com a maior disponibilidade de comida. Assim, o sucesso da espécie depende da habilidade da mesma ter os filhotes no momento mais propício (FLEMING *et al.*, 1972; CLARKE, 1981).

As estratégias reprodutivas que envolvem as características pré determinadas, climáticas ou não, são importantes para a preparação metabólica, principalmente quando a disponibilidade e o clima maximizam a probabilidade do sucesso reprodutivo da espécie (BRONSON, 1985).

A capacidade reprodutiva de todos os mamíferos machos está intimamente relacionada ao funcionamento das gônadas, e as características específicas de cada espécie. Fleming e colaboradores (1972) concluíram que o ciclo espermatogênico dos Filostomideos aparentemente está relacionado ao ciclo reprodutivo das fêmeas. Em alguns casos o tamanho do testículo de alguns animais parece estar relacionado à receptividade sexual das fêmeas. Em contrapartida, o momento dos ciclos sazonais da reprodução de morcegos machos pode não ser simplesmente uma consequência do momento do ciclo das fêmeas, mas corresponder diretamente à sazonalidade climática e a disponibilidade de comida (McWILLIAM, 1987).

Analisar a proporção entre os elementos que constituem o tecido testicular permite caracterizar a variação reprodutiva sazonal, assim como verificar suas diferentes proporções celulares entre as espécies.

2.2 Testículo e Epidídimo

O estudo do ciclo reprodutivo de machos de qualquer mamífero depende da análise das estruturas primárias que são os testículos, e secundárias que são as glândulas acessórias. Estas

estruturas estão envolvidas em todo o processo reprodutivo, e em morcegos estas estruturas seguem o padrão da maioria dos mamíferos (KRUTZSCH, 2000).

Em mamíferos os testículos são encontrados envoltos por um fino tecido chamado de bolsa escrotal, e mantidos a uma temperatura mais baixa que a corporal, o que é extremamente necessário para a produção de espermatozoides viáveis. Internamente, os testículos possuem lobos onde estão diversos túbulos seminíferos, que é onde os espermatozoides são formados (SCANLON & SANDERS, 2007).

Entre famílias e espécies de morcegos algumas diferenças são observadas na localização dos testículos, de acordo com a sazonalidade e durante o decorrer do dia. Podem estar localizados de forma permanente no abdômen, ou estar sempre na bolsa escrotal, que é o local mais comum. No entanto, podem também migrar entre o abdômen e a bolsa escrotal pelo canal inguinal, e se posicionar de forma externa, próximo ao pênis, estando cobertos por um fino tecido vascularizado, e não pela bolsa escrotal (KRUTZSCH, 2000).

Histologicamente, os testículos são divididos em dois compartimentos: o compartimento intersticial, ou intertubular, e o compartimento tubular, ou dos túbulos seminíferos. No compartimento intersticial estão as células de Leydig, células do tecido conjuntivo como fibroblastos, macrófagos e mastócitos, nervos, e alguns vasos sanguíneos e linfáticos. A proporção destes elementos pode ser obtida por meio de medidas morfométricas, e permitem a análise do seu estágio de desenvolvimento (RUSSELL *et al.*, 1990).

O epidídimo é um túbulo enrolado na superfície posterior de cada testículo. É no epidídimo que a maturação do espermatozoide é completada, quando seu flagelo se torna funcional (SCANLON & SANDERS, 2007). O epidídimo tem três regiões definidas: cabeça, corpo e cauda. Os espermatozoides podem ser armazenados por meses na cauda do epidídimo, principalmente em animais que vivem em locais temperados e espécies que hibernam (KRUTZSCH, 2000).

Em mamíferos os testículos liberam os espermatozoides pelos canais que vão até o ducto deferente do epidídimo para as glândulas ampulares e, em seguida, para o lúmen da uretra prostática (SCANLON & SANDERS, 2007).

2.3 Morfologia testicular

Cada testículo de mamíferos é envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo chamado de túnica albugínea. Internamente este é dividido em lóbulos onde ficam os túbulos

seminíferos, que terminam na rede testis, uma complexa rede de canais que se direcionam para o epidídimo (SHIER & BUTLER, 2007).

Em humanos existem em torno de 250 a 300 lóbulos onde estão os túbulos seminíferos e, entre eles, estão presentes as células de Leydig, que são responsáveis pela síntese e secreção da testosterona e outros andrógenos (STANFIELD, 2013). Os túbulos seminíferos presentes no parênquima ocupam cerca de 80% do volume testicular, e o tecido conjuntivo ocupa os 20% restantes, e é chamado de interstício (BERNE & LEVY, 2000). No parênquima estão as células responsáveis pela função típica do órgão, e o estroma é o tecido de sustentação do órgão, normalmente composto principalmente de tecido conjuntivo. Todas estas estruturas podem ser observadas na figura 1.

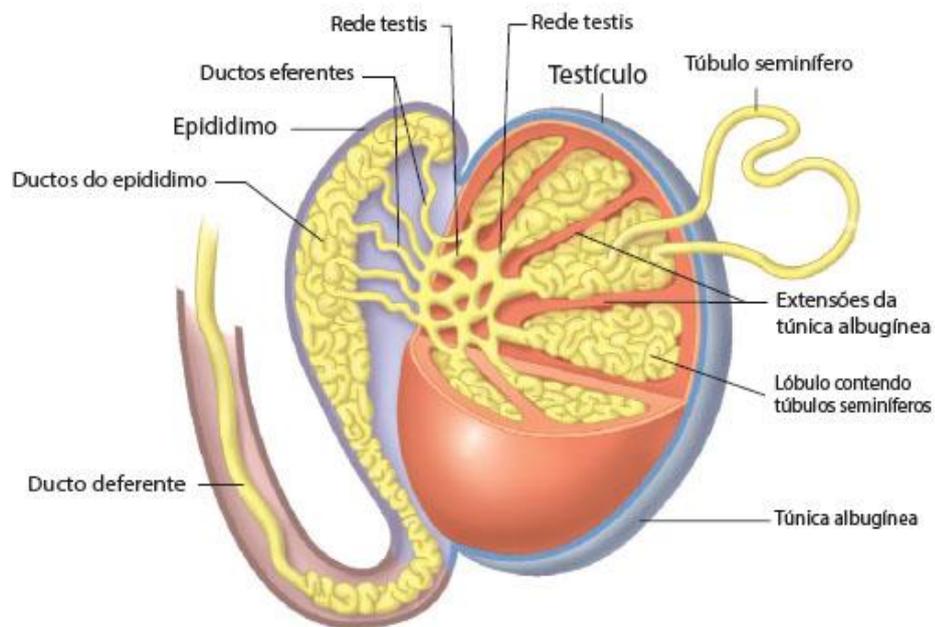


Figura 1: Estruturas internas e externas do testículo. Adaptada de Seeley *et al.*, 2014.

Nos morcegos os túbulos seminíferos dos testículos são compostos basicamente por células de Sertoli, associadas à lâmina basal e apresentando um processo citoplasmático extenso, que envolve todas as células germinativas, e que vai em direção ao lúmen (BEGUELINI *et al.*, 2011). Estes túbulos ocupam a maior parte do testículo na maioria dos mamíferos (FRANÇA & GODINHO, 2003).

Mamíferos em geral apresentam nos túbulos seminíferos o lúmen tubular, o epitélio seminífero e a túnica própria, que reveste o túbulo e que é composta de células mióides e membrana basal. As células de Sertoli e as células germinativas originadas do epiblasto também estão presentes. No lúmen tubular estão o fluido secretado por estas células de Sertoli e os espermatozoides recém espermiados (KARL & CAPEL, 1998).

2.3.1 Células de Sertoli

Em mamíferos as células de Sertoli possuem um citoplasma que se estende como uma camada bem fina em torno das células germinativas, nutrindo-as e mantendo suas associações celulares ao longo da espermatogênese (HESS & FRANÇA, 2008). Entre a membrana basal e o lúmen do túbulo, o citoplasma das células de Sertoli se estende cercado as espermatogônias e as demais células da sua linhagem espermatogênica (BERNE & LEVY, 2000).

Estas células de Sertoli dão suporte estrutural para as células germinativas que estão presentes no epitélio seminífero. As células de Sertoli também dividem o epitélio em ambiente basal, onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários, e ambiente adluminal, onde estão os espermatócitos primários, espermatócitos secundários e espermátides (RUSSELL *et al.*, 1990; SETCHELL, 1991; POCCIA, 1994; SHARPE, 1994).

As junções fechadas das células de Sertoli constituem a barreira hemato-testicular. Esta barreira regula a passagem de moléculas entre os compartimentos adluminal e basal, além de possuir função imunológica, isolando as células germinativas em desenvolvimento dos anticorpos circulantes no sangue. Assim, o sistema imune não ataca as células germinativas haploides. Esta barreira fica aberta em diferentes pontos ao longo do túbulo em momentos específicos durante a espermatogênese, permitindo que os espermatócitos em desenvolvimento passem do compartimento basal para o adluminal (MRUK & CHENG, 2004; SETCHELL, 2008).

2.3.2 Células de Leydig

As células de Leydig, em mamíferos em geral, são as produtoras dos hormônios esteroides, em especial a testosterona, e estão situadas no tecido intersticial dos testículos (VAN STRAATEN & WENING, 1978). Possuem uma morfologia irregular e poligonal, são encontradas isoladas ou agrupadas e, são separadas umas das outras por um espaço extracelular fino. O núcleo é normalmente grande e indefinido, variando de circular para oval e possui uma grande porção de cromatina granular (BEGUELINI *et al.*, 2011).

A ultraestrutura mais proeminente observada nas células de Leydig é um retículo endoplasmático liso abundante, e um grande número de mitocôndrias, gotas lipídicas também podem ser observadas em algumas espécies. A síntese da testosterona, a partir do colesterol

(BARDIN, 1996), é catalisada por enzimas que estão presentes, de forma predominante, nas membranas do retículo endoplasmático liso e no citoplasma adjacente (MORI & CHRISTENSEN, 1980).

As células de Leydig são o tipo celular mais frequente no compartimento intersticial. A quantidade de células de Leydig presentes pode mudar ao longo dos anos, bem como entre os meses do ano nas espécies que sofrem alterações reprodutivas sazonais. Sabe-se que fora do período reprodutivo os níveis de andrógenos encontram-se reduzidos a valores basais, aumentando gradativamente no período de recrudescência testicular, até atingir níveis altos durante o período reprodutivo (RACEY & TAM, 1974).

2.4 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo longo e ordenado que ocorre nos túbulos seminíferos (Figura 2) e culmina com a produção de espermatozoides (JOHNSON *et al.*, 2000). As células germinativas se multiplicam por meio de repetidas divisões mitóticas e, em seguida, pela meiose, que envolve a duplicação dos cromossomos, recombinação genética, e então, a redução dos cromossomos por meio de duas divisões celulares. Estas divisões produzem espermatídes esféricas haploides que se diferenciam em espermatozoides altamente compactados, sendo liberados na luz do túbulo seminífero (HESS & FRANÇA, 2008).

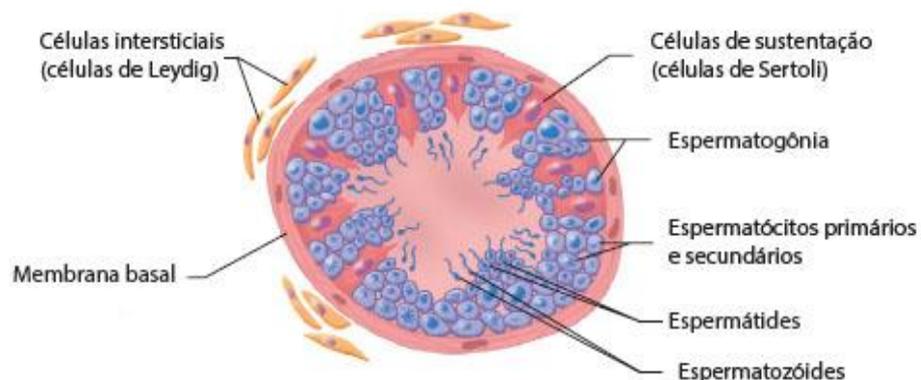


Figura 2: Desenho esquemático do túbulo seminífero. Adaptado de Seeley *et al.*, 2014.

