

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E
FUNCIONAL

**ESTUDO DO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO NOS MORCEGOS
HEMATÓFAGOS *Desmodus rotundus* E *Diphylla ecaudata*
(CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE)**

SORAIA FONSECA MARINHO DA SILVA

Natal-RN

2018

Estudo do processo espermatogênico nos morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* e *Diphylla ecaudata* (Chiroptera: Phyllostomidae)

SORAIA FONSECA MARINHO DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biologia Estrutural e Funcional.

Orientadora: Prof^a Dr^a Danielle Barbosa
Morais

Natal-RN

2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson -Centro de
Biociências - CB

Silva, Soraia Fonseca Marinho da.

Estudo do processo espermatogênico nos morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* e *Diphylla ecaudata* (Chiroptera: Phyllostomidae) / Soraia Fonseca Marinho da Silva. - Natal, 2018.

75 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Barbosa Morais.

1. Morcegos vampiros - Dissertação. 2. Biologia reprodutiva - Dissertação. 3. Morfometria testicular - Dissertação. I. Morais, Danielle Barbosa. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 599.424

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional, pela oportunidade de crescimento.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante todo o Mestrado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Danielle Barbosa Morais, por acreditar e orientar esse trabalho com sabedoria diante dos inúmeros desafios que foram apresentados ao longo dessa trajetória.

Ao professor Dr. Sérgio Luis Pinto da Matta e à doutoranda Fernanda Carolina Ribeiro Dias, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), pelo apoio no processamento histológico em historesina.

À professora Dra. Sônia Nair Bão e à técnica Ingrid Gracielle Martins da Silva, da Universidade de Brasília (UnB), pelo apoio na realização da microscopia eletrônica de transmissão.

Aos funcionários do Laboratório de Técnicas Histológicas da UFRN, pelo suporte e apoio para realização deste trabalho.

Aos biólogos Eugenia Cordero Schmidt e Juan Carlos Vargas Mena, e ao professor Dr. Eduardo Martins Venticinque, do Departamento de Ecologia da UFRN, que foram essenciais para que as coletas dos animais acontecessem. MUITÍSSIMO obrigada pela parceria e por todos os ensinamentos em campo!

Ao Prof. Dr. Ruthnaldo Rodrigues pelo auxílio na realização das análises estatísticas deste trabalho.

À Eduarda e ao Carlos pelo auxílio nas coletas dos tecidos.

À Laryssa por ter contribuído diretamente com minhas análises.

Ao meu companheiro de todas as horas Danilo, que foi meu porto seguro e maior incentivador nessa batalha, que me deu suporte nos momentos mais difíceis. Muito obrigada por embarcar comigo nessa jornada.

Aos meus queridos pais, Antônia e Sinval por todo apoio durante essa fase e por entender minha ausência em muitos momentos. Cada ida em casa e cada conversa nossa recarregava minhas energias. Eu não teria sido tão forte sem vocês.

Aos meus irmãos, Samuel, Samyr e Sávia e a toda minha família pelo incentivo e torcida.

A Deus.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Características gerais da ordem Chiroptera.....	5
2.2. Reprodução em morcegos	6
3.OBJETIVOS.....	9
3.1 Objetivo geral.....	9
3.2 Objetivos específicos	9
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
Artigo 1.....	13
Avaliação sazonal da espermatogênese do morcego hematófago <i>Desmodus rotundus</i>	13
Resumo	13
1. Introdução.....	14
2. Materiais e métodos.....	15
2.1 Área de estudo e coleta dos animais	15
2.2 Processamento histológico.....	15
2.3 Morfometria testicular.....	16
2.4 Quantificação do rendimento espermatogênico	18
2.5. Análise Estatística	19
3. Resultados	19
3.1 Biometria e morfometria dos túbulos seminíferos	19
3.2 Quantificação do rendimento espermatogênico	21
3.3 Morfometria e morfologia do compartimento intertubular	24
3.4 Imunohistoquímica.....	27
4. Discussão.....	29
4.1 Biometria e morfometria dos túbulos seminíferos	29
4.2 Quantificação do rendimento espermatogênico	30
4.3 Morfometria e morfologia do compartimento intertubular	31
4.4 Ultraestrutura e imunohistoquímica.....	32
5. Referências bibliográficas	35
Artigo 2.....	41
Caracterização testicular e espermatogênese do morcego hematófago <i>Diphylla ecaudata</i>	41
Resumo	41

1. Introdução.....	42
2. Materiais e métodos.....	43
2.1 Área de estudo e coleta dos animais	43
2.2 Processamento histológico.....	43
2.3 Morfometria testicular.....	44
2.4 Caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero	46
2.5 Quantificação do rendimento espermatogênico	46
3. Resultados	47
3.1 Biometria e morfometria dos túbulos seminíferos	47
3.2 Estádios do ciclo do epitélio seminífero	48
3.3 Quantificação do rendimento espermatogênico	52
3.4 Morfometria e morfologia do compartimento intertubular	53
3.5 Imunohistoquímica.....	54
4. Discussão.....	55
4.1 Biometria e morfometria dos túbulos seminíferos	56
4.2 Estádios do ciclo do epitélio seminífero	57
4.3 Quantificação do rendimento espermatogênico	58
4.4 Morfometria e morfologia do compartimento intertubular	59
4.5 Imunohistoquímica.....	60
5. Conclusões	61
6. Referências bibliográficas	62
7. CONCLUSOES GERAIS	70

RESUMO

Os morcegos hematófagos constituem os únicos mamíferos que se alimentam exclusivamente do sangue de mamíferos ou aves. Devido a esta particularidade e sua relação com a transmissão do vírus da raiva, despertam grande curiosidade, sendo necessário o desenvolvimento de medidas conservacionistas que permitam seu controle racional; o que requer o conhecimento de sua reprodução. Objetivamos, portanto, descrever a atividade testicular e a espermatogênese das espécies *Desmodus rotundus* e *Diphylla ecaudata*. Após eutanásia, seus testículos foram processados histologicamente para inclusão em historesina para análises morfológicas e morfométricas sob microscopia de luz, em resina Spurr para análise da ultraestrutura celular sob microscopia eletrônica de transmissão, bem como em parafina histológica para análise imuno-histoquímica da expressão de receptores para andrógeno, aromatase, FGF2 e BCL-2. *D. rotundus* apresentou percentual de epitélio seminífero, número de células de Leydig por grama de testículo e população de células de Sertoli e de espermatogônias do tipo A significativamente maiores na estação chuvosa, enquanto o índice mitótico, índice de células de Sertoli e rendimento geral da espermatogênese foram maiores na estação seca. *D. ecaudata* apresentou índice gonadossomático de 0,49% e comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo de 32,20 m. As fases pré-meiótica, meiótica e pós-meiótica representaram, respectivamente, 56,20%, 9,30% e 34,50% do seu ciclo do epitélio seminífero. A ultraestrutura da espermatogênese de ambas as espécies foi semelhante ao descrito nos demais mamíferos, e o perforatorium de acordo com nossas observações está ausente em seus espermatozoides. A análise imunohistoquímica revelou atividade da enzima aromatase nas células de Sertoli, de Leydig, espermatócitos e espermátides, e a presença de receptores de andrógeno nas células de Sertoli e de Leydig. A atividade do FGF2 foi mais evidente nos espermatócitos primários em zigóteno e em paquíteno, bem como em espermatócitos secundários e espermátides. Já a atividade da proteína pré-apoptótica BCL-2 foi mais evidente nos espermatócitos primários em paquíteno e espermátides arredondadas. Conclui-se que *D. rotundus* e *D. ecaudata* apresentaram padrão testicular semelhante ao de outros mamíferos, e características comuns às descritas em outras espécies de morcegos. O estudo sazonal da espermatogênese de *D. rotundus* sugere uma maior produção de espermatozoides na estação chuvosa na Caatinga nordestina. Este estudo constitui ainda o primeiro passo para o conhecimento da reprodução de *D. ecaudata*, sendo esta a primeira descrição acerca de sua espermatogênese.

Palavras-chave: Morcegos vampiros, Biologia reprodutiva, Morfometria testicular, Espermatogênese, Imunohistoquímica.

ABSTRACT

The vampire bats are the only mammals that feeds exclusively on the blood of mammals or birds. Due to this peculiarity, and your relationship with the transmission of the rabies viruses, they arouse great curiosities, being necessary the development of conservation managements that will enable the rational control of these species. To this end, it is essential that their reproductive cycles are known. Therefore, we aimed to describe the testicular activity of the species *Desmodus rotundus* and *Diphylla ecaudata*. After euthanasia procedures, its testicles were processed histologically for inclusion in historesin for morphological and morphometric analyses under light microscopy, Spurr's resin for analysis of cellular ultrastructure under transmission microscopy electron, as well in histological paraffin for immunohistochemical analysis of expression of androgen receptors, aromatase, FGF2 and BCL-2. *D. rotundus* presented the percentage of seminiferous epithelium, number of Leydig cells *per* gram of testicle, and population of Sertoli cells and of A-type spermatogonia significantly higher in the rainy season, while the percentage of lumen, mitotic index, support capacity performed by Sertoli cell and spermatogenic yield were higher in the dry season. *D. ecaudata* presented gonadosomatic index of 0.49% and length of seminiferous tubules *per* gram of testis 32.20 m. Pre-meiotic, meiotic and post-meiotic phases accounted for, respectively, 56.20%, 9.30% and 34.50% of the seminiferous epithelium cycle of this species. Ultrastructure of spermatogenesis of both species were similar to that described in other mammals, and the perforatorium seems to be absent in their sperm. The immunohistochemical analysis revealed activity of the enzyme aromatase in Sertoli cells, Leydig cells, spermatocytes and spermatids, and the presence of androgen receptors in the cells of Sertoli and Leydig. FGF2 activity was more evident in the primary spermatocytes in zygotene and pachytene, as well in secondary spermatocytes and spermatids. On the other hand, the activity of the protein BCL-2 was more evident in the primary spermatocytes in pachytene and round spermatids. In *D. rotundus*, while the activity of aromatase, BCL-2 and androgen receptors were higher in the dry season, FGF2 activity was higher in the rainy season. It can be concluded that *D. rotundus* and *D. ecaudata* presented testicular pattern similar to that of other mammals, and characteristics that are common to those described in other bats species. The seasonal study of spermatogenesis in *D. rotundus* suggests a greater production of sperm in the rainy season at the Caatinga biome. This study is also the first step toward the knowledge of the reproduction of *D. ecaudata*, being this the first description about its spermatogenesis.

Keywords: Vampire bats, Reproductive biology, Testicular morphometry, Spermatogenesis, Immunohistochemical.

1. INTRODUÇÃO

Os morcegos são mamíferos pertencentes à ordem Chiroptera. Esta é a segunda maior ordem de mamíferos do mundo considerando-se a riqueza de espécies, sendo ultrapassada apenas pela ordem Rodentia (Simmons, 2005; Reis et al., 2007). São encontrados no Brasil nove famílias, 64 gêneros e 172 espécies (Reis et al., 2011). A ocorrência da família Phyllostomidae é restrita à região neotropical, sendo esta família formada por espécies que apresentam distintos hábitos alimentares, como insetivoria, carnivoria, frugivoria, nectarivoria, onivoria e hematofagia (Peracchi et al., 2007). A subfamília Desmodontinae é restrita ao continente americano, sendo formada por três espécies hematófagas, sendo elas *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi* (Reis et al., 2007).

Desmodus rotundus (Fig. 1a) exibe ampla distribuição geográfica e não se encontra ameaçado de extinção, ocorre desde o México até a Argentina, Chile, Uruguai e Brasil (Peracchi et al., 2007; IUCN, 2016). A única espécie que tem a dieta especializada em sangue de mamíferos é *Desmodus rotundus*, enquanto que *Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata* (Fig. 1b) alimentam-se preferencialmente de sangue de aves (Reis et al., 2007; Mayen, 2003). A partir da amplificação por PCR de fragmentos de DNA nas fezes de *D. ecaudata*, foi revelado o consumo regular de sangue de frango e sangue humano, sendo este último uma nova presa para esta espécie. O registro de sangue humano e a ausência de sangue de espécies de aves nativas pode ter sido ocasionada por uma baixa disponibilidade de aves selvagens na área do estudo, refletindo o imenso impacto dos efeitos antropogênicos no equilíbrio ecológico e na biodiversidade (Ito et al., 2016).

As modificações ambientais têm causado alterações na biodiversidade e destruição do habitat natural das espécies, aumentando assim o contato entre a vida selvagem e a população humana e, portanto, o risco de transmissão de zoonoses (Afelt et al., 2018). A degradação do habitat também pode afetar negativamente a fisiologia e a saúde das espécies de vida selvagem, o que pode eventualmente levar a uma maior susceptibilidade a agentes infecciosos e/ou aumento de patógenos causadores de doenças infecciosas emergentes (DIE's). Os morcegos podem hospedar vírus intimamente relacionados com DIE's importantes (Seltmann et al., 2017), sendo a raiva a principal delas (Simmons, 2005; Reis et al., 2007).



Figura 1. Espécimes de *Desmodus rotundus* (a) e *Diphylla ecaudata* (b) coletados em Lajes-RN.

É interessante notar que a prevalência do vírus da raiva entre os morcegos é bem menor do que se pensa, de modo que apenas cerca de 5% destes animais usualmente são positivos para o vírus (Hoffmaster et al., 2016). Foi evidenciado que a exposição ao vírus da raiva associada aos morcegos é equivalente à exposição relacionada aos cães; contudo apenas os morcegos têm sido considerados vetores de alto risco (Olnhausen e Gannon, 2004). Existe ainda um equívoco por grande parte da população ao se considerar que todos os morcegos transmitem o vírus da raiva, quando na verdade apenas 3 dentre as mais de 1.100 espécies descritas são hematófagas. Assim, muitos morcegos frugívoros e insetívoros são erroneamente exterminados, levando a prejuízos consideráveis aos ecossistemas. Todas as espécies têm sua importância pensando no equilíbrio ecológico e na biodiversidade, sobretudo frente à grande riqueza de espécies encontrada dentro da ordem Chiroptera. Assim, medidas que visam o controle populacional devem ser aliadas a medidas conservacionistas, visando a preservação das espécies hematófagas. Para tal é fundamental que seu ciclo reprodutivo seja conhecido, visando assim o manejo racional da espécie.

Com base em sua ampla distribuição mundial, diversidade e importância dos pontos de vista ecológico, econômico e médico-sanitário, os morcegos são alvos de intensos estudos sob múltiplos enfoques. No entanto, ainda existe uma carência de conhecimentos acerca de aspectos ecológicos, fisiológicos e sobretudo reprodutivos. São escassas as informações acerca das características do sistema reprodutor, com destaque para as espécies hematófagas, principalmente no que se refere aos seus padrões de espermatogênese e controle da reprodução.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características gerais da ordem Chiroptera

A morfologia dos membros torácicos dos morcegos é inteiramente adaptada para permitir o voo verdadeiro, uma das principais características desse grupo. Os morcegos utilizam a ecolocalização durante o voo para encontrar abrigo ou forragear. Usualmente utilizam como refúgio cavernas, fendas de rochas, minas, árvores, cupinzeiros e construções. Nesses abrigos podem formar colônias com muitos ou poucos indivíduos, coabitando frequentemente com outras espécies. Grande parte dos morcegos saem de seus refúgios ao entardecer para forragear durante a noite, retornando após algumas horas ou ao amanhecer (Reis et al., 2011).

A aptidão de voar permitiu aos morcegos explorar o meio aéreo, onde o número de predadores e competidores é relativamente menor, o que lhes permitiu uma vasta distribuição e dispersão, assim como proporcionou a possibilidade de utilizar diversos tipos de abrigos e alimentos (Marchesin e Morielle-Versute, 2002). Os morcegos destacam-se entre os mamíferos pela sua diversidade de hábitos alimentares, onde a vasta abundância de alimentos utilizados varia de frutos, néctar, pólen, partes florais, folhas, insetos, outros artrópodes, pequenos peixes, anfíbios, lagartos, aves e pequenos mamíferos até sangue (Fenton, 1992).

Os morcegos hematófagos não conseguem resistir por mais de dois dias sem se alimentar, e por possuir uma alta especialização alimentar, algumas características são adaptadas para o consumo de sangue. Por exemplo, possuem sensores de calor, a partir de pequenas cavidades termicamente isoladas localizadas no focinho, que o ajudam a detectar pontos quentes, onde os vasos sanguíneos estão mais próximos da superfície da pele, permitindo a seleção correta do lugar para a mordida (Greenhall et al., 1983; Sodré, 2010). A regurgitação pode estar relacionada ao aumento de chances de sobrevivência de animais que não saíram para se alimentar, o que se relaciona à sua grande sensibilidade à privação alimentar (Delpietro e Russo, 2002).

Os abrigos utilizados pelos morcegos hematófagos podem ser identificados pela presença de fezes pastosas de coloração castanho avermelhada, que depois escurecem, e possuem um forte odor característico, misturado com odor amoniacal. Esse cheiro pode ser sentido à distância, facilitando a localização dos abrigos (Trajano, 1984). Os abrigos constituem usualmente cavernas, fendas em formações rochosas e ocos de árvores, construções abandonadas, pontes e bueiros (Gomes e Uieda, 2004), e podem ser ocupados por outras

espécies de morcegos. No entanto as colônias não se misturam, estando localizadas em diferentes áreas no mesmo abrigo (Trajano, 1984).

Esta característica de ocupação de diferentes áreas no abrigo permite a coexistência das três espécies de morcegos hematófagos, o que provavelmente também ocorre devido à divisão de recursos alimentares (Sodré, 2010). O morcego hematófago sai para forragear à noite preferencialmente depois de escurecer completamente, evitando as horas com a luz da lua. Usualmente têm preferência pelas primeiras horas da noite (Trajano, 1984). Contudo, em condições ambientais favoráveis, a atividade alimentar destes animais pode ocorrer durante a noite, iniciando aproximadamente uma a duas horas após o pôr-do-sol e finalizando uma hora antes da alvorada (Uieda, 1992). Os morcegos distribuem o tempo durante a noite entre as atividades de alimentação, exploração do habitat, conhecimento de fontes potenciais de alimentos e de abrigo, e também para interações sociais e reprodutivas (Uieda, 1996).

D. rotundus apresenta grande importância epidemiológica nas áreas tropicais e subtropicais da América Latina, por ser um dos reservatórios silvestres do vírus da raiva, que pode ser transmitida pelo contato com a saliva contaminada de morcegos infectados para animais domésticos e humanos (Langoni et al., 2008). A predação crescente de herbívoros domésticos por *D. rotundus* foi facilitada devido a ampliação de áreas de desmatamento, expansão das áreas de criação de gado, migração do homem para áreas inexploradas e abandono de abrigos artificiais como casas, túneis e minas (Kotait et al., 2007; Schneider et al., 2009). Assim como alguns países da América Latina, o Brasil sofre com prejuízos econômicos causados pela infecção da raiva em herbívoros, com a morte de até 40.000 cabeças de gado por ano (Kotait et al., 2007).

2.2. Reprodução em morcegos

A estrutura macroscópica e microscópica dos testículos e demais componentes do sistema reprodutor masculino dos morcegos segue o padrão descrito para os demais mamíferos (Crichton e Krutzsch, 2000). Apesar de quase 25% de todos os mamíferos do mundo serem morcegos, sabemos muito pouco sobre como os fatores abióticos e bióticos interagem para regular os padrões anuais da reprodução neste grupo (Crichton e Krutzsch, 2000). Sabe-se que seu ciclo reprodutivo está intimamente associado à estação chuvosa em regiões tropicais. Isto porque a temperatura e a precipitação pluviométrica, quando associadas, influenciam diretamente a disponibilidade de alimento, interferindo assim no ciclo reprodutivo dos morcegos (Fleming et al., 1972; Racey et al., 1982).

Os morcegos apresentam padrões reprodutivos bem variáveis, sendo encontradas espécies que apresentam desde a monoestria sazonal à poliestria não sazonal. Geralmente são poliétricos, gerando apenas um filhote por gestação, todavia existem espécies poliétricas capazes de gerar até cinco filhotes numa única gestação (Reis et al., 2011). A gestação dura em média 44 dias e o nascimento dos filhotes ocorre preferencialmente em épocas de abundância de recursos alimentares (Reis et al., 2007).

Desmodus rotundus é considerada uma espécie poliétrica onde as fêmeas ciclam ao longo do ano sem período definido de reprodução (Alencar et al., 1994; Crichton e Krutzsch, 2000). Embora não haja um período de reprodução definido, os filhotes nascem geralmente na estação quente e chuvosa (Gomes e Uieda, 2004). O período gestacional é de sete meses, nascendo geralmente um filhote e raramente gêmeos (Reis et al., 2007). O nascimento é seguido de um longo período com alto grau de investimento parental, por aproximadamente um ano. Durante o primeiro mês os filhotes somente são amamentados, e em seguida, o sangue é introduzido via regurgitação pelas mães. Ao fim do quarto mês os animais já acompanham a mãe até a presa para aprenderem a se alimentar (Greenhall, 1970).

Geralmente as colônias de *D. rotundus* são constituídas essencialmente por fêmeas e seus filhotes, e por um macho dominante. Existem ainda indivíduos isolados e pequenos grupos de machos solteiros difundidos pelo refúgio, à espera de uma ocasião para copular com as fêmeas do agrupamento principal (Gomes e Uieda, 2004). Machos de *D. rotundus* em atividade sexual plena foram registrados em todos os períodos do ano (Crichton e Krutzsch, 2000). Machos desta espécie podem ser classificados como sexualmente ativos quando apresentam os testículos no escroto, e sexualmente inativos quando os testículos se localizam na cavidade abdominal (Greenhall, 1970).

Dentre as poucas informações existentes acerca da espermatogênese de *D. rotundus*, foi demonstrado no sudeste do Brasil que este apresentou alto investimento em tecido gonadal e em túbulos seminíferos quando comparado a mamíferos de maior porte. Já as células de Leydig apresentaram distribuição mediana no intertúbulo, quando comparado a outras espécies de morcegos, como *Molossus molossus* e *Sturnira lilium* (Morais et al., 2013; Morais et al., 2014; Morais et al., 2017). Com duração total da espermatogênese estimada em aproximadamente 37 dias e reserva espermática por grama de testículo de aproximadamente 71×10^7 espermatozoides, estes animais exibiram uma alta produção espermática quando comparado a outros mamíferos, o que é comumente observado em espécies com sistema de acasalamento promíscuo (Morais et al., 2017).

O conhecimento acerca da reprodução de *D. ecaudata*, conhecido como morcego vampiro de patas peludas, por possuir pelos compridos nos membros pélvicos (Peracchi et al., 2007) é bem mais escasso. Sabe-se que apresentam um período de gestação de aproximadamente 5,5 meses e os nascimentos ocorrem durante a primavera e verão, o que coincide com o nascimento das aves domésticas e nativas na América Latina. Nasce geralmente um filhote por gestação e ocasionalmente podem ser gerados dois descendentes por ano. A prole permanece por cerca de 220 dias sob os cuidados da mãe e os indivíduos tornam-se sexualmente ativa a partir dos 9 meses de idade (Delpietro e Russo, 2002; Scheffer, 2015). Comportamentos altruístas foram observados em cativeiro, como a fêmea compartilhar alimentos por regurgitação com os filhotes (Delpietro e Russo, 2002). Não foram encontrados na literatura informações acerca da biologia reprodutiva dos machos desta espécie.

Conhecermos a função testicular através de medidas morfométricas, incorporadas à análise morfológica das gônadas, nos possibilita inferir sobre a dinâmica gonadal e conseqüentemente sobre a capacidade reprodutiva de um animal, provendo-nos assim, informações a respeito do seu ciclo reprodutivo e de sua produção espermática, bem como sobre sua variação reprodutiva sazonal (Morais et al., 2013).

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar morfofuncionalmente o processo espermatogênico dos morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* e *Diphylla ecaudata*, através da caracterização histológica e morfométrica dos componentes do parênquima testicular de espécimes coletados no estado do Rio Grande do Norte, a fim de se conhecer sua capacidade reprodutiva.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar morfolologicamente e morfometricamente os testículos das duas espécies;
- Estimar as taxas de produção espermática de *D. rotundus* e de *D. ecaudata*;
- Realizar a caracterização sazonal da espermatogênese de *D. rotundus*;
- Conhecer aspectos da espermatogênese de *D. ecaudata*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFELT, A.; LACROIX, A.; ZAWADZKA-PAWLEWSKA, U.; POKOJSKI, W.; BUCHY, P.; FRUTOS, R. Distribution of bat-borne viruses and environment patterns. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 58, p. 181–191, 2018.
- ALENCAR, A. O.; SILVA, G. A. P.; ARRUDA, M. M.; SOARES, A. J.; GUERRA, D. Q. Aspectos biológicos e ecológicos de *Desmodus rotundus* (Chiroptera) no nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.14, n.4. Rio de Janeiro, p.95-103, 1994.
- CRICHTON, E.G.; KRUTZSCH, P.H. *Reproductive biology of bats*. In: Racey PA, Entwistle AC (eds.), *Life-history and Reproductive Strategies of Bats*. London: [s.n.], 2000.
- DELPIETRO, V. H.A.; RUSSO, R. G. Observations of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) and the hairy-legged vampire bat (*Diphylla ecaudata*) in captivity. *Mammalian Biology*, v. 67, p. 65–78, 2002.
- FENTON, M. B. *Bats*. New York: Facts On File, Inc., 207p., 1992.
- FLEMING, T. H; HOOPER, E T; WILSON, D. E. Three central American bat communities : structure, reproductive cycles and movement patterns. *Ecology*, 1972.
- GOMES, M. N.; UIEDA, W. Abrigos diurnos, composição de colônias, dimorfismo sexual e reprodução do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (E. Geoffroy) (Chiroptera, Phyllostomidae) no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 2004.
- GREENHALL, A. M. The use of a precipitin test to determine host preference of the vampire bats, *Desmodus rotundus* and *Diphylla ecaudata*. *Bijdragen Tot De Dierkunde*, uitgegeven door Kon, v. 40, n. 36-39, 1970.
- GREENHALL, A. M; JOERMANN, G.; SCHMIDT, U. *Desmodus rotundus*. *Mammalian Species*, v. 2002, p. 1-6, 1983.
- HOFFMASTER, E.; VONK, J.; MIES, R. Education to Action: Improving Public Perception of Bats. *Animals : an open access journal from MDPI*, 2016.
- ITO, F.; BERNARD, E.; TORRES, R. A. What is for dinner? First report of human blood in the diet of the hairy-legged vampire bat *Diphylla ecaudata*. *Acta Chiropterologica*, v. 18, n. 2, p. 509–515, 2016.
- IUCN– International Union for Conservation of Nature, 2016. Disponível em <http://www.iucnbsg.org/>. Acesso em janeiro de 2018.

- KOTAIT, I.; CARRIERI, M.L.; CARNIELI JR., P.; CASTILHO, J.G.; OLIVEIRA, R.N.; MACEDO, C.I.; FERREIRA, K.C.S.; ACHKAR, S.M. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. *Boletim Epidemiológico Paulista*, v.4, n.40, 2007.
- LANGONI, H.; SOUZA, L.C.; ZETUN, C.B.; SILVA, T.C.C.; HOFFMANN, J.L.; SILVA, R.C. Serological survey for rabies in serum samples from vampire bats (*Desmodus rotundus*) in Botucatu region, SP, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 14, n. 4, p. 651–659, 2008.
- MAYEN, F. Haematophagous Bats in Brazil, Their Role in Rabies Transmission, Impact on Public Health, Livestock Industry and Alternatives to an Indiscriminate Reduction of Bat Population. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. [S.l: s.n.], 2003.
- MARCHESIN, S.R.C.; MORIELLE-VERSUTE, E. Análise citogenética em espécies de Vespertilionidae dos gêneros *Eptesicus*, *Histiotus*, *Lasiurus* e *Myotis* (Chiroptera, Mammalia). 2002. 98f. Dissertação (Mestrado em Genética) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2002.
- MORAIS, D.B.; BARROS, M.S.; PAULA, T.A.R.; FREITAS, M.B.D.; GOMES, M.L. M.; MATTA, S.L.P. Evaluation of the cell population of the seminiferous epithelium and spermatid indexes of the bat *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae). *PLoS ONE*, v. 9, n. 7, 2014.
- 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*, v. 140, n. 3–4, p. 268–278, 2013.
- MORAIS, D. B.; PUGA, L.C.H.P.; PAULA, T.A.R.; FREITAS, M.B.D.; MATTA, S.L.P. The spermatogenic process of the common vampire bat *Desmodus rotundus* under a histomorphometric view. *PLoS ONE*, v. 12, n. 3, p. 1–18, 2017.
- OLNHAUSEN, L. R; GANNON, M. R. An evaluation of bat rabies prevention in the United States, based on an analysis from Pennsylvania. *Acta Chiropterologica*, 2004.
- PERACCHI, A.L.; LIMA, I.P.; REIS, N.R, NOGUEIRA, M.R.; FILHO, H.O. Ordem Chiroptera. In: Mamíferos do Brasil: Londrina; 153-230, 2007.
- RACEY, Paul a. Ecology of Bat Reproduction. *Ecology of Bats*, 1982.
- REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, A.W.; LIMA, I.P. DE. *Mamíferos do Brasil*. 2ed. ed.

Londrina: [s.n.], 2011.