Na maioria dos mamíferos, a espermatogênese tem uma duração de 40 a 60 dias e pode ser dividida em três fases, segundo sua morfologia e funcionamento, sendo que cada uma delas dura aproximadamente 1/3 da espermatogênese: (1) fase proliferativa ou espermatogonial, onde ocorrem as sucessivas divisões mitóticas; (2) fase meiótica ou

espermatocitogênica, na qual temos a duplicação do material genético, que ainda sofrerá duas divisões celulares e se recombinará durante a meiose; e (3) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde as espermatídes se tornam especializadas e, após modificações, tornam-se espermatozoides (RUSSELL *et al.*, 1990).

Durante o período reprodutivo, a espermatogênese ocorre de forma natural e se completa com as divisões mitóticas das espermatogônias, que irão gerar os espermatócitos e, conseqüentemente, produzirão as espermatídes após mitose, estas irão se diferenciar em espermatozoides na espermiogênese.

2.4.1 As espermatogônias

As espermatogônias são células que se dividem através da mitose e constituem o conjunto de células que vão dar procedência à meiose e espermatogênese (NEILL, 2006).

As espermatogônias podem ser classificadas como indiferenciadas e diferenciadas (De ROOIJ, 1998). Dentro da classificação de indiferenciadas encontram-se as espermatogônias isoladas (Ai), pareadas (Apr) e alinhadas (Aal), e nas diferenciadas temos as espermatogônias do tipo A, intermediárias (In) e espermatogônias do tipo B (RUSSELL *et al.*, 1990).

A heterocromatina presente no núcleo destas espermatogônias está relacionada à ativação celular. Assim, quanto mais ativa é a célula, mais heterocromatina é encontrada em seu núcleo (DE ROOIJ & RUSSELL, 2000). As espermatogônias do tipo A são consideradas as mais primitivas, pois a heterocromatina está ausente do núcleo, uma característica de células em repouso. A grande quantidade de heterocromatina existente nas espermatogônias do tipo B indica uma célula mais ativa (PHILLIPS *et al.*, 2010).

Algumas definições são feitas de acordo com o seu tamanho, formato e morfologia nuclear. Existe uma condensação progressiva da cromatina nas espermatogônias, que permite uma classificação numérica de A1 até A3, onde o tipo A3 é a mais escura entre as espermatogônias do tipo A (SAIDAPUR & PATIL, 1992).

Beguelini e colaboradores (2011, 2013c) classificaram as espermatogônias de morcegos pela coloração também, considerando as do tipo Ad as mais escuras e as do tipo Ap as mais claras. Espermatogônias do tipo Ad apresentam um formato elíptico, e ficam aderidas à lâmina basal, formando projeções e depressões, e estando cercadas por células de Sertoli. As espermatogônias do tipo Ap apresentam um formato mais alongado, se aderem à lamina basal de forma menos pronunciada, da mesma forma têm projeções e depressões menores do que as do tipo Ad.

Espermatogônias do tipo B se aderem muito menos à lamina basal, sendo a área de contato e o grau de adesão o menor entre as espermatogônias, e a conexão existente é quase reta, com pequenas projeções e depressões. O processo de ascensão para o compartimento adluminal é gradual, com o deslocamento do citoplasma para as regiões superiores do compartimento basal e a perda completa do contato com a lâmina basal (BEGUELINI *et al.*, 2011, 2012, 2013c).

Baseado nas características ultraestruturais, apenas três tipos principais de espermatogônias puderam ser precisamente identificadas para a espécie de morcego *P. lineatus*: o tipo escuro A – Ad, o tipo pálido A – Ap e o tipo B (BEGUELINI *et al.*, 2011). Da mesma forma em *M. molossus*, os mesmos três tipos principais de espermatogônias foram identificadas, Ad, Ap, e o tipo B (BEGUELINI *et al.*, 2013c).

2.4.2 Mitose

A mitose é definida por uma série de eventos físicos que causa a divisão das células em novas células filhas. O primeiro estágio da mitose é a prófase, onde os cromossomos duplicados começam a se condensar. Os centríolos migram para polos opostos da célula e inicia-se a formação do fuso. Na prometáfase ocorre a dissolução do envelope nuclear e os microtúbulos se organizam e se ligam nas cromátides pelos centrômeros. Durante a metáfase as cromátides são levadas pelos microtúbulos ao centro da célula, ficando alinhadas e formando a placa equatorial do fuso mitótico. Já, na anáfase as duas cromátides de cada cromossomo são separadas pelos centrômeros. Todos os 46 pares de cromátides são separados, formado dois conjuntos de 46 cromossomos filhos, cada conjunto é então separado para lados opostos da célula. Na telófase o aparato mitótico se desfaz, e uma nova membrana nuclear cresce em volta de cada conjunto de cromossomos (GUYTON & HALL, 2006). Por fim, a célula se divide em duas no processo de citocinese.

2.4.3 Meiose

Todos os gametas produzidos são derivados de um pequeno grupo de células germinativas diploides. Em algum momento estas células passam por um processo de divisão por mitose, para produzir células filhas com os exatos 46 cromossomos originais. Estas células filhas então sofrem meiose, que se resume a uma sequência de duas divisões celulares

com uma única replicação de DNA, gerando células filhas com a metade do número de cromossomos, como os espermatozoides (STANFIELD, 2013).

Durante a meiose, os cromossomos homólogos se pareiam longitudinalmente. Cada cromossomo é formado por dois filamentos em espiral chamados cromátides irmãs. A meiose funciona como uma atividade celular importante como o reparo do DNA, a troca de material genético e a sinapse dos cromossomos homólogos (COHEN *et al.*, 2006). As espermatogônias do tipo B se afastam da lâmina basal durante a meiose, indo em direção ao compartimento adluminal, seu núcleo aumenta de tamanho devido à duplicação do DNA, e a cromatina começa a se condensar, se transformando em espermatócitos e iniciando a divisão meiótica.

Os espermatócitos primários se originam das espermatogônias do tipo B que acabam perdendo o contato com a lâmina basal do túbulo seminífero. Eles são chamados de espermatócitos pré-leptótenos até que ocorra a síntese de DNA, onde cada cromossomo, quando condensado, está composto de um par de cromátides, com o seu DNA representando o dobro do conteúdo diploide, então eles se transformam em espermatócito leptóteno e migra da região basal para a adluminal do epitélio seminífero (NEILL, 2006; HERMO *et al.*, 2010).

A primeira divisão meiótica (meiose I) divide a célula em duas, assim cada célula filha recebe um cromossomo de cada par homólogo, recebendo uma combinação diferente de cromossomos paternos e maternos. Como os cromossomos são constituídos por duas cromátides irmãs, cada célula recebe a metade do número total de cromossomos, mas ainda sim recebem duas cópias de cada cromossomo, duas cópias de um cromossomo X ou Y. Então na segunda divisão meiótica (meiose II) cada célula gerada anteriormente se divide em duas, com um total de quatro células. Então as cromátides irmãs são separadas e cada célula filha haploide nova recebe uma cromátide de cada cromossomo, em consequência cada uma das quatro células criadas recebe uma cópia simples de 23 cromossomos, e então são fechadas dentro de uma nova membrana nuclear (STANFIELD, 2013).

2.5 Espermiogênese

Esta é a fase final da espermatogênese. Nela ocorre a transformação das espermátides esféricas haploides ($1n$) em um espermatozoide alongado, altamente condensado e maduro, que será lançado na luz do túbulo seminífero (HESS & FRANCA, 2008). Não existe divisão celular envolvida nesse processo, o que ocorre é uma transformação de células convencionais em estruturas móveis altamente organizadas (NEILL, 2006).

Durante a espermiogênese as espermatídes se diferenciam de células com o núcleo esférico para células germinativas maduras com o formato do espermatozoide específico para cada espécie. O flagelo se desenvolve, e a cabeça do espermatozoide passa a conter o núcleo condensado, que é a fonte do genoma paterno, e do acrossoma, que possui as enzimas necessárias para penetrar nas camadas do ovócito (JOHNSON *et al.*, 2000).

Os passos da espermiogênese podem ser definidos em: formação do acrossoma, condensação nuclear, desenvolvimento do flagelo e reorganização do citoplasma e organelas celulares, que resultam em uma célula totalmente diferenciada, tanto em estrutura quanto em função (Figura 3) (NEILL, 2006). Quatro fases acontecem enquanto as espermatídes ainda estão ligadas à membrana plasmática das células de Sertoli, descritas a seguir (ROSS & PAWLINA, 2011).

Na fase do complexo de Golgi, uma vesícula acrossomal aumenta o seu conteúdo formando um único grânulo acrossomal. Os centríolos migram para o polo posterior da espermatíde e iniciam a montagem dos microtúbulos que constituem o axonema da cauda. Esta vesícula acrossomal passa a cobrir a metade da superfície nuclear na fase da formação do capuz, dando o nome a essa estrutura como capuz acrossomal, e então o conteúdo nuclear começa a se condensar. Na fase do acrossoma a espermatíde se reorienta para que a cabeça fique profundamente envolvida pelas células de Sertoli em direção à lâmina basal, o flagelo em desenvolvimento se estende para o lúmen do túbulo, o núcleo condensado se achata e se alonga e, juntamente com o acrossoma, se movimentam para uma posição adjacente à membrana plasmática anterior, o citoplasma é deslocado para a região posterior. Os microtúbulos formam uma bainha cilíndrica chamada de manchete, os centríolos voltam para a superfície posterior do núcleo e são modificados para formar a região do pescoço. Fibras grossas se desenvolvem a partir dos centríolos ligados ao núcleo e se estendem para a cauda e ligam o núcleo com o flagelo (peça de ligação). A manchete desaparece assim que a membrana plasmática começa a cobrir o flagelo e as mitocôndrias migram do citoplasma para formar a bainha fibrosa que alcança quase até o final do flagelo. A última fase é a de maturação, onde a redução do excesso do citoplasma ocorre para a formação do espermatozoide maduro, as células de Sertoli fagocitam este corpo residual, as pontes intercelulares permanecem com este corpo residual, e as espermatídes não ficam mais ligadas umas às outras e se soltam das células de Sertoli (ROSS & PAWLINA, 2011).

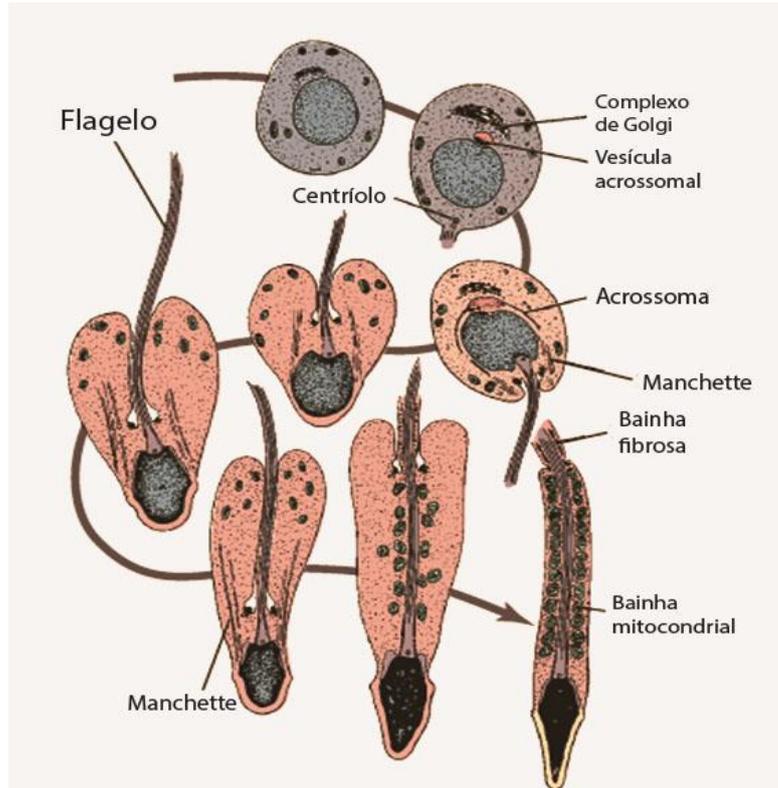


Figura 3: Fases da formação do espermatozoide, espermição. Adaptada de Ross & Pawlina, 2011.