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

SCHEFFER, K. C., DE BARROS, R. F., IAMAMOTO, K., MORI, E., ASANO, K. M., ACHKAR, S. M., ESTEVEZ GARCIA, A. I., LIMA, J. Y. DE O. Y DE OLIVEIRA, F. W. *Diphylla ecaudata* y *Diaemus Youngi*, Biología y comportamiento. *Acta Zoológica Mexicana*, v. 31, n. 3, p. 436–445, 2015.

SCHNEIDER, M. C.; ROMIJN, P.C.; UIEDA, W.; TAMAYO, H.; SILVA, D.F.; BELOTTO, A.; SILVA, J.B.; LEANES, L. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America? *Revista Panamericana de Salud Pública*, v. 25, n. 3, p. 260–269, 2009.

SCHNEIDER, M.C.; ROMIJN, P.C.; UIEDA, W.; TAMAYO, H.; DA SILVA, D.F.; BELOTTO, A.; DA SILVA, J.B.; LEANES, L.F. Rabies transmitted by vampire bats to humans: An emerging zoonotic disease in Latin America? *Revista Panamericana de Salud Pública*, v.25, n.3, p.260-269, 2009

SELTMANN, A.; CORMAN, V.M; RASCHE, A.; DROSTEN, C.; CZIRJÁK, G.Á.; BERNARD, H.; STRUEBIG, M.J.; VOIGT, C.C . Seasonal Fluctuations of Astrovirus, But Not Coronavirus Shedding in Bats Inhabiting Human-Modified Tropical Forests. *EcoHealth*, v. 14, n. 2, p. 272–284, 2017.

SIMMONS, N. B. Chiroptera. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. [S.l: s.n.], 2005. v. 1. p. 312–529.

SODRÉ, M. M. Biología do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (E. Geoffroy), pp. 25-39. In: Kotait, I., Filho, V. S. N., Souza, M. C. A. M. (Eds.). *Manual de controle da raiva dos herbívoros*. Instituto Pasteur, São Paulo. 2010.

TRAJANO, E. Ecología de populações de morcegos cavernícolas em uma região cárstica do sudeste do Brasil. *Rev Bras Zool*, v. 2, n. 5, p. 255-320, 1984.

UIEDA, W. Biología e dinâmica populacional de morcegos hematófagos. Anais do II Curso de Atualização em raiva dos herbívoros, Curitiba. pp. 63-87, 1996.

UIEDA, W. Período de atividade alimentar e tipos de presa dos morcegos hematófagos (Phyllostomidae) no Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira da Biologia*, v. 52, p. 563-573, 1992.

Artigo 1

Avaliação sazonal da espermatogênese do morcego hematófago *Desmodus rotundus*

Resumo

Este estudo teve por objetivo caracterizar o processo espermatogênico de *Desmodus rotundus*, bem como sua variação sazonal, através de análises morfológicas, morfométricas, ultraestruturais e imunohistoquímicas. Os animais foram coletados no município de Lajes-RN, nas estações seca e chuvosa. Após procedimentos de eutanásia, seus testículos foram processados histologicamente para inclusão em historesina para análises morfológicas e morfométricas sob microscopia de luz, em resina Spurr para análise da ultraestrutura celular sob microscopia eletrônica de transmissão, bem como em parafina histológica para análise imuno-histoquímica da expressão de receptores para andrógeno, aromatase, FGF2 e BCL-2. *D. rotundus* apresentou percentual de epitélio seminífero, número de células de Leydig por grama de testículo e população de células de Sertoli e de espermatogônias do tipo A significativamente maiores na estação chuvosa, enquanto o percentual de lúmen, índice mitótico, capacidade de suporte desempenhada pelas células de Sertoli e o rendimento geral da espermatogênese foram maiores na estação seca. A ultraestrutura da espermatogênese foi semelhante ao descrito nos demais mamíferos, e o perforatorium está ausente em seus espermatozoides. A análise imunohistoquímica revelou atividade da enzima aromatase nas células de Sertoli, células de Leydig, espermatócitos e espermátides, assim como a presença de receptores de andrógeno nas células de Sertoli. Estas marcações foram observadas nas duas estações, porém os receptores de andrógeno foram mais evidentes nas células de Leydig na estação seca. A atividade do FGF2 foi detectada nos espermatócitos primários em zigóteno e em paquíteno, bem como em espermatócitos secundários e espermátides arredondadas e alongadas, enquanto a proteína BCL-2 foi expressa nos espermatócitos primários em zigóteno e em paquíteno, e em espermátides arredondadas. Aparentemente, a atividade do FGF2 e da BCL-2 foi semelhante nas duas estações. O estudo sazonal da espermatogênese de *D. rotundus* indica um padrão de espermatogênese contínua, e sugere uma maior produção de espermatozoides na estação chuvosa na Caatinga nordestina.

Palavras-chave: Morfometria testicular, Epitélio seminífero, Imunohistoquímica, Ultraestrutura.

1. Introdução

Desmodus rotundus é a mais abundante espécie de morcego vampiro, ocorrendo desde o México até a Argentina, Chile e Uruguai, incluindo todo o território brasileiro (Reis et al., 2007). Possui hábito alimentar exclusivamente hematófago, com preferência pelo sangue de mamíferos de grande porte, sendo um potencial vetor do vírus da raiva (Mayen et al., 2003). O fato de usualmente habitarem próximos a rebanhos, possuindo assim abundância de recursos alimentares, e o fato de possuírem sistema de acasalamento promíscuo, têm sido apontados como alguns dos fatores responsáveis por permitir que esta espécie se reproduza durante todo o ano (Wilkinson, 1985; Chricton e Krutzsch, 2000). Assim, aparentemente, não há influência expressiva da temperatura ou da disponibilidade de alimentos sobre sua reprodução quando comparado a outros morcegos neotropicais (Wilson e Findley, 1970; Neuweiler, 2000).

Apesar de sua ampla distribuição e dos numerosos estudos sobre sua ecologia e fisiologia adaptada à hematofagia, poucos estudos abordam aspectos reprodutivos de *D. rotundus* machos, em particular na Caatinga. Este é um bioma altamente antropizado, onde normalmente a maior disponibilidade de forragem ocorre na estação chuvosa, e à medida em que ocorre a estiagem, as folhas senescentes das plantas lenhosas são incorporadas à dieta dos animais, podendo representar o único recurso forrageiro disponível a estes em algumas áreas. Deste modo, a dificuldade no manejo do gado no período de estiagem pode ocasionar a diminuição de rebanhos, afetando consequentemente a dieta dos morcegos hematófagos (Pereira Filho et al., 2013). Não foram encontrados estudos acerca da reprodução desta espécie na Caatinga.

Embora aspectos da histologia testicular de *D. rotundus* sejam conhecidos, o comportamento sazonal das células que compõem o parênquima testicular, e consequentemente as taxas de produção espermática na espécie, não foram avaliados. Destaca-se ainda a carência de informações acerca da reprodução de mamíferos em geral no estado do Rio Grande do Norte. Deste modo, este estudo objetivou caracterizar o processo espermatogênico de *D. rotundus*, considerando-se os aspectos morfológicos, volumétricas, histomorfométricas e ultraestruturais dos testículos, a partir do estudo de espécimes capturados em diferentes períodos do ano em uma região de Caatinga, no estado do Rio Grande do Norte. A partir dos conhecimentos gerados espera-se tanto contribuir para o conhecimento sobre sua biologia reprodutiva quanto apoiar o desenvolvimento de métodos para controle populacional que respeitem a importância ecológica da espécie, além de seu impacto econômico e epidemiológico sobre a pecuária e sobre a saúde humana.

2. Materiais e métodos

2.1 Área de estudo e coleta dos animais

As capturas foram realizadas no município de Lajes, Rio Grande do Norte (05° 42' 00" S e 36° 14' 41" W) no ano de 2017. Foi obtida autorização para captura e transporte dos animais junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, licença N° 55562-1) e para os procedimentos de eutanásia junto à Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRN (CEUA, licença N° 056/2016).

Foram estabelecidas duas estações anuais para as coletas: uma seca, de setembro a fevereiro, e outra chuvosa, de março a agosto (Lima Junior et al., 2014). Assim, os espécimes foram capturados sazonalmente e foram estabelecidos os grupos estação seca (n=7) e estação chuvosa (n=7). Espécimes de *D. rotundus* machos e adultos foram capturados ao anoitecer, com a utilização de redes de neblina armadas nas entradas de galerias de minérios abandonadas, utilizadas pelos os animais como abrigos. Os animais adultos foram identificados com base na observação da fusão da cartilagem epifisária do quarto dedo, na junção metacarpo-falangeal (Kunz e Anthony, 1982).

Os animais foram transportados à cidade de Natal-RN na manhã seguinte à captura, em sacos apropriados para contenção e transporte de morcegos, e a eutanásia foi feita no mesmo dia. Realizou-se anestesia por via intraperitoneal com 50 mg/kg de Xilasina e 80 mg/kg de Cetamina, seguindo-se a pesagem dos animais e remoção do sistema reprodutor. A eutanásia foi realizada em seguida por aprofundamento do plano anestésico, utilizando-se 150 mg/kg de Xilasina e 240 mg/kg de Cetamina.

2.2 Processamento histológico

Um testículo de cada animal foi fixado em solução de Karnovsky (1965) e destinado às análises morfológicas e morfométricas sob microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, enquanto que o outro testículo foi fixado com Paraformaldeído a 4% e destinado a análises imunohistoquímicas. Após 24 h os testículos foram transferidos para etanol 70%, pesados e encaminhados ao Laboratório de Biologia Estrutural e da Reprodução, Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde foram processados histologicamente para inclusão em Glicol-Metacrilato (Historesin®, Leica). Os testículos foram desidratados em série etanólica crescente (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), seguindo-se pré-infiltração com glicol-Metacrilato *overnight*, infiltração por 2 horas e emblocamento. Os blocos foram secos em estufa e foram obtidas secções com 3 µm de

espessura usando micrótomo rotativo automático (Leica RM2255). As preparações foram coradas com azul de toluidina / borato de sódio 1% (Merck) para as análises morfológicas e morfométricas.

Fragmentos teciduais foram encaminhados ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (UnB), onde foram processados para análise ultraestrutural. As amostras foram pós-fixadas por 1h em tetróxido de ósmio 2% e ferricianeto de potássio 1,6%, em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, seguido por contrastação em solução aquosa de acetato de uranila 0,5% overnight. A desidratação foi realizada em séries crescentes de acetona, de 30% a 100%, e os fragmentos foram embebidos em resina Spurr (Sigma-Aldrich®). Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 e 80 kV.

Para as análises imuno-histoquímicas foram obtidas secções testiculares a 4 µm de espessura, em lâminas sinalizadas. Cada secção foi desparafinizada, reidratada, lavada com Triton X-100 a 0,3% em tampão fosfato e incubada com peroxidase endógena (3% peróxido de hidrogênio). Procedeu-se a incubação durante a noite a 4° C, com os anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology, Inc. EUA) contra a proteína pré-apoptótica BCL-2 (1:400), contra o Fator de Crescimento de Fibroblastos FGF2 (1:400), contra a enzima Aromatase (1:200) e contra o receptor de Aandrógeno (1:200). As lâminas foram lavadas com tampão fosfato e incubadas com anticorpo secundário estreptavidina/HRP-conjugados (Biocare Medical, EUA) por 30 min. A imunorreatividade para os anticorpos foi visualizada por detecção colorimétrica, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (TrekAvidin-HRP Label + Kit da Biocare Medical, Dako, EUA). As secções foram contracoradas com hematoxilina e as áreas que apresentaram imunorreatividade foram fotografadas através do fotomicroscópio Nikon E200 LED (Departamento de Morfologia, UFRN). Considerando-se as células que apresentaram marcação para cada um dos anticorpos utilizados, para cada tipo celular estimou-se o número de células que apresentaram marcação positiva em relação ao número destas mesmas células que não apresentaram marcação, em uma área de aproximadamente 40.000 µm² por secção tubular avaliada. Utilizou-se, portanto, a equação: [(n° de células marcadas / n° de células não marcadas) / n° de secções analisadas].

2.3 Morfometria testicular

Para realização das análises morfométricas, foram realizadas capturas de imagens das lâminas histológicas em diferentes aumentos, utilizando-se fotomicroscópio Olympus BX50 (Departamento de Biologia Geral, UFV) ou BEL Bio2/3 Eureka 5.0 (Departamento de

Morfologia, UFRN). A análise das imagens foi realizada com base na estereologia testicular, utilizando-se o *software* Image-Pro Plus®.

O índice gonadosomático (IGS) foi calculado para quantificar o investimento em testículos em relação a massa corporal, dividindo-se o peso dos dois testículos pelo peso corporal, sendo esse valor multiplicado por 100. As proporções volumétricas entre os elementos que constituem os compartimentos tubular e intertubular dos testículos foram mensuradas a partir da contagem de 3.520 pontos por animal, a partir de uma grade com 352 pontos projetada sobre 10 imagens histológicas, na objetiva de 10x, obtidas em cortes histológicos distintos do testículo de cada animal. Assim, no túbulo seminífero foram determinados os pontos coincidentes sobre a túnica própria, o epitélio seminífero e o lúmen, bem como os pontos sobre o compartimento intertubular. Estimou-se ainda o percentual representado pela túnica albugínea, a partir da contagem do número de pontos coincidentes sobre esta ou sobre o parênquima testicular.

Posteriormente foram projetados 1.000 pontos sobre o compartimento intertubular, na objetiva de 40x, sendo quantificadas as células de Leydig, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo, determinando-se assim as proporções volumétricas entre cada componente. Os percentuais destes componentes no intertúbulo foram estimados a partir da multiplicação do número total de pontos coincidentes sobre cada componente por 100, dividido por 1000. Já o percentual desses componentes no testículo foi obtido a partir da multiplicação do percentual de intertúbulo pelo percentual de cada componente no intertúbulo, dividindo-se por 100. Para o cálculo do volume total de cada um dos componentes intertubulares no parênquima testicular, o percentual de cada componente no testículo foi multiplicado pelo peso gonadal e este valor foi dividido por 100. Os valores médios foram expressos em μL . Considerando que a densidade do testículo é em torno de 1 (Johnson et al., 1981), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

O volume dos túbulos seminíferos (VTS) foi obtido multiplicando-se o peso gonadal pelo percentual de túbulos seminíferos, sendo este valor dividido por 100. O índice tubulosomático (ITS) foi calculado para quantificar o investimento nos túbulos seminíferos em relação à massa corporal total, e foi obtido dividindo-se o VTS pelo peso corporal, multiplicando o resultado por 100. O diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero foram obtidos medindo-se 20 secções transversais tubulares, que apresentaram a forma mais circular possível, independentemente do estágio do ciclo do epitélio seminífero. Nas mesmas secções utilizadas para mensurar o diâmetro foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da túnica própria até o lúmen tubular. O comprimento dos túbulos

seminíferos (CT) por testículo foi estimado utilizando a fórmula: $CT = VTS / \pi R^2$, onde πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos e R = diâmetro tubular/2. Esse valor foi dividido pelo peso dos testículos para calcular o comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo.