A formação do acrossoma depende da habilidade da organela em produzir vesículas e grânulos que contém os componentes enzimáticos do sistema acrossomal que irá envolver o núcleo do espermatozoide. A diferenciação que ocorre nos três primeiros passos da formação espermática envolve um aparelho de Golgi proeminente. (HESS & FRANCA, 2008). O número de espirais que formam a manchete pode mudar entre as espécies de mamíferos (NEILL, 2006).

2.6 Espermatozoide

Mamíferos possuem espermatozoides (Figura 4) compostos de uma cabeça, peça intermediária e cauda. A cabeça contém o núcleo celular condensado, com uma fina membrana celular, e um capuz chamado de acrossoma, que possui várias enzimas que digerem proteínas e, que ajudam a entrada do espermatozoide no óvulo (GUYTON & HALL, 2006). Na peça intermediária estão as mitocôndrias, que produzem o ATP necessário para a movimentação da célula. A cauda também chamada de flagelo possui três componentes principais, um esqueleto central constituído de nove pares de microtúbulos e dois microtúbulos centrais, conhecidos como axonema, uma membrana fina que cobre o axonema,

e uma coleção de mitocôndrias que cobrem o axonema em sua porção proximal, chamado de corpo da cauda. O flagelo permite a motilidade, ou a capacidade do espermatozoide de se movimentar, usando energia proveniente do ATP (GUYTON & HALL, 2006; SCANLON & SANDERS, 2007).

Os espermatozoides de morcegos geralmente possuem a cabeça em formato de seta ocupada quase que totalmente pelo núcleo, que possui uma matriz extremamente densa e homogênea. A membrana interna acrossomal está relacionada à membrana nuclear, formando um pálido e pequeno espaço subacrossomal que continua entre as duas membranas, cobrindo a parte final do núcleo. O acrossoma está logo e, devido ao seu tamanho pequeno, cobre apenas um terço do tamanho do núcleo, apresentando também uma matriz extremamente densa e homogênea, com várias projeções acrossomais onduladas. A região final do acrossoma é ligada ao envelope nuclear na região do seguimento equatorial (BEGUELINI *et al.*, 2012, 2013c).

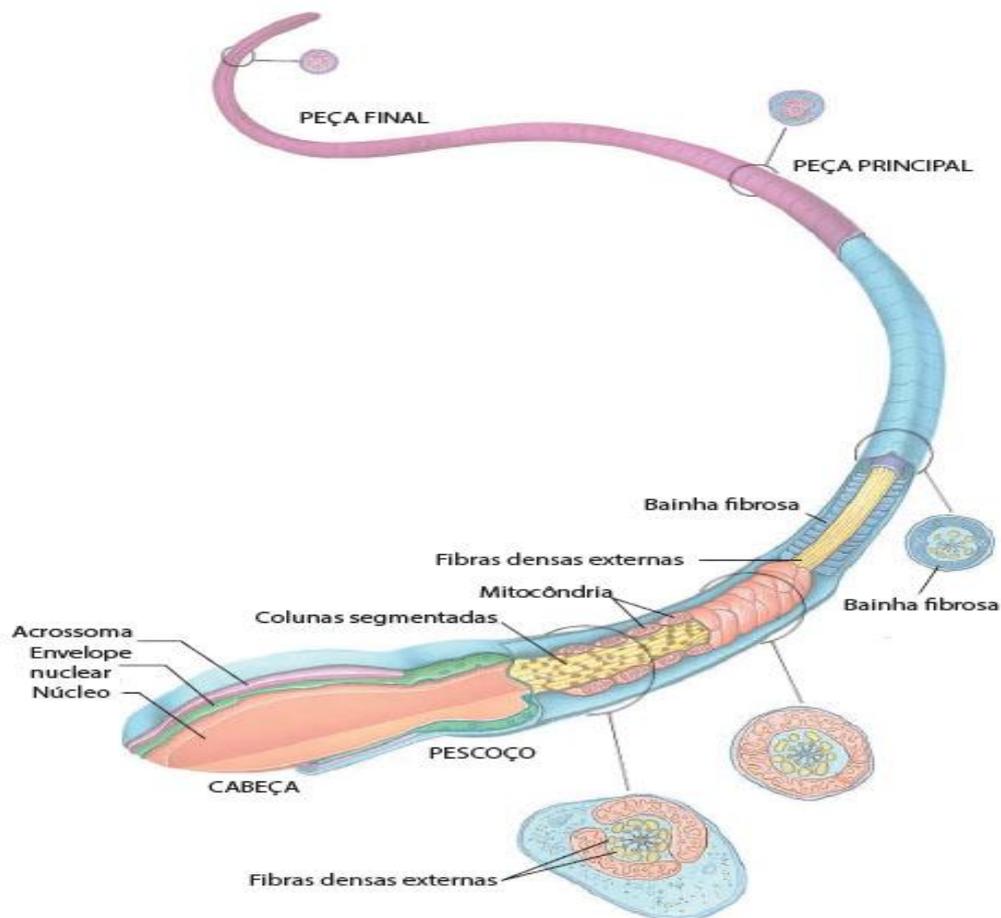


Figura 4: Estruturas do espermatozoide humano. Adaptado de Gartner & Hiatt, 2014.

Em morcegos na região do pescoço existe uma concavidade onde a lâmina basal se liga ao núcleo, correspondendo ao local onde os centríolos proximais e distais se conectam ou se associam com o núcleo, ligando a cauda à cabeça do espermatozoide. Na base do núcleo o centríolo proximal desenvolve uma concavidade onde a fossa de implantação é formada. Juntamente com esse complexo a lâmina basal é observada logo abaixo do envelope nuclear, e mais abaixo o capitulum. A porção central do capitulum está diretamente associada com o filamento axial (centríolo distal), e sua porção marginal se associa com a parte anterior das nove fibras densas exteriores, formando as colunas segmentadas. Lateralmente a esse processo observa-se uma quantidade pequena de membrana nuclear, e abaixo o início da peça intermediária (BEGUELINI *et al.*, 2012, 2013c).

A peça intermediária em morcegos é composta pelo filamento axial, envolta pelas nove fibras densas exteriores, que são cercadas pela bainha mitocondrial. Esta bainha é um pouco menor e contém 35 giros mitocondriais, que são organizados em forma de hélice em volta das fibras densas exteriores longitudinais. Um par de mitocôndrias compreende um giro (BEGUELINI *et al.*, 2011, 2012, 2013c).

A transição da peça principal para a peça final não é fácil de ser observada, porém, as sessões cruzadas da peça final são frequentemente observadas. O nível predominante da peça final apresenta apenas o filamento axial com a membrana plasmática, e durante sua organização o filamento axial vai se perdendo e no final da peça final apenas 11 microtúbulos sem forma distinta são observados (BEGUELINI *et al.*, 2012, 2013c).

2.7 Ciclo do epitélio seminífero

Quando o mamífero atinge a sua maturidade sexual as células espermatogênicas se organizam em associações celulares ou estágios. A organização desses estágios é segmentar e existe somente um estágio por secção transversal de túbulo seminífero. A sucessão dos estágios é denominada de ciclo do epitélio seminífero (RUSSELL *et al.*, 1990).

Este ciclo é ordenado e todos os seus estágios ocorrem em uma área específica do epitélio ao longo do tempo (RUSSELL *et al.*, 1990). A forma mais utilizada para identificar os estágios deste ciclo é a que se baseia na forma e localização dos núcleos das espermátides, junto com a presença de divisões meióticas (FRANÇA, 1991). Este sistema, designado como Método da Morfologia Tubular por Berndtson (1977), permite a divisão em oito estágios por ciclo em mamíferos.

O ciclo do epitélio seminífero é dividido em estágios de acordo com o método de morfologia tubular (BERNDTSON, 1977), que se baseia nos seguintes parâmetros: (1) composição geral de células germinativas no epitélio seminífero, (2) fase meiótica dos espermatócitos, e (3) mudanças nucleares e acrossomais nas espermátides. A duração relativa dos estágios foi feita para corresponder às frequências relativas que aparecem nas sessões cruzadas dos túbulos seminíferos: estágios de longa duração irão aparecer com maior frequência, assim como aqueles com menor duração irão aparecer com uma frequência menor.

As células germinativas de mamíferos se desenvolvem em grupos consistentes definidos como associações celulares. Humanos, por exemplo, possuem seis associações celulares. Estas associações podem ser definidas de várias formas, mas isto exige o reconhecimento de tipos celulares específicos. Como o padrão da proliferação das espermatogônias não é certo, e existem diferentes esquemas para a classificação das espermátides em humanos, estas características são consideradas primeiramente, pois são utilizadas para definir as associações celulares. A espermatogênese é melhor compreendida quando existe um esquema de classificação destas associações, o que permite uma descrição e quantificação do epitélio seminífero (AMANN, 2008).

Em morcegos, um total de, aproximadamente, 4,5 ciclos do epitélio seminífero são necessários para completar o processo espermatogênico. As espermatogônias precisam passar por 4,5 ciclos para se diferenciarem em espermatozoides e serem liberados para aluz do túbulo seminífero. Em todas as espécies, a fase pós meiótica corresponde a mais de 50% da frequência, e a fase meiótica a menos de 10%. (BEGUELINI *et al.*, 2009).

2.8 A espermatogênese nos morcegos

A espermatogênese nos morcegos possui uma sequência semelhante à de outros grupos de mamíferos, e é extremamente sazonal em latitudes temperadas (CLARKE, 1981). Esta variação sazonal na espermatogênese envolve uma profunda involução do túbulo seminífero no outono, seguido pelo recrudescimento na primavera seguinte (KRUTZSCH & CRICHTON, 1987).

Nos morcegos a espermatogênese é mais longa em relação aos outros mamíferos, desde os primeiros sinais do crescimento do túbulo seminífero, no final da primavera, até a liberação do espermatozoide dos túbulos seminíferos e o preenchimento do epidídimo com espermatozoides maduros, no final do verão. Desta forma, para que todos os estágios

ocorram, são necessários de três a quatro meses (RACEY & TAM, 1974). Uma razão para que a espermatogênese dure tanto tempo nos morcegos pode ser o gasto energético necessário para o crescimento dos testículos e glândulas acessórias. A massa dos testículos dos morcegos aumentam cerca de quarenta vezes durante a espermatogênese (RACEY & TAM, 1974).

Um estudo que analisou a espermatogênese de quatro espécies de morcegos da família Phyllostomidae, no sudeste do Brasil, permitiu a análise morfológica das células, do epitélio seminífero, a caracterização das fases do ciclo, sua frequência e duração. Isso ajudou a definir as diferenças entre os padrões reprodutivos destes animais em comparação com os morcegos encontrados em climas temperados (BEGUELINI *et al.*, 2009).

Já, em outro estudo realizado também na região sudeste, porém com morcegos da espécie *Molossus molossus*, que objetivou fazer uma análise testicular mais completa, com o intuito de averiguar a presença ou ausência da variação reprodutiva sazonal. Este estudo mostrou que a reprodução está vinculada ao outono, estação que precede o maior índice pluviométrico, a partir do aumento de diversos parâmetros morfométricos tubulares (MORAIS, 2008).

3 JUSTIFICATIVA

Morcegos representam o maior grupo de mamíferos do Cerrado (AGUIAR & ZORTÉA, 2008). São importantes na dispersão de sementes, polinização e controle populacional de insetos. Como no Cerrado as estações são bem demarcadas, é possível que a sazonalidade influencie na reprodução dos morcegos.

Os morcegos em busca de alimento desempenham muito bem a dispersão de sementes, e o extermínio de insetos. Grande parte da reposição do bioma é feita por estes mamíferos. Como no Cerrado os meses de chuva aumentam a disponibilidade de frutos e insetos, é provável que as mudanças climáticas interfiram, também, no ciclo reprodutivo destes animais que, como já descritos apresentam ciclos que podem ser alterados principalmente de acordo com a disponibilidade de alimento no ambiente.

Apesar de no Brasil existirem alguns poucos estudos semelhantes ao aqui proposto (BEGUELINI *et al.*, 2009; MORAIS *et al.*, 2013a; ORTÊNCIO-FILHO *et al.*, 2007, 2010), este será o primeiro realizado na região do Cerrado.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Analisar as características morfológicas e morfométricas dos testículos de quatro espécies de morcegos (*rtibeus lituratus*, *Platyrrhinus lineatus*, *Sturnira lilium* e *Carollia perspicillata*) da família *Phyllostomidae*, capturadas em diferentes regiões do Distrito Federal, ao longo das estações de seca e chuva.