O diâmetro médio do núcleo da célula de Leydig foi obtido a partir da mensuração de 30 células por animal, sendo analisadas aquelas com os núcleos mais esféricos e nucléolos evidentes. O volume nuclear foi obtido pela fórmula $4 / 3 \pi R^3$, onde R = diâmetro nuclear / 2. O volume citoplasmático foi estimado pela multiplicação da porcentagem de citoplasma pelo volume nuclear, dividido pela porcentagem nuclear. O volume individual de cada célula foi estimado pela soma dos volumes nucleares e citoplasmáticos. Estes valores foram expressos em μm^3 . O número de células de Leydig por testículo foi estimado a partir dos volumes individuais da célula de Leydig e o volume total ocupado pelas células de Leydig no parênquima testicular. Esse valor foi dividido pelo peso dos dois testículos, para se estimar o número de células de Leydig por grama de testículo, o que permite comparações entre diferentes espécies. O índice Leydigossomatico, que quantifica o investimento em células de Leydig com relação à massa corporal, foi estimado dividindo o volume total de células de Leydig no parênquima testicular pelo peso corporal, multiplicado por 100.

2.4 Quantificação do rendimento espermatogênico

A população de cada tipo de célula germinativa foi estimada contando-se os núcleos das células germinativas e nucléolos das células de Sertoli presentes no estágio 1 do CES, pela análise de 10 seções transversais tubulares por animal. Os diâmetros nucleares de 30 espermatogonias tipo A (A), espermatócitos primários em pré-leptoteno/leptoteno (PL-L), espermatócitos primários em paquíteno (P), espermatídes arredondadas (Ar) e nucléolos de células de Sertoli (S) foram medidos. As contagens foram corrigidas considerando-se a espessura de corte histológico e os diâmetros nucleares ou nucleolares, de acordo com a metodologia proposta por Abercrombie (1946), modificada por Amann e Almquist (1962).

A eficiência intrínseca da espermatogênese foi calculada a partir das taxas encontradas entre os números corrigidos das células germinativas, a fim de se quantificar a eficiência da espermatogênese. Calculou-se assim o índice mitótico, (PL-L / A), a fim de se determinar a perda ou degeneração ocorrida durante a fase espermatogonial; o índice meiótico (Ar / P), a fim de se determinar a eficiência das divisões meióticas; e o rendimento geral da espermatogênese (Ar / A), quantificando-se a eficiência do processo espermatogênico como um todo. Determinou-se também o índice de células de Sertoli, que indica a capacidade de

suporte destas células pelo número total de células germinativas $(A + PL-L + P + Ar) / S$). O número total de células de Sertoli por testículo foi obtido multiplicando seu número corrigido pelo comprimento tubular por testículo (em μm) e dividindo-se esse valor pela espessura do corte histológico (Johnson et al., 1981). O número de células de Sertoli por grama de testículo foi obtido dividindo o valor anterior pelo peso testicular total.

Levando em consideração que a perda celular não é significativa na espermiogênese, a reserva espermática testicular (RET), ambos por testículo ou por grama de testículo, foram calculados com base na população de espermátides arredondadas no estágio 1 do CES, utilizando a fórmula: $RET = (\text{comprimento dos túbulos seminíferos} / \text{espessura do corte histológico}) \times \text{número corrigido de espermátides arredondadas por seção transversal}$ (Berndtson, 1977).

A produção espermática diária (PED) foi estimada a partir do conhecimento da duração de um CES de *D. rotundus*, estimada em 8,23 dias (Morais et al., 2017). Assim, a PED foi calculada dividindo-se a RET obtida no presente estudo por 8,23, conforme fórmula proposta por Amann (1970).

2.5. Análise Estatística

As variáveis foram submetidas ao Teste t de Student, considerando-se um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), utilizando-se o *software* SPSS versão 12.0 para Windows (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA). Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Os resultados da imunohistoquímica foram submetidos à estatística descritiva.

3. Resultados

3.1 Biometria e morfometria dos túbulos seminíferos

O arranjo do parênquima testicular de *D. rotundus* é mostrado na Figura 1, e na tabela 1 encontram-se os valores médios referentes à biometria e às proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular, nas estações seca e chuvosa. Considerando-se as médias das duas estações, os animais apresentaram peso corporal médio de 33,51 g e peso testicular médio de 0,19 g, resultando em um IGS médio de 0,56 %. O parênquima testicular apresentou-se composto por 95,69 % de túbulos seminíferos e 4,31 % de intertúbulo. O compartimento tubular foi composto por 4,37 % de túnica própria, 69,31 % de epitélio seminífero e 22,01 % de lúmen. Houve diferença estatística significativa entre as estações

quanto aos percentuais do compartimento tubular representados por epitélio seminífero e lúmen, de modo que o percentual de epitélio seminífero foi significativamente maior na estação chuvosa, enquanto o percentual de lúmen foi significativamente maior na estação seca.

Não houve variação significativa entre as estações nos demais parâmetros. Deste modo, o volume tubular médio entre as duas estações foi de 0,18 ml, resultando em um ITS médio de 0,53 %. O diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero apresentaram valores médios de 432,17 μm e 91,26 μm , respectivamente. Os animais deste estudo apresentaram 1,23 m de túbulos seminíferos por testículo e 6,65 m de túbulos seminíferos por grama de testículo.

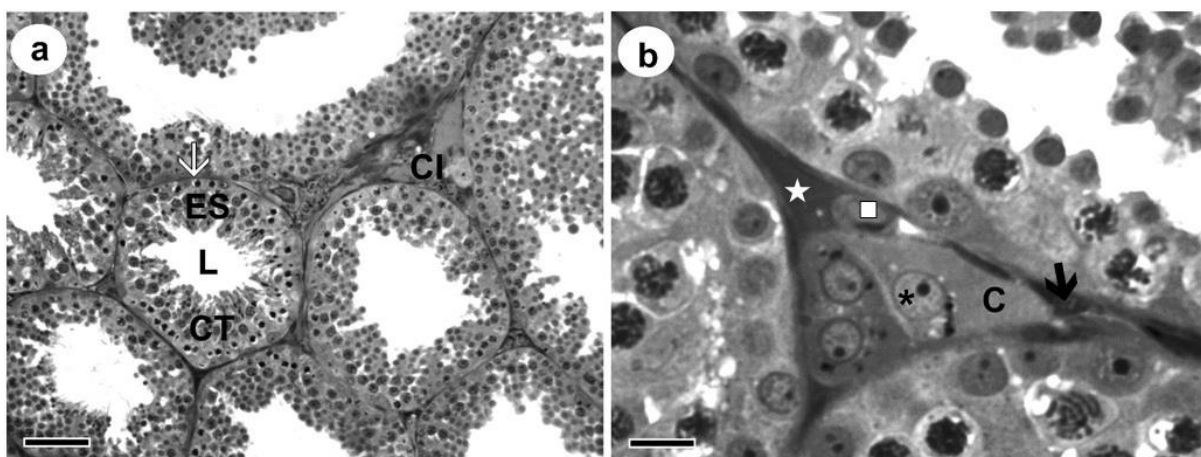


Figura 1. Secções transversais do testículo de *Desmodus rotundus* na estação chuvosa. **CT:** Compartimento tubular; **CI:** Compartimento intertubular; **ES:** Epitélio seminífero; **L:** Lúmen ; **☆:** Vaso linfático; **□:** Vaso sanguíneo; *****: Núcleo da célula de Leydig; **C:** Citoplasma de Leydig; **Seta preta :** Tecido conjuntivo; **Seta branca:** Túnica própria. Barras: (a): 30 μm ; (b): 10 μm .

Tabela 1. Médias por estação da biometria e morfometria de componentes testiculares do morcego *Desmodus rotundus*. Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Estação seca	Estação chuvosa	Média anual
Peso corporal (g)	33,02 \pm 5,22	34,01 \pm 1,52	33,51 \pm 3,37
Peso gonadal (g)	0,18 \pm 0,04	0,20 \pm 0,04	0,19 \pm 0,04
Índice gonadossomático (IGS) (%)	0,53 \pm 0,10	0,58 \pm 0,10	0,56 \pm 0,10
Túnica albugínea (%)	10,49 \pm 2,40	10,13 \pm 1,68	10,31 \pm 2,04
Túbulos seminíferos (%)	95,76 \pm 1,01	95,63 \pm 1,60	95,69 \pm 1,31
Volume tubular (mL)	0,17 \pm 0,04	0,19 \pm 0,04	0,18 \pm 0,04
Túnica própria (%)	4,23 \pm 0,93	4,50 \pm 0,68	4,37 \pm 0,80
Epitélio seminífero (%)	66,59 \pm 6,10 ^b	72,04 \pm 2,39 ^a	69,31 \pm 4,25
Lúmen (%)	24,94 \pm 4,99 ^a	19,09 \pm 1,81 ^b	22,01 \pm 3,40
Intertúbulo (%)	4,24 \pm 1,01	4,38 \pm 1,60	4,31 \pm 1,31
Índice tubulossomático (%)	0,51 \pm 0,10	0,56 \pm 0,10	0,53 \pm 0,10
Diâmetro do túbulo seminífero (μ m)	441,37 \pm 26,70	422,97 \pm 38,46	432,17 \pm 32,58
Altura do epitélio seminífero (μ m)	97,58 \pm 15,29	84,94 \pm 8,62	91,26 \pm 11,95
Comprimento tubular por testículo (m)	1,10 \pm 0,27	1,37 \pm 0,30	1,23 \pm 0,29
Comprimento tubular por grama de testículo (m/g)	6,32 \pm 0,71	6,98 \pm 1,41	6,65 \pm 1,06

Letras diferentes na mesma linha indicam que houve diferença estatística significativa. A ausência de letras na mesma linha indica que não houve diferença estatística significativa pelo Teste t ($p>0,05$). Dados expressos em Média \pm DP.

3.2 Quantificação do rendimento espermatogênico

Na Tabela 2 são apresentadas as médias por estação das contagens corrigidas para os tipos celulares encontrados no estádio 1 do CES, bem como os índices indicativos de produção espermática de *D. rotundus*. A contagem de espermatogônias e de células de Sertoli, foi significativamente maior durante a estação chuvosa, assim como o número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo. Já o índice mitótico, o rendimento geral da espermatogênese e índice de células de Sertoli foram maiores durante a estação seca.

Os animais apresentaram reserva espermática testicular média por grama de testículo de $11,93 \times 10^7$ células, e estimou-se uma produção espermática diária média por grama de testículo de $14,49 \times 10^6$ células. Estes valores permaneceram sem alterações significativas ao longo do ano.

Tabela 2. Médias da população celular do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero e índices indicativos de produção espermática por estação climática no morcego *Desmodus rotundus*. Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Estação seca	Estação chuvosa	Média anual
Célula de Sertoli	2,29 \pm 0,52 ^b	3,51 \pm 0,74 ^a	2,90 \pm 0,63
Espermatogônia tipo A	0,67 \pm 0,24 ^b	1,00 \pm 0,12 ^a	0,84 \pm 0,18
Espermatócito primário em Pré-leptóteno/Leptóteno	16,58 \pm 3,11	16,32 \pm 3,54	16,45 \pm 3,32
Espermatócito primário em Paquíteno	18,19 \pm 3,05	16,89 \pm 2,23	17,54 \pm 2,64
Espermátide arredondada	58,90 \pm 14,47	49,24 \pm 7,28	54,07 \pm 10,87
Índice mitótico	25,43 \pm 4,66 ^a	16,50 \pm 4,59 ^b	20,97 \pm 4,63
Índice meiótico	3,23 \pm 0,42	2,93 \pm 0,37	3,08 \pm 0,39
Rendimento geral da espermatogênese	90,79 \pm 19,32	49,87 \pm 10,90 ^b	70,33 \pm 15,11
Índice de células de Sertoli	44,71 \pm 22,55	24,57 \pm 5,24 ^b	34,64 \pm 13,90
Nº de células de Sertoli por testículo (x10 ⁵)	8,34 \pm 2,43 ^b	15,31 \pm 3,49 ^a	11,83 \pm 2,96
Nº de células de Sertoli por grama de testículo (x10 ⁶)	4,86 \pm 1,26 ^b	8,07 \pm 3,28 ^a	6,46 \pm 2,27
Reserva espermática testicular (x10 ⁶)	21,55 \pm 7,06	23,23 \pm 6,17	22,39 \pm 6,62
Reserva espermática por grama de testículo (x10 ⁷)	12,22 \pm 1,56	11,64 \pm 1,64	11,93 \pm 1,60
Produção espermática diária (x10 ⁵)	26,18 \pm 8,58	28,22 \pm 7,50	27,20 \pm 8,04
Produção espermática por grama de testículo (x10 ⁶)	14,85 \pm 1,89	14,14 \pm 2,00	14,49 \pm 1,94

Letras diferentes na mesma linha indicam que houve diferença estatística significativa. A ausência de letras na mesma linha indica que não houve diferença estatística significativa pelo Teste t ($p > 0,05$). Dados expressos em Média \pm DP.

A ultraestrutura de todos os tipos de células presentes no epitélio germinativo no estágio 1 do CES, bem como sua organização sob a microscopia de luz é mostrada na Figura 2a. Células de Sertoli com núcleos característicos e nucléolos fragmentados eram evidentes (Fig. 2b). Estas células estavam localizadas perto da lâmina basal. As espermatogônias do tipo A apresentaram forma elíptica, com núcleo oval contendo cromatina granular; nucléolo único, grande, granular e irregular, localizado centralmente. Estas células estiveram aderidas firmemente à lâmina basal, com a qual formaram projeções e depressões (Fig. 2c). Núcleos de espermatócitos primários em Pré-leptóteno-Leptóteno mostraram regiões de cromatina linear. Nessa fase, o espermatócito não está mais em contato com a lâmina basal (Fig. 2d). Espermatócitos primários em paquíteno estiveram localizados na região mediana do epitélio, e apresentaram nucléolo compactado e denso, indicando que a desorganização morfológica do nucléolo começa mais tarde (Fig. 2e). Espermátides arredondadas foram observadas próximo ao lúmen dos túbulos seminíferos, com núcleos esféricos e regulares, contendo aglomerados

filamentosos de cromatina. O nucléolo foi visível nas espermátides iniciais, porém com a entrada destas em processo de espermiogênese o nucléolo se desorganizou e nenhum material nucleolar foi observado nas próximas fases (Fig. 2f).

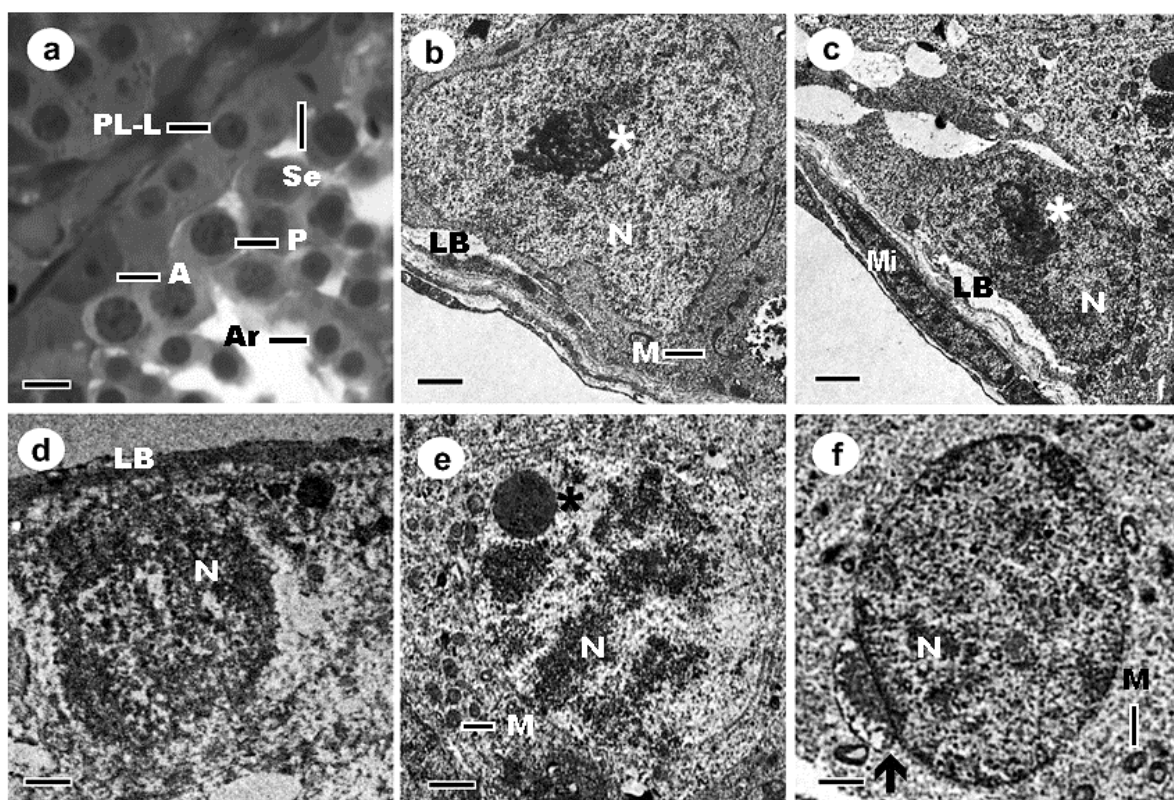


Figura 2. Secções transversais dos testículos de *Desmodus rotundus* evidenciando as células que compõem o estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero na estação chuvosa sob a microscopia de luz (a) e sob microscopia eletrônica de transmissão (b-f). **a:** Espermatogônia do tipo A (**A**); Espermatócito primário na transição Pré-leptóteno/Leptóteno (**PL-L**); Espermatócito primário em Paquíteno (**P**); Espermátide arredondada (**Ar**); **b:** Célula de Sertoli; **c:** Espermatogônia do tipo A; **d:** Espermatócito primário na transição Pré-Leptóteno/Leptóteno; **e:** Espermatócito primário em Paquíteno; **f:** Espermátide arredondada; **N:** núcleo; **LB:** Lâmina basal; **M:** mitocôndrias; **Mi:** Célula mióide; **Se:** Célula de Sertoli; *****: Nucléolo; **Seta preta:** Acrossoma. Barras: (a): 10 μm ; (b-f): 2 μm .

Na figura 3 é apresentada a ultraestrutura das espermátides alongadas e dos espermatozoides de *D. rotundus*. As principais alterações observadas durante essa fase foram o maior alongamento e compactação do núcleo dos futuros espermatozoides, o desenvolvimento do acrossoma (Figs. 3a-c) e do flagelo (Fig. 3d-e). O axonema se forma na porção caudal do núcleo da espermátide (Fig. 3d), enquanto que o acrossoma se condensa em

sua porção cranial. A fossa nuclear, que permite o desenvolvimento do flagelo, pode ser vista na figura 3d, enquanto que os microtúbulos podem ser visualizados nas figuras 3c e 3e.

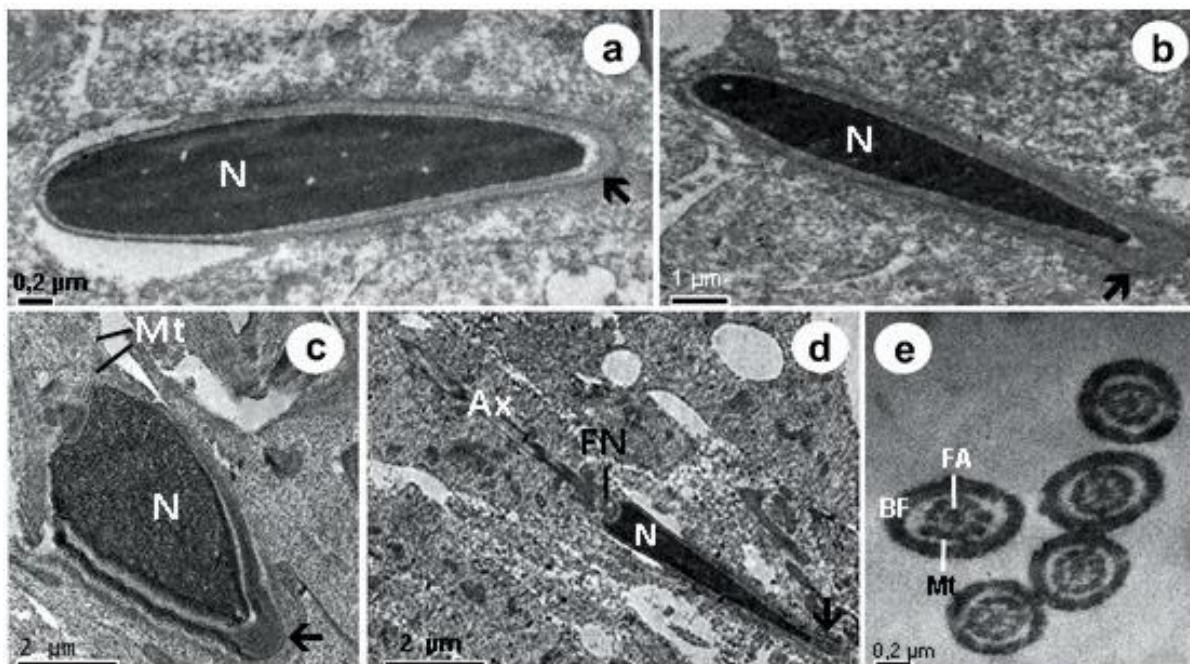


Figura 3. Aspectos ultraestruturais da espermiogênese em *Desmodus rotundus*. **a-c:** espermátides alongadas em fase final de formação do capuz acrossômico; **d:** espermátide tardia com o início da organização da peça intermediária; **e:** secções transversais dos flagelos. **Ax:** axonema; **BF:** bainha fibrosa; **FA:** filamento axial; **FN:** fossa nuclear; **Mt:** microtubulos; **N:** núcleo; **Seta preta:** acrossoma.

3.3 Morfometria e morfologia do compartimento intertubular

Na tabela 3 são apresentadas as médias referentes à morfometria do compartimento intertubular de *D. rotundus*. O compartimento intertubular mostrou-se composto por células de Leydig, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo (Figura 1b). As células de Leydig foram os tipos celulares predominantemente nas duas estações, representando em média 67,26 % do intertúbulo e 2,87 % do parênquima testicular como um todo. Nenhum dos componentes intertubulares apresentou variação significativa entre as estações.

Tabela 3. Percentuais e volumes de células de Leydig, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo no intertúbulo e no parênquima testicular do morcego *Desmodus rotundus*, por estação climática. Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Estação seca	Estação chuvosa	Média anual
Volume do intertúbulo (mL)	0,007 \pm 0,002	0,009 \pm 0,003	0,008 \pm 0,002
Percentual no intertúbulo (%)			
Células de Leydig	69,63 \pm 8,45	64,89 \pm 12,84	67,26 \pm 10,65
Vasos sanguíneos	17,06 \pm 8,40	23,54 \pm 11,20	20,30 \pm 9,80
Vasos linfáticos	7,79 \pm 4,42	6,77 \pm 3,93	7,28 \pm 4,17
Tecido conjuntivo	5,53 \pm 1,69	4,80 \pm 2,89	5,16 \pm 2,29
Percentual no parênquima testicular (%)			
Células de Leydig	2,90 \pm 0,55	2,83 \pm 1,06	2,87 \pm 0,80
Vasos sanguíneos	0,74 \pm 0,42	1,01 \pm 0,59	0,88 \pm 0,51
Vasos linfáticos	0,35 \pm 0,24	0,32 \pm 0,27	0,33 \pm 0,25
Tecido conjuntivo	0,24 \pm 0,12	0,21 \pm 0,15	0,23 \pm 0,13
Volume total por parênquima testicular (μ L)			
Células de Leydig	5,01 \pm 1,18	5,58 \pm 2,20	5,29 \pm 1,69
Vasos sanguíneos	1,25 \pm 0,68	1,95 \pm 1,08	1,60 \pm 0,88
Vasos linfáticos	0,60 \pm 0,38	0,59 \pm 0,45	0,59 \pm 0,42
Tecido conjuntivo	0,42 \pm 0,17	0,42 \pm 0,28	0,42 \pm 0,22

A ausência de letras na mesma linha indica que não houve diferença estatística significativa pelo Teste t ($p>0,05$). Dados expressos em Média \pm DP.

As médias referentes à morfometria das células de Leydig de *D. rotundus* são apresentadas na Tabela 4, e sua morfologia é apresentada na figura 4, onde observamos um núcleo elipsoide, gotículas lipídicas e grânulos de lipofucsina dispersos pelo citoplasma das células de Leydig. Não foram observadas diferenças significativas quanto aos seus percentuais e volumes nucleares e citoplasmáticos entre as estações, bem como quanto aos seus volumes individuais e totais e ILS. Já o número total de células de Leydig por grama de testículo foi maior durante a estação chuvosa, onde foram encontradas cerca de $48,14 \times 10^5$ células.

Tabela 4. Morfometria sazonal das células de Leydig do morcego *Desmodus rotundus*. Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Estação seca	Estação chuvosa	Média anual
Diâmetro nuclear (μm)	15,31 \pm 0,96	15,72 \pm 3,38	15,51 \pm 2,17
Percentual do núcleo (%)	27,02 \pm 12,34	25,51 \pm 11,73	26,27 \pm 12,03
Volume do núcleo (μm^3)	1896,75 \pm 349,8	2301,70 \pm 1801,30	2099,22 \pm 1075,5
Percentual do citoplasma (%)	72,98 \pm 12,34	74,49 \pm 11,73	73,73 \pm 12,03
Volume do citoplasma (μm^3)	6097,88 \pm 2543,9	7653,70 \pm 5171,65	6875,79 \pm 3857,7
Volume individual da célula (μm^3)	7994,63 \pm 2795,8	9955,40 \pm 6813,34	8975,01 \pm 4804,5
Nº de células de Leydig por testículo ($\times 10^5$)	7,99 \pm 4,69	9,67 \pm 6,08	8,83 \pm 5,38
Nº de células de Leydig por grama de testículo ($\times 10^5$)	47,28 \pm 29,92 ^b	48,14 \pm 25,57 ^a	47,71 \pm 27,74
Índice Leydigossomático (%)	0,015 \pm 0,004	0,016 \pm 0,006	0,016 \pm 0,005

Letras diferentes na mesma linha indicam que houve diferença estatística significativa. A ausência de letras na mesma linha indica que não houve diferença estatística significativa pelo Teste t ($p > 0,05$). Dados expressos em Média \pm DP.

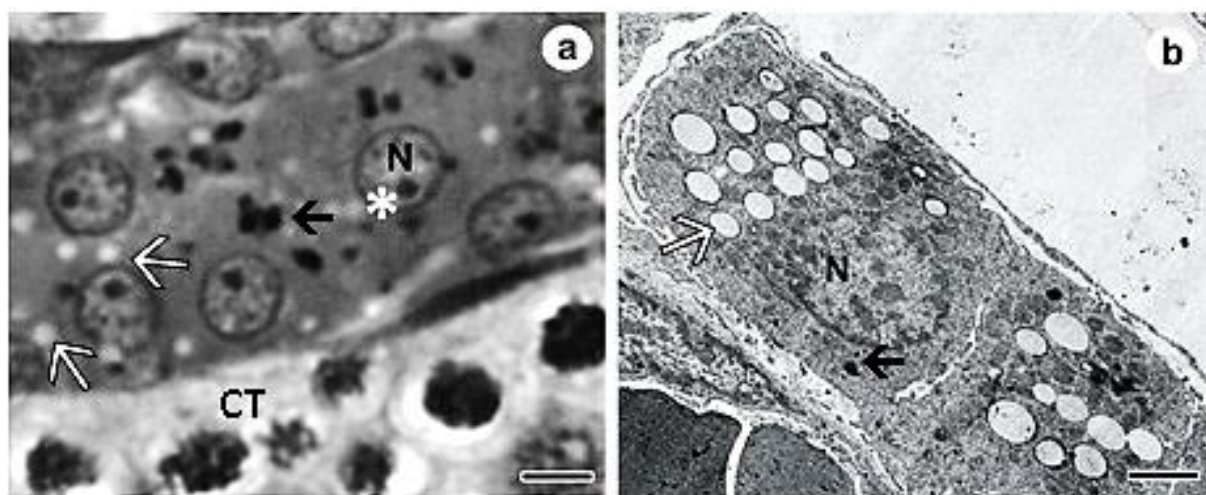


Figura 4. Morfologia da célula de Leydig de *Desmodus rotundus* sob a microscopia de luz (a) e sob a microscopia eletrônica de transmissão (b) na estação chuvosa. **CT:** compartimento tubular; **N:** núcleo; *****: nucléolo; **Seta branca:** gotícula lipídica no citoplasma da célula de Leydig; **Seta preta:** grânulos de lipofuscina no citoplasma da célula de Leydig. Barras: (a): 10 μm ; (b): 2 μm .

3.4 Imunohistoquímica

Os receptores de andrógeno (Fig. 5a-b) estavam distribuídos igualmente nos núcleos das células de Sertoli entre as estações seca e chuvosa, enquanto a distribuição destes receptores no citoplasma das células de Leydig mostrou-se mais frequente na estação chuvosa (Tabela 5). Já a Aromatase (Fig. 5c-d) apresentou distribuição homogênea nas duas estações, tanto nos núcleos das células de Sertoli quanto no citoplasma das células de Leydig, espermatócitos primários em Paquíteno e espermátides arredondadas. Porém, a atividade da Aromatase foi mais frequente nos espermatócitos primários na transição Pré-Leptóteno/Leptóteno na estação chuvosa (tabela 5).