4.2 Objetivos Específicos

Descrever e comparar as características morfológicas e morfométricas dos testículos dos morcegos das espécies *A. lituratus*, *P. lineatus*, *S. lilium* e *C. perspicillata*, coletados na região de Cerrado do DF;

Comparar as características morfológicas e morfométricas dos espermatozoides das quatro espécies estudadas;

Comparar as características observadas entre os períodos de chuva e seca nas diferentes espécies estudadas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aprovação por Comitê de ética

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA-UnB), UnBDOC n° 116319/2011. A licença para coleta dos animais pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA), sob o n° 27719-25, está em nome da Profa. Ludmilla Aguiar, do Departamento de Zoologia, com a qual mantivemos colaboração.

5.2 Captura dos animais

Foram capturados na estação de seca cinco machos adultos das espécies *A. lituratus*, *P. lineatus* e *S. lilium* e quatro animais da *C. perspicillata*, na estação chuvosa cinco animais das espécies *A. lituratus* e *S. lilium*, e quatro animais das *P. lineatus* e *C. perspicillata*, de diferentes tamanhos corporais em parques urbanizados, nas estações de chuva e seca, formando um total de 37 animais.

Para a coleta dos morcegos, foram utilizadas três redes de neblina medindo 12 x 2.6 metros. Os pesquisadores ficaram a uma distância de cinco metros das redes permitindo a captura dos animais assim foram interceptados pela rede. As espécies escolhidas, da família Phyllostomidae, não se encontram na lista das espécies ameaçadas de extinção, de acordo com a Lista Vermelha, realizada pela International Union for Conservation of Nature (IUCN), liberada em 2014 (em: <http://www.iucnredlist.org/>, acesso em 24/05/2014).

5.2.1 Áreas e períodos do estudo

Os animais foram capturados em diferentes regiões do Distrito Federal onde existe a presença de morcegos confirmada. Durante as estações chuvosa (outubro-abril) e seca (maio-setembro). É possível verificar na Figura 5, a localização de todos os pontos de coleta. Para referências futuras as coordenadas de cada ponto estão descritas a seguir:

1 - Instituto Federal de Brasília (Planaltina) - Latitude = 15°35'36.48"S, Longitude = 47°34'34.98"O;

2 - Entorno do Parque Nacional II (Sobradinho) - Latitude = 15°40'45.37"S, Longitude = 47°49'20.01"O;

3 - Parque Olhos D'água - Latitude = 15°44'28.25"S, Longitude = 47°52'58.98"O;

4 - ICC sul (UnB) - Latitude = 15°45'50.49"S, Longitude = 47°51'59.95"O;

5 - Parque Nacional - Latitude = 15°43'23.38"S, Longitude = 47°55'21.15"O;

6 - Aeroporto (Brasília) - Latitude = $15^{\circ}52'33.84''S$, Longitude = $47^{\circ}53'41.78''O$.

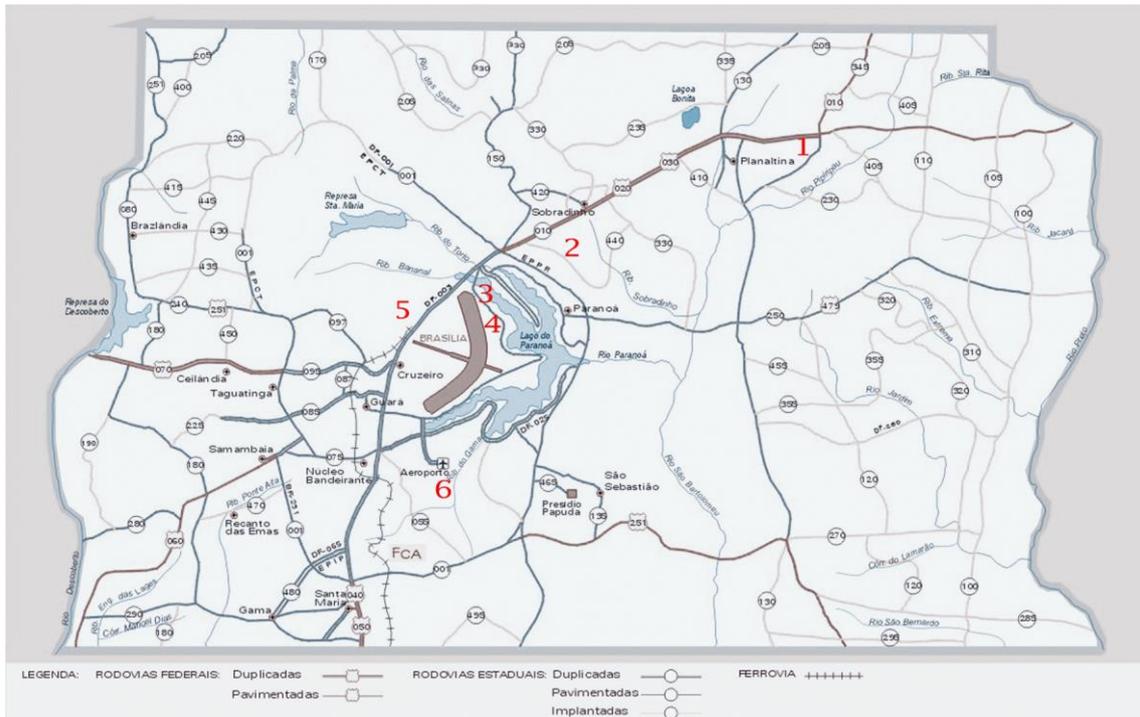


Figura 5: Mapa com os locais de coleta dos animais durante os períodos de seca e chuva.

5.3 Coleta dos órgãos

Após a coleta dos morcegos, eles foram mantidos em sacos individuais de tecido para o transporte até o biotério do Instituto de Ciências Biológicas - UnB e mantidos à temperatura ambiente no escuro, em gaiolas individuais (25x39x45cm). Na manhã seguinte à coleta, os animais foram eutanasiados por decapitação. Em seguida, os animais foram pesados, e posicionados na placa de dissecação para a retirada dos testículos e epidídimos. Os testículos foram fotografados em sua topografia natural e em seguida excisados, pesados e medidos individualmente, e então encaminhados para o processamento histológico.

5.4 Processamento histológico

Os testículos e epidídimos esquerdos e $\frac{1}{2}$ do testículo direito foram fixados com Bouin (solução saturada de ácido pícrico + formalina + ácido acético glacial), com tempo de fixação de 5 horas. Em seguida, foram feitas cinco lavagens com álcool 50%, com durações de uma hora cada, e depositados em álcool 70%.

Para o processamento histológico, os testículos foram deixados durante uma hora em cada passo do seguinte processamento: álcool 80%, álcool 90%, álcool 100% I, álcool 100% II, álcool 100% III, Xilol I, Xilol II, Xilol III, Parafina I, Parafina II, Parafina III e

emblocados. Cortes histológicos de 3µm foram realizados sendo que a cada corte utilizado, quinze foram descartados, para evitar que fosse analisado o mesmo túbulo, em todo material emblocado, cinco lâminas de cada animal foi montada, posteriormente coradas com hematoxilina e eosina, e então avaliadas em microscópio de luz (Leica MD 2000, Wetzlar, Alemanha).

5.4.1 Processamento para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O epidídimo direito foi retirado para lavagem, o que consiste na retirada dos espermatozoides para avaliação morfológica em microscópio eletrônico de varredura. Para isso o lavado epididimal foi, posteriormente, diluído em solução salina, centrifugado, retirando-se o excesso da solução salina e fixado em Karnovsky modificado (2% Glutaraldeído, 2% Paraformaldeído, 3% sacarose, 0,005M de Cloreto de Cálcio, em meio tamponado por Cacodilato de Sódio 0,1M, pH 7,2-7,4) durante uma hora. Em seguida, foi feita nova centrifugação, para a retirada do excesso do fixador e adicionou-se o tampão cacodilato de sódio. Para que o material seja depositado na lamínula, foi lavado com água e etanol e, após secagem foi adicionado de uma gota de poli-L-Lysine 0,1% (sigma P8920), esperando a secagem. Desta forma, foi adicionado 200µL da amostra sobre a lamínula durante cinco minutos, sendo o excesso retirado. Uma gota de tetróxido de ósmio 2% foi adicionada, e o material incubado coberto com um papel alumínio por trinta minutos. O material foi desidratado com uma sequência de concentrações crescentes de acetonas: 50%, 70%, 90%, e 100% duas vezes, durante cinco minutos em cada etapa. As lamínulas foram secas ao ponto crítico e as amostras metalizadas com ouro por dois minutos e posteriormente, analisadas ao microscópio eletrônico de varredura (JEOL – JSM-7001F).

A microscopia de varredura permitiu a análise morfológica dos espermatozoides de cada espécie, assim como as diferenças em tamanho das peças que formam os espermatozoides. Somente os espermatozoides de um animal de cada espécie foram analisados durante a estação de seca, sendo avaliados cinco espermatozoides de cada animal.

5.5 Parâmetros avaliados

Foram feitas medidas dos túbulos seminíferos em corte transversal (diâmetro externo, diâmetro da luz e altura do epitélio seminífero), os tipos celulares da linhagem espermatogênica presentes foram computados e contados em cada corte, bem como as células de Sertoli. As áreas de parênquima e estroma foram calculadas.

Todas as avaliações foram feitas em cinco secções distintas de cada testículo, e foram avaliados, pelo menos, 25 túbulos seminíferos de cada testículo.

Cortes transversais dos epidídimos também foram feitos para a avaliação da morfologia dos espermatozoides e das camadas teciduais da parede deste órgão.

O índice gonadosomático (IGS) foi calculado com a fórmula $IGS = PG/PC \times 100$, sendo PG o peso total das duas gônadas e PC o peso corporal do animal em gramas. Foi também analisada a proporção entre a área ocupada por túbulos seminífero relativo à área de tecido testicular (relação parênquima/estroma). Todos os dados coletados foram comparados entre as espécies, e entre os períodos de chuva e seca para cada espécie.

5.6 Tratamento Estatístico

Os resultados foram expressos pela Média \pm Erro Padrão da Média. Para a análise estatística foi empregada a Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey. O critério de significância mínimo foi de 5% ($P < 0,05$). Foram feitas comparações dos dados obtidos entre as espécies, bem como entre as estações do ano para cada espécie. O experimento foi conduzido de forma aleatória, e todos os fatores foram analisados usando o PROC MIXED (SAS Institute Cary North Carolina).

6. RESULTADOS

Os parâmetros macroscópicos analisados, peso corporal dos animais, peso do testículo esquerdo e comprimento do testículo esquerdo (TABELA 1), possibilitam a comparação entre as espécies, mostrando suas diferenças externas, e as diferenças dentro da mesma espécie causadas pelas estações.

TABELA 1: Medidas macroscópicas (médias \pm DP) dos morcegos das quatro espécies analisadas nas estações seca e chuvosa.

	ESP EST	<i>A. lituratus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>S. lilium</i>	<i>C. perspicillata</i>
	Peso corporal (g)	SECA	67,7 ^{Aa} \pm 7,60	25,7 ^{Ba} \pm 0,73	23,0 ^{Ca} \pm 2,92
CHUVA		65,1 ^{Ab} \pm 4,43	20,5 ^{Bb} \pm 1,27	21,3 ^{Bb} \pm 0,50	16,2 ^{Cb} \pm 0,36
IGS (%)	SECA	0,282 ^{Ba} \pm 0,50	0,355 ^{Aa} \pm 0,31	0,345 ^{Aa} \pm 0,16	0,285 ^{Ba} \pm 0,25
	CHUVA	0,508 ^{Ab} \pm 0,30	0,613 ^{Bb} \pm 0,39	0,280 ^{Cb} \pm 0,23	0,344 ^{Db} \pm 0,28
Peso testículo esquerdo (mg)	SECA	9,2 ^{Aa} \pm 2,40	4,2 ^{Ba} \pm 1,40	4,3 ^{Ba} \pm 1,92	3,4 ^{Ba} \pm 2,40
	CHUVA	17,0 ^{Ab} \pm 10,61	6,5 ^{Bb} \pm 4,12	3,2 ^{Cb} \pm 2,70	2,1 ^{Cb} \pm 1,26
Comprimento testículo esquerdo (mm)	SECA	7,0 ^{Aa} \pm 1,05	5,5 ^{Ba} \pm 1,05	5,9 ^{Ca} \pm 1,02	5,1 ^{Da} \pm 1,74
	CHUVA	8,7 ^{Ab} \pm 1,60	6,6 ^{Bb} \pm 1,30	5,3 ^{Cb} \pm 1,30	4,6 ^{Db} \pm 0,96

a,b - letras diferentes indicam diferença significativa na mesma coluna ($P < 0,0001$)

A,B,C,D - letras diferentes indicam diferença significativa na mesma linha ($P < 0,0001$)

O peso corporal foi significativamente maior na seca do que na chuva em todas as espécies coletadas. Durante a estação seca os pesos corporais foram significativamente diferentes entre as espécies. Da mesma forma, na estação de chuva também houve diferença entre as espécies estudadas, com exceção das espécies *P. lineatus* e *S. lilium* que não apresentaram diferença significativa entre si.

O IGS foi calculado com o peso das duas gônadas e o peso corporal do animal, o esperado para este índice é uma correlação com o peso dos testículos. Uma diferença significativa foi observada entre as estações para todas as espécies. Na comparação entre as espécies, durante a seca o *A. lituratus* e *C. perspicillata* não apresentaram diferença significativa, nem o *P. lineatus* e *S. lilium*. Na estação chuvosa, todas as espécies apresentaram um IGS significativamente diferente. *A. lituratus* e *P. lineatus* apresentaram o IGS aumentado na estação chuvosa, assim como o peso testicular, e isso permite inferir que a estação chuvosa é a estação onde ocorre o ciclo reprodutivo destes animais. Já *S. lilium* tem o IGS aumentado durante a seca, assim como seu peso testicular, e o *C. perspicillata* apesar de

apresentar um aumento significativo durante a estação chuvosa, teve o seu peso testicular e corporal aumentado na seca de forma proporcional.

O peso do testículo foi significativamente maior na estação de chuva para as espécies *A. lituratus* e *P. lineatus*. Já *S. liliium* e *C. perspicillata* apresentaram um peso testicular significativamente maior na seca. Na seca o peso testicular de *A. lituratus* foi significativamente maior que o das outras três espécies. Na chuva houve diferença entre as espécies, com exceção de *S. liliium* e *C. perspicillata* que foram semelhantes entre si.

Em relação ao comprimento do testículo todas as espécies apresentam uma diferença significativa entre elas nas duas estações. Nas mudanças devido a estação, o comprimento do testículo acompanha as mudanças do peso do testículo, sendo este comprimento maior de forma significativa na estação de chuva para as espécies *A. lituratus* e *P. lineatus*, na estação de seca para as espécies *S. liliium* e *C. perspicillata*.

Uma curiosidade que ocorreu nas quatro espécies coletadas foi a posição anatômica das gônadas, que não é fixa, se alternando entre a região abdominal e a região do músculo perianal, em todos os animais coletados das quatro espécies. Em alguns casos durante a coleta os animais estavam com os testículos visíveis, na região perianal, mas até serem levado ao laboratório para o início das análises, um ou ambos testículos estavam escondidos, na região abdominal.

Cinco parâmetros dos túbulos seminíferos foram avaliados para verificar a atividade reprodutiva das quatro espécies estudadas, a área do túbulo, área da luz do túbulo, diâmetro do túbulo, diâmetro da luz do túbulo e altura do epitélio (TABELA 2).

TABELA 2: Parâmetros dos túbulos seminíferos (média±EPM) nas quatro espécies de morcego estudadas durante as estações seca e chuvosa.

	ESP EST	<i>A. lituratus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>S. liliium</i>	<i>C. perspicillata</i>
Área do túbulo (µm ²)	SECA	15.866 ^{Aa} ±301,3	10.660 ^{Ba} ±348,4	9.523 ^{Ba} ±527,0	14.090 ^{BAa} ±4.166,8
	CHUVA	19.508 ^{Aa} ±465,1	10.272 ^{Ba} ±504,8	7.323 ^{BCa} ±675,3	3.534 ^{Cb} ±175,6
Área da luz do túbulo (µm ²)	SECA	4.295 ^{Aa} ±555,0	2.521 ^{Ba} ±103,5	2.907 ^{Ba} ±244,7	3.600 ^{BAa} ±670,1
	CHUVA	4.230 ^{Aa} ±161,6	1.777 ^{Ba} ±94,8	1.321 ^{Bb} ±148,2	603 ^{Bb} ±43,5
Diâmetro do túbulo (µm)	SECA	141 ^{Aa} ±1,7	113 ^{Ba} ±1,9	107 ^{Ba} ±2,5	109 ^{Ba} ±6,5
	CHUVA	153 ^{Ab} ±2,3	109 ^{Ba} ±2,5	87 ^{Cb} ±3,0	64 ^{Db} ±1,5
Diâmetro da luz do túbulo (µm)	SECA	68 ^{Aa} ±1,3	56 ^{Ba} ±1,2	55 ^{Ba} ±1,9	55 ^{Ba} ±2,8
	CHUVA	74 ^{Ab} ±1,7	46 ^{Bb} ±1,1	36 ^{Cb} ±1,3	26 ^{Db} ±0,8
Altura do epitélio (µm)	SECA	37 ^{Aa} ±0,5	30 ^{Ba} ±0,7	24 ^{Ca} ±0,66	25 ^{Ca} ±2,2
	CHUVA	38 ^{Aa} ±0,6	31 ^{Ba} ±12,7	25 ^{Ca} ±1,0	19 ^{Db} ±0,5

a,b - letras diferentes indicam diferença significativa na mesma coluna (P<0,0001)

A,B,C,D - letras diferentes indicam diferença significativa na mesma linha (P<0,0001)

A. lituratus apresentou todos os parâmetros tubulares significativamente maiores que os das outras espécies, tanto na seca quanto na chuva, com excessão da área do túbulo e da luz do túbulo na seca, onde este valor não diferiu do *C. perspicillata*. Além disso, *P. lineatus* e *S. lilium* diferiram entre si para diâmetro do túbulo, diâmetro da luz do túbulo e altura do epitélio na chuva, e ainda para altura do epitélio na seca. Já *C. perspicilata* mostrou os parâmetros de diâmetro do túbulo e da luz do túbulo e altura do epitélio diferentes de todas as outras espécies na estação chuvosa.

Na comparação entre as estações somente o *C. perspicillata* mostrou uma diferença significativa para todos os parâmetros analisados, sendo sempre maiores na estação seca. Além disso, houve diferença entre as estações no diâmetro do túbulo para *A. lituratus* e *S. lilium*; no diâmetro da luz do túbulo para *A. lituratus*, *P. lineatus* e *S. lilium*.

É importante ressaltar que foi possível observar espermatozoides nos túbulos seminíferos e epidídimos de todos os animais coletados das quatro espécies, tanto na estação de seca quanto de chuva. Também foram visualizados todos os tipos celulares da linhagem germinativa dentro dos túbulos seminíferos. A Figura 6 mostra imagens representativas de túbulos seminíferos das quatro espécies de morcego estudadas, nas duas estações.

A relação área tubular/área intersticial dos testículos das quatro espécies estudadas, na seca e na chuva, estão na Tabela 3 De todas as espécies, foi observado que somente o *C. perspicillata* possui diferença significativa na relação área tubular/área intersticial entre as estações, com um aumento do parênquima na seca.

TABELA 3: Relação área tubular/área intersticial nos testículos das quatro espécies de morcego estudadas durante as estações seca e chuvosa

EST \ ESP	<i>A. lituratus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>S. lilium</i>	<i>C. perspicillata</i>
SECA	80/20 ^{Ba}	82/18 ^{Ba}	65/35 ^{Aa}	86/14 ^{Ba}
CHUVA	86/14 ^{Ba}	86/14 ^{Ba}	69/31 ^{Aa}	74/26 ^{Ab}

a,b - letras diferentes indicam diferença significativa na mesma coluna (P<0,0001)

A,B - letras diferentes indicam diferença significativa na mesma linha (P<0,0001)

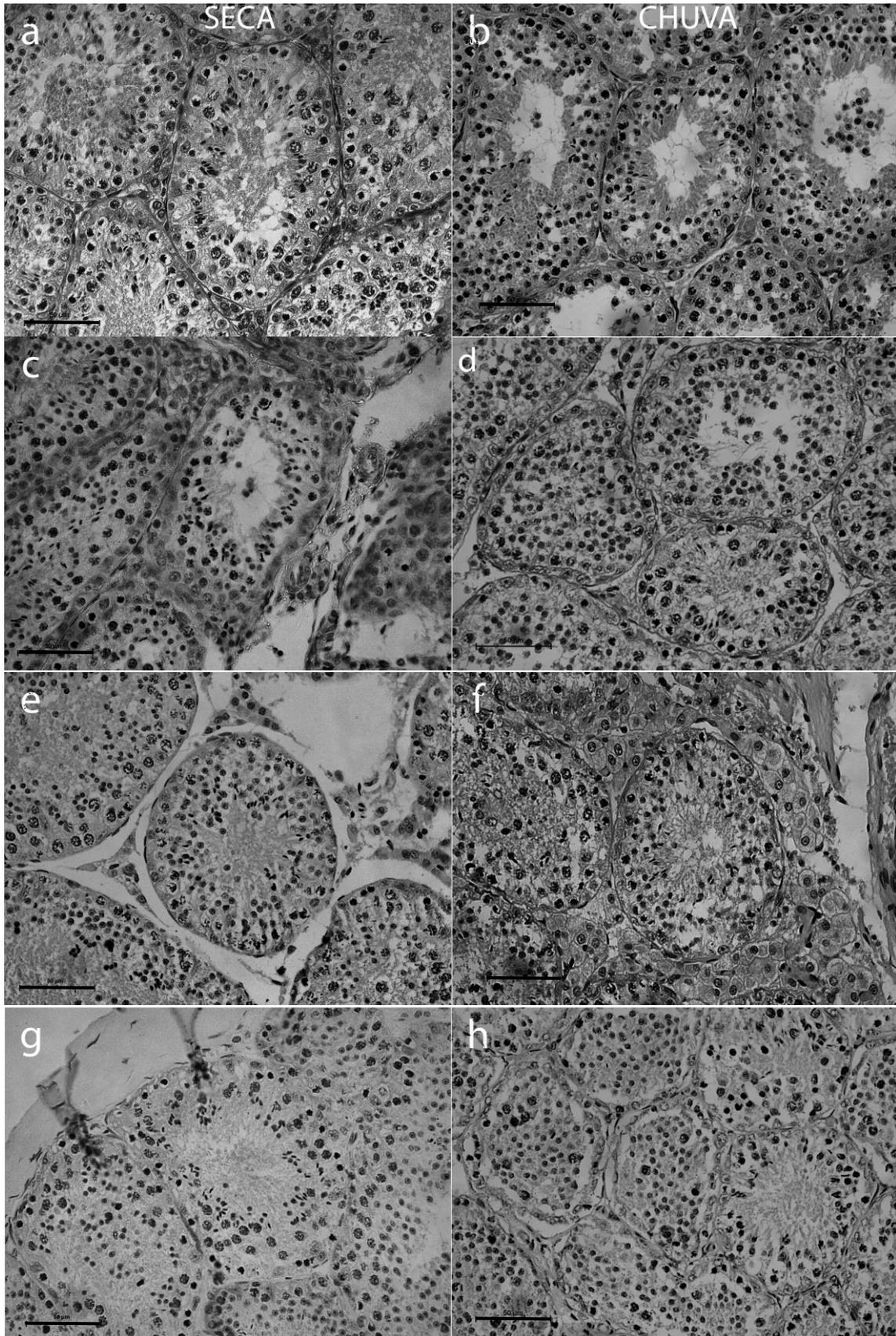


Figura 6: Microscopia de luz com a morfologia dos túbulos seminíferos das quatro espécies de morcegos estudadas nas estações seca e chuvosa: a e b: *A. lituratus*; c e d: *P. lineatus*; e e f: *S. lilium*; g e h: *C. perspicillata*. Barras = 50μm

A Figura 7 mostra as imagens de espermatozoides inteiros das espécies *A. lituratus*, *P. lineatus*, *S. lilium* e *C. perspicillata*, em microscopia eletrônica de varredura. É possível observar algumas diferenças no formato dos espermatozoides entre as espécies. Os espermatozoides da espécie *A. lituratus* possuem a cabeça em formato de seta bem proeminente, se diferenciando muito do formato das outras espécies onde a cabeça é arredondada. Apesar do pequeno número de espermatozoides analisados a presença de gota citoplasmática na região da peça intermediária foi observada em todos os animais das quatro espécies estudadas.