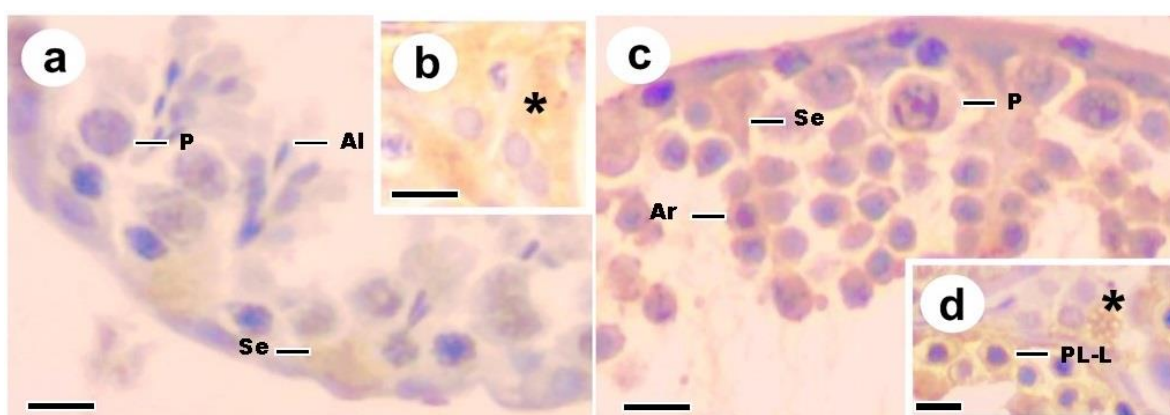


Figura 5. Detecção imunohistoquímica de receptores de Andrógeno (a-b) e Aromatase (c-d) nos testículos de *Desmodus rotundus*. **Se:** Célula de Sertoli; **PL-L:** Espermatócito primário na transição Pré-Leptóteno/Leptóteno; **P:** Espermatócito primário em Paquíteno; **Ar:** Espermátide arredondada; **Al:** Espermátide alongada; *****: Citoplasma de Célula de Leydig. Barras: (a-d): 10 μ m.

A atividade do FGF2 (Fig. 6a-b) e da BCL-2 (Fig. 6c-d) mostrou ser semelhante entre as estações seca e chuvosa no citoplasma dos espermatócitos primários em Paquíteno e em Zigóteno, espermatócitos secundários, e espermátides arredondadas (Tabela 5). As espermátides alongadas apresentaram um padrão semelhante de imunomarcção para o FGF2 em ambas estações.

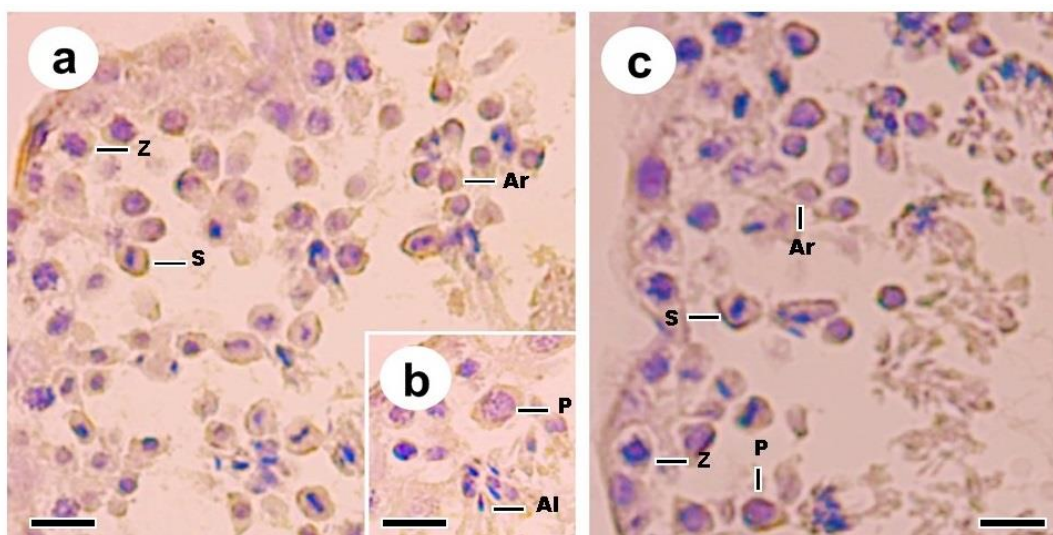


Figura 6. Detecção imunohistoquímica para FGF2 (a-b) e BCL-2 (c-d) nos túbulos seminíferos de *Desmodus rotundus*. **Z:** Espermatócito primário em Zigóteno; **P:** Espermatócito primário em Paquíteno; **S:** Espermatócito Secundario; **Ar:** Espermátide arredondada; **Al:** Espermátide alongada. Barras: (a): 20 µm; (b): 10 µm; (c): 20 µm.

Tabela 5. Frequência da expressão dos Receptores de andrógeno, Aromatase, FGF 2 e BCL-2 nas células dos testículos de *Desmodus rotundus*. Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Tipo celular marcado	Estação	Andrógeno	Aromatase	FGF 2	BCL-2
Célula de Sertoli	S	1,00 \pm 0,22	1,00 \pm 0,32	---	---
	C	1,19 \pm 0,34	1,00 \pm 0,50	---	---
Célula de Leydig	S	---	1,00 \pm 0,46	---	---
	C	0,88 \pm 0,40	1,00 \pm 1,17	---	---
Espermatócito primário em Zigóteno	S	---	---	1,00 \pm 1,22	1,00 \pm 0,25
	C	---	---	1,00 \pm 0,47	1,00 \pm 0,66
Espermatócito primário na transição Pré-leptóteno/Leptóteno	S	---	1,00 \pm 0,55	---	---
	C	---	6,67 \pm 2,64	---	---
Espermatócito primário em Paquíteno	S	---	1,00 \pm 0,48	1,00 \pm 0,49	1,00 \pm 0,31
	C	---	1,00 \pm 1,00	1,00 \pm 0,16	1,00 \pm 0,23
Espermatócito secundário	S	---	---	1,00 \pm 1,00	1,00 \pm 1,00
	C	---	---	---	---
Espermátide arredondada	S	---	1,00 \pm 0,53	1,00 \pm 0,36	1,00 \pm 0,18
	C	---	1,11 \pm 1,16	1,00 \pm 0,51	1,00 \pm 0,00
Espermátide alongada	S	---	---	1,00 \pm 0,75	---
	C	---	---	1,00 \pm 0,30	---

4. Discussão

4.1 Biometria e morfometria dos túbulos seminíferos

O padrão testicular encontrado nos animais utilizados neste estudo apresentou-se, de um modo geral, semelhante ao observado em outros mamíferos, sendo este o primeiro estudo acerca da quantificação sazonal da morfometria testicular e espermatogênese em *D. rotundus*.

O IGS obtido foi semelhante ao encontrado em um estudo realizado em uma área de Mata Atlântica no Sudeste do Brasil (0,54%; Morais et al., 2017), e maior do que o encontrado em outras espécies de morcegos, tais como no frugívoro *Sturnira lilium* (0,27%; Morais et al., 2014b) e no insetívoro *Molossus molossus* (0,47%; Morais et al., 2013a). Seu IGS reflete, assim, um maior investimento em massa testicular, o que é coerente com a necessidade de manutenção do harém, sendo a poliginia a organização social comumente encontrada na espécie (Crichton e Krutzsch, 2000).

O maior percentual de epitélio seminífero observado na estação chuvosa levou diretamente ao menor percentual de lúmen nesta mesma estação. Este parâmetro na estação chuvosa se aproximou do descrito para a espécie em uma região de Mata Atlântica (Morais et al., 2017) e ao encontrado para *Sturnira lilium* na estação seca (Morais et al., 2014b). Este achado indica que o maior percentual de epitélio seminífero verificado na estação chuvosa está associado a uma maior atividade espermiática durante este período do ano.

O diâmetro tubular médio anual foi consideravelmente maior quando comparado tanto com o encontrado em outras espécies de morcegos quanto quando comparado com o encontrado na mesma espécie, em outra região geográfica do país, tendo a altura do epitélio seminífero seguido a mesma tendência (Morais et al., 2013a; Morais et al., 2014b; Morais et al., 2017). Ainda, enquanto a maioria dos mamíferos usualmente apresenta diâmetro tubular médio variando de 180 a 300 μm (Roosen-Runge, 1977; França e Russel, 1998), o valor aqui encontrado (432,17 μm) destaca-se por ser o maior valor já registrado. Este achado refletiu diretamente no comprimento dos túbulos seminíferos, que se apresentou consideravelmente menor quando comparado aos animais supracitados. Enquanto a média do comprimento tubular por grama de testículo na maioria dos mamíferos é de aproximadamente 20 m, e foram registrados 35 m em *D. rotundus*, neste estudo este valor foi de 6 m (França e Godinho, 2003; Bittencourt et al., 2004; Morais et al., 2014b; Morais et al., 2017).

Já o ITS esteve coerente com o encontrado em outros animais de comportamento reprodutivo monogâmico e poligínico, tais como o lobo-guará e o cachorro-do-mato, bem como outras espécies de morcegos, como *M. molossus*, *S. lilium* e *Artibeus lituratus* (Barros

et al., 2013; Bittencourt et al., 2004; Caldeira et al., 2010; Miranda, 2012; Morais et al., 2014b), quando comparado a aqueles de comportamento poliândrico, como o sagui-de-cara-suja *Saguinus fuscicollis* (Reis et al., 2011). O ITS apresentado por *D. rotundus* sugere, portanto, um grande investimento em túbulos seminíferos, relacionado ao padrão reprodutivo promíscuo e poligínico, o que requer maior investimento nos túbulos seminíferos para apoiar a espermatogênese ao longo do ano.

4.2 Quantificação do rendimento espermatogênico

A população celular presente no estádio 1 do CES dos animais deste estudo foi maior do que o encontrado em outros morcegos (Morais et al. 2013c; Morais et al, 2014b). A maior contagem de células de Sertoli observada na estação chuvosa indica que houve um maior suporte estrutural e aporte nutricional às células germinativas. Já o aumento na população de espermatogônias do tipo A observado na estação chuvosa indica que houve maior diferenciação e proliferação destas células nesta estação, embora este aumento não tenha sido acompanhado por um aumento na população de espermatócitos primários na transição de pré-leptóteno para leptóteno. No entanto, essa maior proliferação de espermatogônias do tipo A na estação chuvosa pode estar relacionada com o maior percentual de epitélio seminífero observado nesta mesma estação.

Por outro lado, o índice mitótico e o índice de células de Sertoli foram maiores na estação seca, indicando que os túbulos seminíferos estavam se preparando para uma intensa produção espermática na estação chuvosa. O aumento no número de células germinativas que uma célula de Sertoli pode dar suporte nutricional e estrutural, também observado na estação seca, corrobora com esta hipótese de preparação para uma fase de intensificação na produção de gametas na estação seguinte.

Enquanto a reserva espermática testicular e a produção espermática diária, tanto na estação seca quanto na chuvosa, foram consideravelmente inferiores ao visto anteriormente para *D. rotundus*, o rendimento geral da espermatogênese na estação seca foi notavelmente superior ao encontrado anteriormente tanto para esta espécie quanto para outras espécies de morcegos (Morais et al., 2013a; Morais et al., 2014b; Morais et al., 2017). Isto indica que mesmo o número de espermatozoides contidos no testículo e a produção diária de espermatozoides sendo inferiores ao visto na literatura, a eficiência do processo espermatogênico como um todo, desde a espermatogônia A até as espermátides arredondadas, foi superior na estação seca. O índice mitótico e o rendimento geral da espermatogênese

maiores na seca indica que a cópula ocorre nesta estação, para que assim os nascimentos ocorram no início da chuvosa.

A capacidade de suporte total realizada pelas células de Sertoli, sobretudo na estação seca, cujo índice foi de aproximadamente 44 células, foi maior do que o observado em outros mamíferos, cuja média varia de 10 a 22 células (Zhengwei et al., 1997; Zhengwei et al., 1998; França e Russell, 1998; Costa et al., 2011), indicando uma maior eficiência destas células em *D. rotundus* na referida área de estudo, visto que em outra região do país este índice foi de aproximadamente 20 células (Morais et al., 2017). Este valor relaciona-se com o baixo número de células de Sertoli por grama de testículo encontrado neste estudo (média anual de $6,46 \times 10^6$ células) quando comparado a outros morcegos ($13,10 \times 10^7$ em *D. rotundus*, Morais et al., 2017; $28,09 \times 10^7$ em *M. molossus*, Morais et al., 2013a; $22,31 \times 10^{13}$ em *S. lilium*, Morais et al., 2014b), indicando que cada uma destas células precisou aumentar sua capacidade de suporte às células da linhagem germinativa visando prevenir prejuízos ao processo de espermatogênese. Apesar de o índice de células de Sertoli ter sido maior na estação seca, seu menor número nesta mesma estação também indicam a necessidade de estas células aumentarem sua capacidade de suporte individual.

4.3 Morfometria e morfologia do compartimento intertubular

Os elementos que compõem o compartimento intertubular não variaram significativamente entre as estações do ano avaliadas. Seus percentuais no parênquima testicular, no entanto, estiveram entre os menores valores registrados, considerando-se sua média anual (França e Russell, 1998; Morais et al., 2013b; Morais et al., 2014a), porém próximo do descrito anteriormente para a espécie (Morais et al., 2017).

As células de Leydig constituíram o principal componente do intertúbulo, assim como encontrado em outras espécies de morcegos (Morais et al., 2013b; Morais et al., 2014a). O maior investimento nestas células também está diretamente relacionado ao sistema de acasalamento poligínico apresentado por *D. rotundus*. Sendo assim, estes animais necessitam de um maior investimento androgênico, quando comparados com espécies monogâmicas como o cachorro-do-mato e o veado-catingueiro (Caldeira et al., 2010; Costa et al., 2011). No entanto, o número total de células de Leydig por grama de testículo, cuja média anual foi de $47,71 \times 10^5$ células, esteve bem abaixo do encontrado tanto nos morcegos *M. molossus* ($48,49 \times 10^6$; Morais et al., 2013b) e *S. lilium* ($11,3 \times 10^7$ células; Morais et al., 2014a) quanto no próprio *D. rotundus* ($23,77 \times 10^6$; Morais et al., 2017). Este parâmetro foi significativamente maior na

estação chuvosa, sugerindo que seriam necessários altos níveis de testosterona tanto para a manutenção da espermatogênese quanto da dominância nos haréns.

O ILS encontrado em *D. rotundus* (0,016%) foi semelhante ao observado em outros morcegos e superior ao observado em animais de maior porte, como a onça pintada e a jaguatirica (0,0036%, Azevedo et al., 2008; Sarti et al., 2011), o que também reforça a ideia de maior investimento em produção de gametas em prol da manutenção dos haréns. Por considerar a massa corpórea e não somente a massa testicular, o índice Leydigossomatico pode ser considerado um parâmetro mais apropriado para se comparar a atividade funcional das células de Leydig entre diferentes espécies do que o seu número total por grama de testículo.