As medidas dos espermatozoides e suas partes para as quatro espécies estão apresentados na Tabela 4. Em relação ao tamanho, a única diferença significativa encontrada entre as espécies foi em relação ao tamanho da cabeça, sendo *A. lituratus* e *P. lineatus* significativamente diferentes entre si.

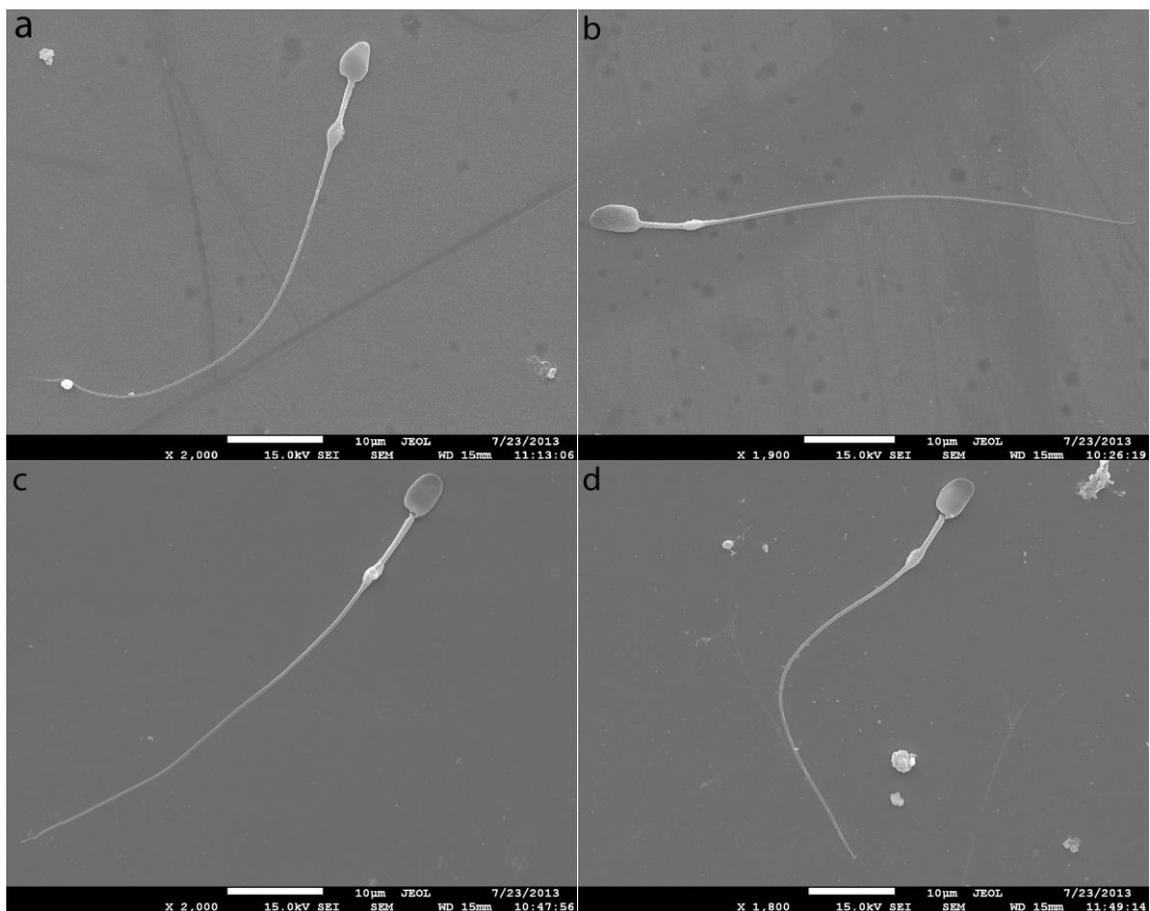


Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura das quatro espécies de morcegos estudadas: a – *A. lituratus*; b – *P. lineatus*; c – *S. lilium*; d – *C. perspicillata*. Barras = 10 µm.

TABELA 4: Medidas dos espermatozoides (média±DP) das quatro espécies de morcego estudadas durante a estação de seca.

	Cabeça (µm)	Peça intermediária (µm)	Cauda (µm)	Inteiro (µm)
<i>A. lituratus</i>	4,2 ^B ±0,19	9,6 ^A ±1,23	51,8 ^A ±6,72	55,8 ^A ±7,25
<i>P. lineatus</i>	5,1 ^A ±0,24	10,0 ^A ±2,77	55,1 ^A ±1,71	60,4 ^A ±1,83
<i>S. lilium</i>	4,6 ^{BA} ±0,08	9,5 ^A ±0,28	54,0 ^A ±1,10	58,7 ^A ±1,00
<i>C. perspicillata</i>	4,6 ^{BA} ±0,63	8,7 ^A ±0,76	48,8 ^A ±2,01	53,3 ^A ±2,14

A,B - letras diferentes indicam diferença significativa na mesma coluna (P<0,05)

7. DISCUSSÃO

As quatro espécies de morcegos analisadas neste estudo estão presentes em abundância no DF. As principais características que permitem a identificação das quatro espécies estudadas são macroscópicas, tamanho corporal do animal, pelagem e padrão de cor. Em ordem de tamanho os indivíduos da espécie *A. lituratus* são os maiores, seguidos por *P. lineatus* e *S. liliium* que possuem tamanhos muito próximos, e então *C. perspicillata* com os menores indivíduos coletados. Essas diferenças de tamanho são corroboradas em nosso estudo ao analisarmos o parâmetro de peso corporal. Os animais da espécie *A. lituratus* apresentaram uma média de peso corporal maior em comparação com as outras sendo de (65,1-67,7g), seguida pelo *P. lituratus* e *S. liliium*, pesando (25,7-20,5g) e (23-21,3g) respectivamente, e então *C. perspicillata* que possui o menor peso de (18,4-16,2g). Em dois estudos onde um dos parâmetros avaliados também foi o peso corporal dos morcegos da espécie *A. lituratus*, os valores obtidos se equivalem aos encontrados em nosso estudo, sendo 65g de peso corporal médio em ambos os estudos, sendo um realizado em Minas Gerais e o outro em São Paulo, diferentes regiões do Brasil (BEGUELINI et al., 2013b; DUARTE & TALAMONI, 2009). Para as espécies *P. lineatus* e *C. perspicillata* um estudo realizado em São Paulo encontrou peso corporal de 25g e 15g, respectivamente (BEGUELINI et al., 2013b), valores também muito próximos aos que encontramos. Assim como para *S. liliium* que foi comparado com dois estudos, um sendo realizado em Minas Gerais e o outro no México, observando valores de 22,6g e 20,2g respectivamente (ÁLVAREZ-GUERRERO et al., 2014; MORAIS et al., 2014).

Era esperado que o peso corporal fosse significativamente maior em todas as espécies durante a estação chuvosa, onde ocorre uma maior disponibilidade de alimento. Entretanto ao analisar os dados coletados das quatro espécies estudadas, houve um peso corporal significativamente maior em todas as espécies na estação de seca. Duas hipóteses foram levantadas a respeito para explicar esse resultado, uma a ocorrência de chuvas torrenciais durante a noite na estação chuvosa poderia inibir a saída dos morcegos de seus abrigos para buscar alimentos, e a segunda que devido a características próprias do Cerrado, vegetação predominante no DF, em que há frutos que resistem ou se desenvolvem especificamente na estação de seca, servindo de alimento para estes animais.

Embora não se saiba ao certo como é a performance de vôo destes animais durante a chuva, observações de campo durante as coletas dos animais mostraram que morcegos evitam sair em busca de alimentos durante chuvas fortes. Voigt e colaboradores (2011) quantificaram

e compararam a queima de energia de morcegos *C. sowelli* durante os vôos na ausência e na presença de chuvas, e mostraram que há um aumento do gasto metabólico destes animais devido ao aumento de peso causado pela água retida em seus pelos e asas. Para os autores o aumento do gasto energético durante as chuvas poderia explicar porque os morcegos param ou reduzem as suas atividades alimentares durante o período chuvoso, porém podem continuar saindo para se alimentar quando os recursos alimentares oferecem um ganho suficiente de energia. Estes fatos poderiam explicar os resultados obtidos em nosso estudo.

Os animais das espécies analisadas em nosso estudo foram também avaliados por um grupo de pesquisadores que estudaram a alimentação dos animais. Este grupo observou que nas fezes dos animais, durante a estação de seca, foram encontradas sementes de árvores que produzem frutos durante a estação de seca como, por exemplo, dos gêneros *Cecropia*, *Erythroxylum*, *Myrcia*, *Passiflora*, *Piper*, *Solanum*, *Vismia*, entre outras. Isto mostra que no cerrado do DF existe uma boa diversidade de alimentos que podem ser utilizados pelos morcegos na época seca, favorecendo o aumento de peso destes animais neste período.

Todos os animais coletados em nosso estudo mostraram um padrão de movimentação dos testículos, que podiam estar aparentes na região parapenial ou escondidos na região abdominal, em alguns casos quando o animal foi capturado ele apresentava os dois testículos aparentes, e antes da eutanásia já não se encontravam visíveis. Este posicionamento dos testículos e epidídimos já foi classificado antes em quatro classes: (1) permanentemente abdominais; (2) permanentemente inguinais; (3) migratórios, e (4) externos (KRUTZSCH, 2000). Porém, é proposto que a localização preferida dos testículos nos animais da família *Phyllostomidae* é a externa, fora do abdômen, sendo a movimentação sujeita ao controle do animal (BEGUELINI et al., 2013b). Beguelini e colaboradores (2009) estudaram as mesmas quatro espécies, *A. lituratus*, *P. lineatus*, *S. liliun* e *C. perspicillata*, e observaram que os testículos se posicionam entre a pele e o músculo parapenial. Em outro estudo, os mesmos autores já relatam a movimentação dos testículos para a espécie *Molossus molossus* e *Eumops glaucinus*, considerando-os migratórios (BEGUELINI et al., 2010). Esta mudança de posicionamento também pode ser observada na espécie *Taphozous georgianus* (JOLLY & BLACKSHAW, 1988).

A posição testicular externa é comum em mamíferos, e normalmente está relacionada à termorregulação testicular, no entanto não existe comprovação de que a temperatura corporal afeta a espermatogênese em morcegos (BEDFORD, 2008). Jolly e Blackshaw (1988), em secções seriadas de cortes histológicos de testículos de *Taphozous georgianus* mostraram que nestes animais não existe plexo pampiniforme, uma das estruturas anatômicas

mais importantes para a termorregulação testicular, e as artérias e veias testiculares não ficam enroladas, apresentando estrutura simples quando os testículos estão na região onde ficam aparentes e desorganizados quando os testículos vão para a região abdominal. A movimentação dos testículos em morcegos pode estar relacionada apenas a um fechamento incompleto do canal inguinal, sem motivo fisiológico.

Em nosso trabalho, o peso testicular apresentou diferença significativa entre as estações para todas as espécies, sendo que foi maior na estação de chuva para os *A. lituratus* e *P. lineatus*, e na estação de seca para os *S. lilium* e *C. perspicillata*. Em um estudo feito com morcegos da espécie *S. lilium* em Viçosa, Minas Gerais, não foi observada diferença significativa entre as estações de chuva e seca (MORAIS et al., 2014). Outro realizado em Minas Gerais com morcegos da espécie *A. lituratus*, porém sem considerar diferentes estações, encontrou um valor médio para o peso do testículo esquerdo (sem epidídimo) de 13-15 mg (DUARTE & TALAMONI, 2009), valor próximo ao encontrado na chuva em nosso estudo, que foi de 17 mg (com epidídimo).

Para o estudo da reprodução destes animais, os parâmetros analisados mais importantes são os relacionados ao peso e características morfológicas dos testículos. O IGS que vem sendo o método qualitativo mais utilizado na determinação do ciclo reprodutivo de machos permite a comparação do peso testicular em relação ao peso corporal do animal. Encontramos uma diferença significativa entre as estações para o *A. lituratus*, *P. lineatus* e *C. perspicillata* com este índice aumentado durante a estação de chuva, e para o *S. lilium* com esse índice aumentado durante a seca, sugerindo qual é a estação do período reprodutivo nestas espécies. Beguelini e colaboradores (2013b), em um estudo realizado em São Paulo sem a comparação entre as estações, observaram valores aproximados de IGS de 0,4 para o *A. lituratus*, 0,6 para *P. lineatus* e 0,5 para o *C. perspicillata*, semelhantes com os valores obtidos com o nosso estudo, *A. lituratus* = 0,51, *P. lineatus* = 0,61 e *C. perspicillata* = 0,34. Ainda no estudo de Beguelini e colaboradores (2013b), todos os valores de IGS foram significativamente diferentes entre as espécies, esta diferença entre as espécies também foi encontrada em nosso estudo, mas somente durante a estação chuvosa. Beguelini e colaboradores (2013a) analisando a espécie *A. planirostris* em São Paulo, observou que o IGS teve um padrão similar ao peso testicular, onde seus maiores valores foram encontrados durante a estação chuvosa, o que era esperado para estes parâmetros. Em nosso trabalho o mesmo comportamento foi observado para outra espécie do gênero *Artibeus* (*A. lituratus*).

Os parâmetros tubulares obtidos em nossas análises permitem a definição dos padrões reprodutivos dos animais estudados em comparação entre as espécies e entre as estações. *A.*

lituratus apresentou os maiores valores em todos os parâmetros microscópicos analisados (área do túbulo, área da luz do túbulo, diâmetro do túbulo, diâmetro da luz do túbulo e altura do epitélio) em relação às outras espécies, um resultado já esperado considerando-se que esta espécie possui o maior tamanho testicular entre elas. Duarte e Talamoni (2010), em um estudo realizado em Minas Gerais, observaram em *A. lituratus* que o maior valor para diâmetro do túbulo e altura do epitélio ocorreu durante a estação de seca (203,4µm para o diâmetro do túbulo e 79,7 µm para a altura do epitélio). Em nosso estudo o *A. lituratus* apresentou seus maiores valores para estes parâmetros durante a estação chuvosa, os valores destes parâmetros foram 153µm em diâmetro do túbulo e 38µm na altura do epitélio. Estas diferenças podem ser explicadas pelas diferenças vegetacionais e climáticas das duas regiões estudadas. É importante sempre considerar os padrões sociais de cada espécie, como a ocorrência de hierarquia com diferenciação de membros dominantes e subordinados, bem como a idade dos animais estudados. As análises do diâmetro tubular e altura do epitélio feitas em morcegos da espécie *M. molossus* obteve os valores médios de 158,15µm e 56,66µm, respectivamente, durante a estação seca, assim como o seu IGS e peso testicular foram maiores na mesma estação (MORAIS et al., 2013b). No entanto, a comparação desta espécie com as estudadas no presente trabalho é difícil por serem de gêneros diferentes e possuírem dietas diferentes (insetívoro x frugívoros). Os outros parâmetros analisados não foram possíveis de serem comparados por falta de estudos similares com morcegos, sendo estes importantes para a determinação do ciclo reprodutivo destes animais.

Apesar de terem sido observadas diferenças significativas em alguns parâmetros microscópicos em todas as espécies estudadas, foi possível observar a presença de todas as células da linhagem germinativa, inclusive espermatozoides, em todos os animais coletados, tanto na estação de seca quanto na de chuva. A presença de toda linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócitos e espermátides alongadas) pode ser observada nos testículos de *A. planirostris* durante o ano todo (BEGUELINI et al., 2013a). No entanto, o peso testicular e altura do epitélio foram maiores entre os meses de Setembro e Fevereiro, durante o verão, com dias mais longos e período de chuvas. Foi observado também que a testosterona circulante foi maior neste período quando comparada com os outros meses do ano (BEGUELINI et al., 2013a). Este estudo mostrou uma maior atividade espermatogênica neste período (primavera e verão), porém não encontrou uma associação destes valores a um momento de latência no padrão reprodutivo destes morcegos (BEGUELINI et al., 2013a). Duarte e Talamoni (2010) verificaram também a presença de espermatozoides durante o ano todo em morcegos da espécie *A. lituratus*, assim como em nosso estudo. Desta forma, os

resultados do nosso trabalho sugerem que não há sazonalidade reprodutiva para as espécies estudadas, pelo menos nas condições do Distrito Federal.

Beguelini e colaboradores (2013a) notaram que os padrões reprodutivos do macho *A. planirostris* são regulados por fatores ambientais, sendo que o aumento da atividade espermatogênica diminui em condições de aumento da temperatura, estação de chuva e menor quantidade de luz no dia. Durante as coletas dos animais foi possível observar também que a disponibilidade de comida não parece ser um fator limitante durante o período espermatogênico de morcegos machos, sob condições climáticas adequadas. Barros e colaboradores (2013) estudaram morcegos da espécie *M. molossus* coletados em Viçosa-MG, comparando os dados obtidos para as reservas energéticas com o período reprodutivo destes animais, concluíram que a grande quantidade de tecido adiposo encontrado nos animais durante o outono, que é o início da estação de seca, coincide com o desenvolvimento dos túbulos seminíferos, sugerindo que esta reserva tem um papel importante para suprir a alta demanda de energia necessária durante as atividades reprodutivas.

Beguelini e colaboradores (2013a) verificaram que apesar do padrão ativo da espermatogênese em morcegos da espécie *A. planirostris* durante todo o ano, dois picos evidentes de produção espermatogênica foram observados, um em Setembro e outro em Fevereiro. Foi sugerido, então, que esta espécie possui estes dois picos para gerar uma produção suficiente de espermatozoides para o seu sistema de harém, e para sincronizar o seu ciclo com o ciclo reprodutivo das fêmeas. Porém, em outro estudo com morcegos da espécie *M. nigricans* foi observado que estes animais possuem um período de total regressão testicular, de Outubro a Novembro, e recrudescência de Dezembro a Janeiro (BEGUELINI et al., 2013c). Ou seja, podemos verificar que vários são os fatores que podem influenciar o período reprodutivo de morcegos machos, como condições climáticas, disponibilidade de alimento, e ciclo reprodutivo das fêmeas, havendo ainda diferenças entre as espécies.

A relação área tubular/área intersticial não apresentou diferença entre as estações para três das quatro espécies estudadas, *A. lituratus*, *P. lineatus* e *S. liliium*, com a área de parênquima sempre maior. Já a espécie *C. perspicillata* apresentou diferença entre as estações, com uma relação área tubular/área intersticial maior na seca (84/14) do que na chuva (74/26). Da mesma forma, Morais e colaboradores (2013a,b) e Barros e colaboradores (2013), autores que trabalham no mesmo grupo de pesquisa, em três diferentes estudos com morcegos da espécie *M. molossus*, coletados em Viçosa-MG, relatam ter encontrado uma proporção de parênquima/estroma maior na seca (91/9) do que na chuva (87/13). Estes autores também observaram a presença de espermatozoides durante todo o ano, da mesma forma que em nosso

trabalho, e sugerem que machos da espécie *M. molossus* possuem ciclo reprodutivo contínuo, com modulação da sua reprodução apresentando maior atividade espermatogênica durante a seca. Este padrão pode estar ocorrendo nos machos *C. perspicillata* nas condições do presente trabalho.

Em nosso estudo, a proporção de área tubular/área intersticial teve valores semelhantes para o *A. lituratus*, *P. lineatus* e *C. perspicillata*, porém o *S. liliium* apresentou resultados significativamente inferiores aos destas duas espécies, tanto na seca quanto na chuva. Esta diferença pode ser explicada pela presença de células de Leydig maiores do que o normal, encontrada em alguns dos animais *S. liliium* coletados em nosso estudo (dados não mostrados), o que pode ser visualizado na Figura 6F.

No presente trabalho, foi observada a presença de espermatozoides nos túbulos seminíferos e epidídimos de todos os animais coletados, tanto na seca quanto na chuva, sugerindo que não há um efeito sazonal na produção espermática, apesar das diferenças pontuais encontradas em alguns parâmetros analisados. Em mamíferos que apresentam um padrão reprodutivo sazonal, normalmente o período reprodutivo está relacionado à época de nascimento dos filhotes (época de boa oferta de alimento), considerando a duração da gestação. No entanto, não se sabe ao certo a duração da gestação das espécies de morcego estudadas. Informações gerais dizem que a gestação em morcegos pode variar entre quarenta dias a seis meses dependendo da espécie, conforme citado pelo Natural History Museum (em: <http://nhm.ac.uk/nature-online/life/mammals/bats/session5/index.html> - acesso em: 11/03/2015). Existem também relatos de que as fêmeas de morcegos possuem capacidade de armazenar espermatozoides por períodos que variam entre dezesseis a duzentos dias (RACEY, 1979). Neste sentido, é importante estudar mais a fisiologia reprodutiva das fêmeas para um maior conhecimento dos padrões reprodutivos encontrados em cada espécie.

Os espermatozoides das quatro espécies estudadas apresentaram tamanhos semelhantes. Em *S. liliium* o tamanho médio foi de 4,6 μ m para a cabeça, 9,5 μ m para a peça intermediária e 54,0 μ m para a cauda. Outro estudo com *S. liliium* coletados no México obteve valores bem diferentes do nosso trabalho. Neste estudo os animais apresentaram valores de 7,01 μ m para a cabeça, 20,33 μ m para a peça intermediária e 70,5 μ m para a cauda (ÁLVAREZ-GUERRERO et al., 2014). Esta diferença é de difícil explicação fisiológica, e a única diferença de metodologia entre o nosso trabalho e o de Álvarez-Guerrero et al. (2014) é que estes autores utilizaram microscopia de luz para fazer as medições e nós utilizados a MEV.

A presença de gota citoplasmática na peça intermediária foi um achado comum em nosso estudo, nas quatro espécies avaliadas. Álvarez-Guerrero e colaboradores (2014) também notaram a presença desta gota citoplasmática na peça intermediária dos espermatozoides dos morcegos das espécies *A. jamicensis* e *S. liliium*. A presença desta gota vem sendo relacionada ao espermatozoide imaturo, e pode estar relacionada a problemas de fertilidade quando em grande quantidade (acima de 30% em humanos) (MENKVELD, 2010).

Em relação ao formato dos espermatozoides, Beguelini e colaboradores (2011) observaram através da microscopia eletrônica de transmissão, que os espermatozoides do *P. lineatus* possuem uma cabeça pequena e compacta, com um formato em seta. Já Álvarez-Guerrero e colaboradores (2014) analisaram os espermatozoides com as técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, e verificaram que tanto o *A. planirostris* como o *S. liliium* apresentam a cabeça dos espermatozoides achatada e arredondada. Em nosso estudo através da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que o formato da cabeça de três das espécies estudadas é arredondado, com a exceção do *A. lituratus*, que é em formato de seta. A microscopia eletrônica de transmissão permite uma análise detalhada da ultraestrutura dos espermatozoides, e pode inclusive ser muito importante para estudos filogenéticos (ALBANO et al., 2012; VIEIRA et al., 2007). No entanto, para a finalidade de caracterizar o formato dos espermatozoides, principalmente a cabeça, a microscopia eletrônica de transmissão pode induzir a percepções errôneas devido ao posicionamento do corte realizado no material.