4.4 Ultraestrutura e imunohistoquímica

A análise ultraestrutural das células que compõem o estágio 1 do CES mostrou-se semelhante ao observado em outras espécies de morcegos. Assim, a espermatogônia tipo A apresentou um alto grau de adesão à lâmina basal, assim como exibido por *Platyrrhinus lineatus* e *Myotis nigricans* (Beguelini et al., 2011; Beguelini et al., 2013). O típico aspecto irregular do núcleo das células de Sertoli e a ocorrência de fragmentação nucleolar nos espermátocitos primários em paquítenos também foram semelhantes ao observado em outras espécies (Beguelini et al., 2011; Bueno et al., 2014; Morais et al., 2014).

Durante a espermiogênese, alguns eventos únicos ocorrem, incluindo a formação do acrossoma, a condensação da cromatina nuclear, a eliminação do citoplasma residual e o desenvolvimento do flagelo (Suphamongmee et al., 2008). Embora esse processo seja similar na maioria dos animais, não se observou em *D. rotundus* a presença de vesículas pró-acrossômicas contendo materiais eletrondensos, o que pode estar relacionado à ausência de um perforatorium, estrutura responsável por penetrar o oócito (Shalgi e Phillips, 1982), de modo que esses materiais eletrondensos podem ser a substância básica de sua organização. Como em *D. rotundus* não foi observada a presença de perforatorium, assim como *Myotis nigricans* (Beguelini et al., 2013), não possuem esse tipo de secreção. O perforatorium está ausente ou pouco desenvolvido em Vespertilionidae (Fawcett e Ito, 1965) e Noctilionidae (Phillips et al., 1997), pouco desenvolvidos em Rhinolophidae (Lee et al., 1992; Oh et al., 1985), e bem desenvolvidos em Molossidae (Breed e Leigh, 1985) e *Platyrrhinus lineatus* (Phyllostomidae) (Beguelini et al., 2011).

No que se refere às análises imunohistoquímicas, a expressão de receptores de andrógeno mais frequente no citoplasma das células de Leydig na estação chuvosa indica uma sincronia com o pico de atividade espermatogênica nessa estação, conforme observado quanto

a maior porcentagem de epitélio seminífero e número de células de Leydig por grama de testículo observados nesta mesma estação, propondo assim, uma forte ligação entre a testosterona e o ciclo reprodutivo em *D. rotundus*. Esta relação também foi observada no morcego *Myotis nigricans*, em que a elevada expressão de receptores de andrógeno foi detectada no período de recrudescência testicular, e o período de regressão testicular esteve associado com a baixa expressão desses receptores (Beguelini et al., 2014b). A expressão de receptores de andrógeno em células de Sertoli e Leydig está associada com a diferenciação das espermatogônias e com a espermiogênese (Beguelini et al., 2014b; Holdcraft e Braun, 2004; Wang et al., 2009).

De modo semelhante, a Aromatase também apresentou maior expressão no citoplasma dos espermátócitos primários na transição Pré-Leptóteno/Leptóteno na estação chuvosa. Deste modo, *D. rotundus* obteve o aporte hormonal tanto de andrógenos como de estrógenos necessário para o seu processo espermatogênico no período de maior produção de gametas.

Os fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs) são reguladores locais que afetam a proliferação celular, a meiose e a diferenciação celular (Niederberger et al., 1993). Foi observado anteriormente a expressão da proteína FGF2 no citoplasma de espermatogônias, de células de Leydig em bovinos, de espermatogônias em roedores adultos, humanos e cervídeos (Abd-Elmaksoud et al., 2005; Han et al. 1993; Steger et al. 1998; Wagener et al. 2003). No entanto, nosso estudo mostrou marcação em espermátócitos e espermátides, o que corrobora com a atuação do FGF2 na meiose e na diferenciação celular.

A proteína anti-apoptótica BCL-2 é um dos mais importantes reguladores da via intrínseca do apoptose. Sua expressão nos testículos de *D. rotundus* foi semelhante ao observado no roedor *Lagostomus maximus*, em que a expressão de BCL-2 foi detectada apenas em espermátócitos e espermátides arredondadas, no período ativo da espermatogênese (González et al. 2018). No entanto, esta proteína foi expressa em espermatogônias no período inativo, tanto em *L. maximus* quanto no hamster *Phodopus sungorus* (Furuta et al. 1994; González et al. 2018), o que difere do encontrado em *D. rotundus* no presente estudo, onde não se observou variação sazonal da expressão do BCL-2, possivelmente devido à ausência de um período de inatividade espermatogênica, conforme ocorre em *L. maximus* e *Phodopus sungorus*. A expressão semelhante tanto do FGF2 quanto da BCL-2 ao longo das estações seca e chuvosa indica ausência de um período de regressão testicular em *D. rotundus* na área de estudo.

Pode-se concluir que *D. rotundus* apresentou, de um modo geral, elevada população celular no epitélio seminífero e maiores diâmetros tubulares e desenvolvimento epitelial, tanto

quando comparado a outras espécies de morcegos quanto a outros grupos de mamíferos. O aumento do índice mitótico, índice de células de Sertoli, e do rendimento geral da espermatogênese na estação seca indicaram preparação para uma maior ocorrência de espermição na estação chuvosa subsequente, o que pôde ser comprovado pelo aumento de parâmetros como o percentual dos túbulos seminíferos representados pelo epitélio seminífero e do número de células de Sertoli e de Leydig por grama de testículo, assim como a expressão de receptores de andrógeno mais frequente no citoplasma das células de Leydig e a maior expressão da aromatase no citoplasma dos espermatócitos primários na transição Pré-Leptóteno/Leptóteno na estação chuvosa. Estes resultados indicam, portanto, espermatogênese contínua ao longo do ano e sugerem uma maior produção de espermatozoides por *D. rotundus* na estação chuvosa na Caatinga nordestina.

5. Referências bibliográficas

ABD-ELMAKSOU, A.; VERMEHREN, M.; NÜTZEL, F.; HABERMANN, F.A. SINOWATZ, F. Analysis of fibroblast growth factor 2 (FGF2) gene transcription and protein distribution in the bovine testis. *Growth Factors*, v. 23, n. 4, p. 295–301, 2005.

ABERCROMBIE M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat Rec*, v. 94, p. 238–248, 1946.

AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive Capacity of Dairy Bulls. VIII. Direct and Indirect Measurement of Testicular Sperm Production. *Journal of Dairy Science*, 1962.

AMANN, R.P. Sperm production rates. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL (eds) The testis. New York. Academic Press. p. 433-482, 1970.

AZEVEDO, M. H. F.; PAULA, T.A.R.; BALARINI, M. K.; MATTA, S.L.P.; PEIXOTO, J. V.; GUIÃO LEITE, F. L.; ROSSI, J. L.; COSTA, E.P. Organization and quantification of the elements in the intertubular space in the adult jaguar testis (*Panthera onca*, LINNAEUS, 1758). *Micron*, v. 39, n. 8, p. 1166–1170, 2008.

BARROS, M.S.; MORAIS, D.B.; ARAÚJO, M.R.; CARVALHO, T.F.; MATTA, S.L.P.; PINHEIRO, E.C.; FREITAS, M.B. Seasonal variation of energy reserves and reproduction in neotropical free-tailed bats *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Brazilian Journal of Biology*, v. 73, n. 3, p. 629–635, 2013.

BEGUELINI, M.R.; FALLEIROS, L.R.; GÓES, R.M.; RAHAL, P.; MORIELLE-VERSUTE, E.; TABOGA, S.R. Differential expression of aromatase, estrogen receptor alpha and 17 β -HSD associated with the processes of total testicular regression and recrudescence in the bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *General and Comparative Endocrinology*, v. 201, p. 53–64, 2014a.

BEGUELINI, M.R.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Two periods of total testicular regression are peculiar events of the annual reproductive cycle of the black Myotis bat, *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Reproduction, Fertility and Development*, v. 26, n. 6, p. 834–846, 2014b.

BEGUELINI, M.R.; PUGA, C.I.C.; TABOGA, S.R.; MORIELLE-VERSUTE, E.. Ultrastructure of spermatogenesis in the white-lined broad-nosed bat, *Platyrrhinus lineatus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Micron*, v. 42, n. 6, p. 586–599, 2011.

- BEGUELINI, M.R.; TABOGA, S.R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Ultrastructural characteristics of the spermatogenesis during the four phases of the annual reproductive cycle of the black myotis bat, *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Microscopy Research and Technique*, v. 76, n. 10, p. 1035–1049, 2013.
- BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J. Anim. Sci.* 44 (5), 818–883, 1977.
- BITTENCOURT, V.L.; Paula, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; FONSECA, C.C.; NEVES, M.T.D.; COSTA, M.E.L.; MALTA, M.C.C.; COELHO, C.M.; BASTOS, J.A.B. Avaliação da população celular do epitélio seminífero e índices indicativos da produção espermática, através de biópsia testicular em lobo-Guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) adulto. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 28, n. 2, p. 108-113, 2004.
- BREED, W.G.; LEIGH, C. Sperm head morphology of Australian molossid bats with special reference to the acrosomal structure. *Mammalia*, v. 49, p. 403–406, 1985.
- BUENO, L.M.; BEGUELINI, M.R.; COMELIS, M.T.; TABOGA, S.R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Ultrastructure of spermatogenesis, spermatozoon and processes of testicular regression and recrudescence in *Eptesicus furinalis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Animal Reproduction Science*, v. 148, n. 3–4, p. 228–244, 2014.
- CALDEIRA, B. C. PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; BALARINI, M.K.; CAMPOS, P.K.A.. Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). *Revista Ceres*, v. 57, n. 5, p. 569–575, 2010.
- COSTA, K.L.C.; MATTA, S.L.P.; GOMES, M.L.M.; PAULA, T.A.R.; FREITAS, K.M.; CARVALHO, F.A.R.; SILVEIRA, J.A.; DOLDER, H.; MENDIS- HANDAGAMA, S.M.L.C. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Anim Reprod Sci*, v. 127, p.202–212, 2011.
- CRICHTON, E.G.; KRUTZSCH, P.H. *Reproductive biology of bats*. In: Racey PA, Entwistle AC (eds.), *Life-history and Reproductive Strategies of Bats*. London: [s.n.], 2000.
- FAWCETT, D.W., ITO, S. The fine structure of bat spermatozoa. *Amer. J. Anat*, v. 116, p. 567–610, 1965.
- FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: Martinez- Garcia, F., Regadera, J. (Eds.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Churchill Livingstone, Madrid, pp.197-219, 1998

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

FURUTA, I.; PORKKA-HEISKANEN, T.; SCARBROUGH, K.; TAPANAINEN, J.; TUREK, F.W.; HSUEH, A.J. Photoperiod regulates testis cell apoptosis in Djungarian hamsters. *Biology of Reproduction*, v. 51, p. 1315–1321, 1994.

GONZÁLEZ, C.R.; MUSCARSEL ISLA, M.L.; VITULLO, A.D. The balance between apoptosis and autophagy regulates testis regression and recrudescence in the seasonal-breeding South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus*. *PLoS ONE*, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2018.

HAN, I.S.; SYLVESTER, S.R.; KIM, K.H.; SCHELLING, M.E.; VENKATESWARAN, S.; BLANCKAERT, V.D.; MCGUINNESS, M.P.; GRISWOLD, M.D. Basic fibroblast growth factor is a testicular germ cell product which may regulate sertoli cell function. *Mol Endocrinol*, v. 7, p.889–897, 1993.

HOLDCRAFT, R.W.; BRAUN, R.E. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development*, v. 131, p. 459–467, 2004.

JOHNSON, L.; PETTY, C.S.; NEAVES, W.B. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biol. Reprod.*, v. 25, n. 217-226, 1981.

KARNOVSKY, M.J. A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. *Cell Biology Source: The Journal of Cell Biology*, 1965.

KUNZ, T. H.; ANTHONY, E. L. P. Age Estimation and Post-Natal Growth in the Bat *Myotis lucifugus*. *Journal of Mammalogy*, 1982.

LEE, J.H.; CHOI, B.J.; SON, S.W. Spermiogenesis in the Korean Greater Horseshoe Bat, *Rhinolophus ferrumequinum korai*. *Kor J Electron Microsc*, v. 22, p. 97–117, 1992.

LIMA JÚNIOR., N.B.; ARANDAS; M.J.G.; MARINHO; K.S.N.; AGUIAR J.; F.C.A.; PONTES. A.R.M.; SANTOS. K.R.P. Histomorfometria testicular do morcego *Phyllostomus discolor* (Chiroptera: Phyllostomidae) em áreas de Mata Atlântica de Pernambuco. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 51, n. 3, p. 263-270, 2014.

LORD, R. D. Seasonal Reproduction of Vampire Bats and Its Relation to Seasonality of Bovine Rabies. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 28, n. 2, p. 292–294, 1992.

MAYEN, F. Haematophagous Bats in Brazil, Their Role in Rabies Transmission, Impact on

Public Health, Livestock Industry and Alternatives to an Indiscriminate Reduction of Bat Population. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. [S.l.: s.n.], 2003.

MIRANDA, D.C. Efeito dos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol sobre parâmetros testiculares do morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) [TESE]. Federal University of Viçosa, Brazil, 2012.

MORAIS, D.B.; BARROS, M.S.; FREITAS, M.B.D; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L. Histomorphometric characterization of the intertubular compartment in the testes of the bat *Sturnira lilium*. *Animal Reproduction Science*, v. 147, n. 3–4, p. 180–186, 2014a.

MORAIS, D.B.; BARROS, M. S.; PAULA, T.A.R.; FREITAS, M.B.; GOMES, M.L.; MATTA, S.L. Evaluation of the cell population of the seminiferous epithelium and spermatid indexes of the bat *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae). *PLoS ONE*, v. 9, n. 7, 2014b.

MORAIS, D.B. CUPERTINO, M.C.; GOULART, L.S.; FREITAS, K.M.; FREITAS, M.B.; 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*, v. 140, n. 3–4, p. 268–278, 2013a.

MORAIS, D.B.; OLIVEIRA, L. C.; MATTA, S. L. P.; CUPERTINO M. C.; FREITAS, K. M.; FREITAS, M. B. D. Organization and seasonal quantification of the intertubular compartment in the bat *Molossus molossus* (Pallas, 1776) testis. *Microscopy Research and Technique*, v. 76, n. 1, p. 94–101, 2013b.

MORAIS, D.B.; PAULA, T.A.R; BARROS, R.S.; BALARINI, M.K; FREITAS, M.B.D.; MATTA, S.L.P. Stages and duration of the seminiferous epithelium *Molossus molossus* (Chiroptera, Molossidae) testis: The tubular compartment and indices of sperm production. *Anim. Reprod. Sci.* 140: 268-278. 2013c.