8 CONCLUSÃO

Este trabalho descreveu e comparou as características morfológicas e morfométricas dos testículos de morcegos das espécies *A. lituratus*, *P. lineatus*, *S. lilium* e *C. perspicillata*, coletados na região de cerrado do DF. Os resultados permitem concluir que:

- Há diferença entre as espécies estudadas com relação ao peso corporal, peso e comprimento de testículo e parâmetros microscópicos dos túbulos seminíferos;
- Não há sazonalidade reprodutiva para as espécies *A. lituratus*, *P. lineatus*, *S. lilium* e *C. perspicillata*, pelo menos em relação aos machos e nas condições do Distrito Federal;
- Os espermatozoides das quatro espécies são semelhantes em tamanho e formato, com exceção do formato da cabeça em seta para a espécie *A. lituratus*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L.M.S. & ZORTÉA, M. **A diversidade de morcegos conhecida para o Cerrado.** In II Simpósio Internacional de Savanas Tropicais. ParlaMundi, Brasília, Brasil, 2008.
- AMANN, R.P. **The Cycle of the Seminiferous Review Epithelium in Humans: A Need to Revisit?** Journal of Andrology. 29(5), 2008.
- ALBANO, V; BAO, S.N; LINO-NETO, J. **Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* Laporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae).** Acta Zoologica (Stockholm), 93: 239–244, 2012.
- ÁLVAREZ-GUERRERO, A; MEDRANO, A; MORENO-MENDOZA, N. **Characterization of gametes in two phyllostomid bat species: *Artibeus jamaicensis* and *Sturnira lilium*.** Animal Reproduction Science, 145: 170-181, 2014.
- BARDIN, C.W. **Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man.** Em: The Leydig cell. pp. 31-42, 1996.
- BARROS, M.S; MORAIS, D.B; ARAUJO, 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 Biology, 73(3): 629-635, 2013.
- BARROS, R.S.M; BISAGGIO, E.L; BORGES, R.C. **Morcegos (mammalia, chiroptera) em fragmentos florestais urbanos no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Sudeste do Brasil.** Biota Neotropica, 6(1), 2006.
- BEDFORD, J.M. **Puzzles of mammalian fertilization – and beyond.** The International Developmental Biology, 52: 415-426, 2008.
- 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, 270: 943-953, 2009.
- 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 bat *Eumops glaucinus* and *Molossus molossus* (Chiroptera: molossidae).** Chiroptera Neotropical 16(2): 769-779, 2010.
- BEGUELINI, M.R; PUGA, C.C.I; TABOGA, S.R; MORIELLE-VERSUTE, E. **Ultrastructure of spermatogenesis in the White-line broad-nosed bat, *Platyrrhinus lineatus* (Chiroptera: Phyllostomidae).** Micron 42:586-599, 2011.
- BEGUELINI, M.R; TABOGA, S.R; MORIELLE-VERSUTE, E. **Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in Palla's Mastiff Bat, *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae).** Microscopy Research and Technique 45:856-868, 2012.

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, 185: 80-89, 2013a.

BEGUELINI, M.R; PUGA, C.C.I; MARTINS, F.F; BETOLI, A.H.S; TABOGA, A.R; MORIELLE-VERSUTE, E. **Morphological variation of primary reproductive structures in males of five families of neotropical bats.** The anatomical record, 296: 156-167, 2013b.

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, 76: 1035-1049, 2013c.

BERNE, R. B, LEVY, M. N. **Tratado De Fisiologia Humana.** 4 Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2000.

BERNDTSON, W.E. **Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review.** Journal of Animal Science. 44(5): 818-833, 1977.

BRONSON, F.H. **Mammalian reproduction: An ecological perspective.** Biology of Reproduction, 32, 1-26, 1985.

CLARKE, J.R. **Physiological problems of seasonal breeding in eutherian mammals.** Oxford Reviews of Reproductive Biology, 3: 244-312, 1981.

COHEN, P.E; POLLACK, S.E; POLLARD, J.W. **Genetic Analysis of Chromosome Pairing, Recombination, and Cell Cycle Control during First Meiotic Prophase in Mammals.** Endocrine Reviews. 27(4): 398–426, 2006.

DE ROOIJ, D.G. **Stem cells in the testis.** International Journal of Experimental Pathology. 70: 67-80, 1998.

DE ROIJ, D.G & RUSSEL, L.D. **All you want to know about spermatogonia but were afraid to ask.** Journal of Andrology. 21(6): 776-798, 2000.

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

DWEYR, P.D. **Latitude and breeding season in a polyestrus species of *Myotis*.** Journal of Mammalogy, 51(2): 405-410, 1970.

FENTON, M.B. **Bats.** Facts On File. 207p, 1992.

FLEMING, T.H. **The short-tailed fruit bat: A study in plant-animal interactions.** The University of Chicago Press. 1988.

FLEMING, T.H; HOOPER, E.T; WILSON, D.E. **Three central american bat communities: structure, reproductive cycles and movement patterns.** Ecology, 53(4): 555-569, 1972.

FRANÇA, L.R. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau.** Tese (Doutorado), Universidade Federal de Minas Gerais, 180p, 1991.

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

GAISLER, J. **The r-K selection model and life history strategies in bats.** Em: *European Bat Research*, pp 117-124, 1989.

GARTNER, L.P; HIATT, J.L. **Color atlas and text of histology.** Edição 6, 2014.

GUYTON, A.C; HALL, J.E. **Textbook of medical physiology.** 11^a edição, 2006.

HAPPOLD, D.C.D; HAPPOLD, M. **Reproduction of Angola free-tailed bats (*Tadarida condylura*) and little free-tailed bats (*Tadarida pumila*) in Malawi (Central Africa) and elsewhere in Africa.** *Journal of Reproduction and Fertility*, 85: 133-149, 1990.

HEIDEMAN, P.D. **Environmental regulation of reproduction.** Em: *Reproductive Biology of Bats.* Capítulo 11: 469-499, 2000.

HERMO, L; PELLETIER, R.M; CYR, D.G; SMITH, C.E. **Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 1: Background to Spermatogenesis, Spermatogonia, and Spermatocytes.** *Microscopy Research and Technique.* 73 :243–278, 2010.

HESS, R.A; FRANÇA, L.R. **Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium.** Em: Cheng CY, editor. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis.* Landes Bioscience/Springer Science; pp. 186–211, 2008.

HILL, J.E; SMITH, J.D. **Bats a natural history.** University of Texas. 1988.

JOHNSON, L; VARNER, D.D; ROBERTS, M.E; SMITH, T,L; KEILLOR, G.E; SCRUTCHFIELD, W.L. **Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach.** *Animal Reproduction Science.* 60-61: 471–480, 2000.

JOLLY, S.E; BLACKSHAW, A.W. **Testicular migration, spermatogenesis, temperature regulation and environment of the sheath-tail bat, *Taphozous georgianus*.** *Journal of Reproduction and Fertility*, 84: 447-455, 1988.

KARL, J., CAPEL, B. **Sertoli cells of mouse testis originate from the coelomic epithelium.** *Developmental Biology.* 203: 323-333, 1998.

KLINK, C.A; MACHADO, R.B. **A conservação do cerrado brasileiro.** *Megadiversidade*, 1(1): 147-155, 2005.

KRUTZSCH, P.H. **Anatomy, physiology and ciclicity of the male reproductive tract.** Em: *Reproductive Biology of Bats.* Capítulo 9: 91-155, 2000.

KRUTZSCH, P.H; CRICHTON, E.G. **Reproductive biology of the male little mastiff bat *Mormopterus planiceps* (Chiroptera: Molossidae) in Puerto Rico.** Journal of Zoology, 207: 137-150, 1987.

McWILLIAM, A.N. **The reproductive and social biology of *Coleura afra* in a seasonal environment.** Em: Recent advances in the study of bats. 1987.

MENKVELD, R. **Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO laboratory manual of the examination and processing of human semen.** Asian Journal of Andology, 14: 47-58, 2010.

MILLER, G.T. **Living in the Environment: Principles, Connections, and Solutions.** 15 ed. 2006.

MORAIS, D.B. **Morfologia e morfometria testicular em morcego insetívoro (*Molossus, molossus*, Pallas, 1776 Chiroptera: Molossidae).** Tese de Doutorado para a Universidade Federal de Viçosa, 2008.

MORAIS, D.B; CUPERTINO, M.C; GOULART, L.S; FREITAS, K.M; FREITAS, M.B.D; PAULA, T.A.R; MATTA. S.L.P. **Histomorphometric evaluation of the *Molossus molossus* (Chiroptera, Molossidae) testis: the tubular compartment and indices of sperm production.** Animal Reproduction Science, 140: 268-278, 2013a.

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, 76: 94-101, 2013b.

MORAIS, D.B; BARROS, M; 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, 147(3-4): 180-186, 2014.

MORI, H. & CHRISTENSEN, A.K. **Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis.** Journal of cell Biology. 84: 340-354, 1980.

MRUK, D.D. & CHENG, C.Y. **Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis.** Endocrine Reviews. 25(5): 747–806, 2004.

MYERS, N; MITTERMEIER, R.A; MITTERMEIER, C.G; FONSECA, G.A.B. ; KENT, J. **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** Nature, 403:853-858, 2000.

NEILL, J.D. **Knobil and Neill's physiology of reproduction.** 3ª Edição, 2006.

NEUWEILER, G. **The biology of bats.** Oxford University, 310p, 2000.

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

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

ORTÊNCIO FILHO, H; REIS, N.R; MINTE=VERA, C.V. **Time and seasonal patterns of activity of phyllostomid in fragments of a stationnal semidecidual fortes from the Upper Paraná River, Southern Brazil.** *Brazilian Journal of Biology*, 70(4): 937-945, 2010.

PACHECO, S.M; SODRÉ, M; GAMA, A.R; BREDT, A; CAVALLINI, E.M; MARQUES, R.V; GUIMARÃES, M.M; BIANCONI, G. **Morcegos urbanos: status do conhecimento e plano de ação para a conservação no Brasil.** *Chiroptera Neotropical*, 16(1): 629-947, 2010.

PHILLIPS, B.T; GASSEI, K; ORWIG, K.E. **Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 365: 1663-1678, 2010.

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

RACEY, P.A. **The prolonged storage and survival of spermatozoa in Chiroptera.** *Journal of Reproduction and Fertility*, 56: 397-402, 1979.

RACEY, P.A. **Ecology of Bat reproduction.** Em: *Ecology of Bats* (Kunz, T.H.). pp. 51-104, 1982.

RACEY, P.A; ENTWISTLE A.C. **Life-history and reproductive strategies of bats.** Em: *Reproductive Biology of Bats.* Capítulo 9: 363-414, 2000.

RACEY, P.A; TAM, W.H. **Reproduction in male *Pipistrellus pipistrellus* (Mammalia: Chiroptera).** *Journal of Zoology*, 172: 101-122, 1974.

REIS, N.R; PERACCHI, A.L; ONUKI, M.K. **Quiróperos de Londrina, Paraná, Brasil (Mammalia, Chiroptera).** *Revista Brasileira de Zoologia*, 10(3): 371-381, 1993.

ROSS, M.H; PAWLINA, W. **Ross histology text and atlas.** Edição 6, 2011.

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

SAIDAPUR, S.K; PATIL, S.B. **Kinetics of spermatogenesis in megachiropteran bat, *Rousettus leschenaulti* (Desmarset): seminiferous epithelial cycle, frequency of stages, spermatogonial renewal and germ cell degeneration.** *Indian Journal of experimental biology*. 30(11): 1037-1044, 1992.

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

SEELEY, R.R; VANPUTTE, C; REGAN, J; RUSSO, A. **Seeley's anatomy and physiology.** Edição 10, 2014.

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

SETCHELL, B.P. **Blood-Testis Barrier, Junctional and Transport Proteins and Spermatogenesis.** Em: Cheng CY, editor. **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis.** Landes Bioscience/Springer Science; pp. 186–211, 2008.

SHARPE, R.M. **Regulation of spermatogenesis.** Em: **The physiology of reproduction.** pp.1363-1434, 1994.

SHIER, D; BUTLER, J; LEWIS, R. **Hole's human anatomy and physiology.** Edição 11, 2007.

STANFIELD, C.L. **Principles of human physiology.** Edição 5, 2013.

VAN STRAATEN, H.W.M; WENSING, C.J.G. **Leydig Cell Development in the Testis of the Pig.** *Biology of Reproduction.* 18: 86-93, 1978.

VIEIRA, G.H.C; CUNHA, L.D; SCHELTINGA, D.M; GLAW, F; COLLI, G.R; BAO, S.N. **Sperm ultrastructure of hoplocercid and oplurid lizards (Sauropsida, Squamata, Iguania) and the phylogeny of Iguania.** *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research,* 45(3): 230-241, 2007.

VOIGT, C.C; SCHNEEBERGER, K; VOIGT-HEUCKE, S.L; LEWANZIK, D. **Rain increases the energy cost of bat flight.** *Biology Letters,* 7: 793-795, 2011.