MORAIS, D. B.; PUGA, L.C.H.P.; PAULA, T.A.R.; FREITAS, M.B.D.; MATTA, S.L.P. The spermatogenic process of the common vampire bat *Desmodus rotundus* under a histomorphometric view. *PLoS ONE*, v. 12, n. 3, p. 1–18, 2017.

NEUWEILER, G. The biology of bats. New York: Oxford University Press, 2000.

NIEDERBERGER, C.S.; SHUBHADA, S.; KIM, S.J.; LAMB, D.J. Paracrine factors and the regulation of spermatogenesis. *World J Urol*, v. 11, p. 120–128, 1993.

- OH, Y.K.; MORI, T.; UCHIDA, T.A. Spermiogenesis in the Japanese Greater Horseshoe Bat, *Rhinolophus ferrumequinum* Nippon. *J Fac Agric Kyushu Uni*, v. 29, p. 203–209, 1985.
- PEREIRA FILHO, J. M.; SILVA, A.M. A.; CÉZAR, M.F. Manejo da caatinga para produção de caprinos e ovinos. *Revista Brasileira de Saude e Producao Animal*, v. 14, n. 1, p. 77–90, 2013.
- PHILLIPS, D.M.; RASWEILER, J.J.; MURWALI, F. Giant, accordioned sperm acrosomes of the greater bulldog bat, *Noctilio leporinus*. *Mol Reprod Dev*, v. 48, p. 90–94, 1997.
- REIS, NR.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. Morcegos do Brasil. Ecologia, 2007.
- REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, A.W.; LIMA, I.P. DE. *Mamíferos do Brasil*. 2ed. ed. Londrina: [s.n.], 2011.
- ROOSEN-RUNGE, E.C. The process of spermatogenesis in animals. Cambridge: Academic Press, p. 123, 1977.
- SARTI, P.; PAULA, T.A.R.; POLLI, G.O.; DECO SOUZA, T.; ARAUJO, G.R.. Morfofisiologia do tecido intertubular e das células de Leydig de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) adulta. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v. 63, n. 5, p. 1060–1065, 2011.
- SHALGI, RUTH; PHILLIPS, DAVID M. Sperm Penetration into Rat Ova Fertilized In Vitro. *Journal of Andrology*, v. 3, n. 6, p. 382–387, 1982.
- STEGER, K.; TETENS, F.; SEITZ, J.; GROTHE, C.; BERGMANN, M. Localization of fibroblast growth factor 2 (fgf-2) protein and the receptors fgfr 1–4 in normal human seminiferous epithelium. *Histochem Cell Biol*, v. 110, p. 57–62, 1998.
- SUPHAMUNGMEE, W.; WANICHANON, C.; VANICHVIRIYAKIT, R.; SOBHON, P. Spermiogenesis and chromatin condensation in the common tree shrew, *Tupaia glis*. *Cell Tissue Res*, v. 331, p. 687–699, 2008.
- WAGENER, A.; BLOTTNER, S.; GORITZ, F.; STREICH, W.J.; FICKEL, J. Differential changes in expression of a and b fgf, igf-1 and -2, and tgf-alpha during seasonal growth and involution of roe deer testis. *Growth Factors*, v. 21, p. 95–102, 2003.
- WANG, R.S.; YEH, S.; TZENG, C.R.; CHANG, C. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell- specific androgen receptor knockout mice. *Endocr. Ver*, v. 30, n. 2, p. 119–132, 2009.

WILKINSON, G.S. The social organization of the common vampire bat, I. Pattern and cause of association. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, n. 17, p. 111–121, 1985.

WILSON, D.E.; FINDLEY, J.S. Reproductive cycle of a Neotropical insectivorous bat *Myotis nigricans*. *Nature*, v. 225, n.1155, 1970.

ZHENGWEI, Y.; MCLACHLAN, R.I.; BREMMER, W.J.; WREFORD, N.G. Quantitative (stereological) study of the normal spermatogenesis in the adult monkey (*Macaca fascicularis*). *J Androl*, v. 18, n. 6, p. 681-687, 1997.

ZHENGWEI, Y.; WREFORD, N.G.; ROYCE, P.; KRETSER, D.M.; MCLACHLAN, R.I. Stereological evaluation of human spermatogenesis after suppression by testosterone treatment: heterogenous pattern of spermatogenic impairment. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 83, n. 4, p.1284-1291, 1998.

Artigo 2

Caracterização testicular e espermatogênese do morcego hematófago *Diphylla ecaudata*

Resumo

Diphylla ecaudata é um morcego vampiro de distribuição restrita, e que possui preferência alimentar pelo sangue de aves. Não foram encontrados estudos acerca da atividade reprodutiva desta espécie. Assim, objetivou-se neste estudo descrever a morfologia e a histomorfometria dos testículos de *D. ecaudata*, a fim de se conhecer sua biologia reprodutiva e espermatogênese. Os animais foram coletados no município de Lajes-RN. Após procedimentos de eutanásia, seus testículos foram processados histologicamente para inclusão em historesina para análises morfológicas e morfométricas sob microscopia de luz, em resina Spurr para análise da ultraestrutura celular sob microscopia eletrônica de transmissão, bem como em parafina histológica para análise imuno-histoquímica da expressão de receptores para andrógeno, aromatase, FGF2 e BCL-2. *D. ecaudata* apresentou índice gonadossomático de 0,49%, índice tubulossomático de 0,47% e comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo de 32,20 m. As fases pré-meiótica, meiótica e pós-meiótica representaram, respectivamente, 56,20%, 9,30% e 34,50% do ciclo do epitélio seminífero desta espécie. A ultraestrutura da espermatogênese foi semelhante ao descrito nos demais mamíferos, e o perforatorium não foi observado em seus espermatozoides. Os receptores de andrógeno foram detectados nos núcleos das células de Sertoli e no citoplasma das células de Leydig, enquanto que a Aromatase foi detectada apenas nos núcleos das células de Sertoli. Foi detectada atividade do FGF2 e da BCL-2 no citoplasma dos espermátócitos primários em Zigóteno e em Paquíteno, bem como nas espermátides arredondadas e alongadas. Conclui-se que *D. ecaudata* apresentou padrão testicular semelhante ao de outros mamíferos, e características comuns às descritas em outras espécies de morcegos. Esta espécie destacou-se por apresentar grande eficiência de células de Sertoli, as quais desempenharam uma alta capacidade de suporte às células da linhagem germinativa, e uma elevada reserva espermática testicular. Este estudo constitui o primeiro passo para o conhecimento da reprodução de *D. ecaudata*, sendo esta a primeira descrição acerca de sua espermatogênese.

Palavras-chave: Biologia reprodutiva, Morfologia, Ultraestrutura, Imunohistoquímica.

1. Introdução

Diphylla ecaudata é uma espécie relativamente rara de morcego hematófago, e data de 2017 o primeiro registro para a espécie no estado brasileiro do Rio Grande do Norte (Vargas-Mena et al., 2018). Ocupando o segundo lugar em frequência de capturas, atrás de *Desmodus rotundus*, esta espécie não causa grandes impactos econômicos e epidemiológicos, o que se deve principalmente ao fato de possuir preferência alimentar pelo sangue de aves (Greenhall et al., 1984 Uieda, 1992; Reis et al., 2007).

Uma vez que a disponibilidade natural de presas selvagens para *D. ecaudata* foi severamente reduzida na Caatinga, um dos biomas mais antropizados no Brasil, aves domésticas passaram a figurar como presas mais acessíveis e abundantes (Uieda, 1994; Leal et al., 2003). Esta flexibilidade alimentar, associada à escassez de aves nativas na Caatinga, refletiu no primeiro registro de sangue humano na dieta dessa espécie em condições naturais (Ito et al., 2016). Assim, o impacto dos efeitos antropogênicos no equilíbrio ecológico de *D. ecaudata* refletem não apenas em sua importância ecológica como também medico-sanitária e econômica, lançando à luz a necessidade de se conhecer melhor a espécie, visando um manejo racional. Para tal, é fundamental o conhecimento sobre sua reprodução.

Este conhecimento é extremamente limitado, o que se relaciona à sua distribuição mais restrita (Reis et al., 2007). Os poucos estudos acerca de sua reprodução abordam aspectos das fêmeas. Assim, sabe-se que *D. ecaudata* apresenta um período de gestação de aproximadamente 5,5 meses, com os nascimentos ocorrendo durante a primavera e verão, o que coincide com o nascimento das aves domésticas e nativas na América Latina. Nasce usualmente um filhote por gestação e ocasionalmente podem ser gerados dois descendentes por ano. A prole permanece por cerca de 220 dias sob os cuidados da mãe e os indivíduos são sexualmente ativos a partir dos 9 meses de idade (Delpietro e Russo, 2002; Scheffer, 2015). Não foram encontrados estudos acerca da atividade reprodutiva dos machos desta espécie, bem como quaisquer relatos acerca de sua atividade gonadal.

Neste sentido, objetivou-se neste estudo descrever a morfologia e a ultraestrutura dos testículos de *D. ecaudata*, bem como a realização da histomorfometria testicular, a fim de se conhecer sua biologia reprodutiva e espermatogênese.

2. Materiais e métodos

2.1 Área de estudo e coleta dos animais

As capturas foram realizadas no município de Lajes, Rio Grande do Norte (05° 42' 00" S e 36° 14' 41" W) no ano de 2017. Foi obtida autorização para captura e transporte dos animais junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, licença N° 55562-1) e para os procedimentos de eutanásia junto à Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRN (CEUA, licença N° 056/2016).

Seis espécimes de *D. ecaudata* machos adultos foram capturados ao anoitecer, com a utilização de redes de neblina armadas nas entradas de galerias de minérios abandonadas, que os animais utilizam como abrigos. Os animais adultos foram identificados com base na observação da fusão da cartilagem epifisária do quarto dedo, na junção metacarpo-falangeal (Kunz e Anthony, 1982).

Os animais foram transportados à cidade de Natal-RN na manhã seguinte à captura, em sacos apropriados para contenção e transporte de morcegos, e a eutanásia foi feita no mesmo dia. Realizou-se anestesia por via intraperitoneal com 50 mg/kg de Xilasina e 80 mg/kg de Cetamina, seguindo-se a pesagem dos animais e remoção do sistema reprodutor. A eutanásia foi realizada em seguida por aprofundamento do plano anestésico, utilizando-se 150 mg/kg de Xilasina e 240 mg/kg de Cetamina.

2.2 Processamento histológico

Um testículo de cada animal foi fixado em solução de Karnovsky (1965) e destinado às análises morfológicas e morfométricas sob microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, enquanto que o outro testículo foi fixado com Paraformaldeído a 4% e destinado a análises imunohistoquímicas. Após 24 h todos os testículos fixados em solução de Karnovsky foram transferidos para etanol 70%, pesados e encaminhados ao Laboratório de Biologia Estrutural e da Reprodução, Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde foram processados histologicamente para inclusão em Glicol-Metacrilato (Historesin®, Leica), sendo obtidas secções com 3 µm de espessura usando micrótomo rotativo automático (Leica RM2255). As preparações foram coradas com azul de toluidina / borato de sódio 1% (Merck) para as análises morfológicas e morfométricas.

Fragmentos teciduais foram encaminhados ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (UnB), onde foram processados

para análise ultraestrutural. As amostras foram pós-fixadas por 1h em tetróxido de ósmio 2% e ferricianeto de potássio 1,6%, em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, seguido por contração em solução aquosa de acetato de uranila 0,5% overnight. A desidratação foi realizada em séries crescentes de acetona, de 30% a 100%, e os fragmentos foram embebidos em resina Spur (Sigma-Aldrich®). Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 e 80 kV.

Para as análises imuno-histoquímicas foram obtidas secções testiculares a 4 µm de espessura, em lâminas sinalizadas. Cada secção foi desparafinizada, reidratada, lavada com Triton X-100 a 0,3% em tampão fosfato e incubada com peroxidase endógena (3% peróxido de hidrogênio). Procedeu-se a incubação durante a noite a 4° C, com os anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology, Inc. EUA) contra a proteína pré-apoptótica BCL-2 (1:400), contra o Fator de crescimento de fibroblasto FGF2 (1:400), contra a enzima Aromatase (1:200) e contra o receptor de andrógeno (1:200). As lâminas foram lavadas com tampão fosfato e incubadas com anticorpo secundário estreptavidina/HRP-conjugados (Biocare Medical, EUA) por 30 min. A imunorreatividade para os anticorpos foi visualizada por detecção colorimétrica, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (TrekAvidin-HRP Label + Kit da Biocare Medical, Dako, EUA). As secções foram contracoradas com hematoxilina e as áreas que apresentaram imunorreatividade foram fotografadas através do fotomicroscópio Nikon E200 LED (Departamento de Morfologia, UFRN). Considerando-se as células que apresentaram marcação para cada um dos anticorpos utilizados, para cada tipo celular estimou-se o número de células que apresentaram marcação positiva em relação ao número destas mesmas células que não apresentaram marcação, em uma área de aproximadamente 40.000 µm² por secção tubular avaliada. Utilizou-se, portanto, a equação: [(n° de células marcadas / n° de células não marcadas) / n° de secções analisadas].

2.3 Morfometria testicular

Para realização das análises morfométricas, foram realizadas capturas de imagens das lâminas histológicas em diferentes aumentos, utilizando-se fotomicroscópio Olympus BX50 (Departamento de Biologia Geral, UFV) ou BEL Bio2/3 Eureka 5.0 (Departamento de Morfologia, UFRN). A análise das imagens foi realizada com base na estereologia testicular, utilizando-se o *software* Image-Pro Plus®.

O índice gonadosomático (IGS) foi calculado para quantificar o investimento em testículos em relação a massa corporal, dividindo-se o peso dos dois testículos pelo peso corporal, sendo esse valor multiplicado por 100. As proporções volumétricas entre os

elementos que constituem os compartimentos tubular e intertubular do testículo foram mensuradas a partir da contagem de 3.520 pontos por animal, a partir de 352 pontos projetados sobre 10 imagens histológicas, em aumento de 10x, obtidas em cortes histológicos distintos do testículo de cada animal. Assim, no túbulo seminífero foram determinados os pontos coincidentes sobre a túnica própria, o epitélio seminífero e o lúmen, bem como os pontos sobre o compartimento intertubular. Estimou-se ainda o percentual representado pela túnica albugínea, a partir da contagem do número de pontos coincidentes sobre esta ou sobre o parênquima testicular.

Posteriormente foram projetados 1.000 pontos sobre o compartimento intertubular, em aumento de 40x, sendo quantificadas as células de Leydig, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo, determinando-se assim as proporções volumétricas entre cada componente. Os percentuais destes componentes no intertúbulo foram estimados a partir da multiplicação do número total de pontos coincidentes sobre cada componente por 100, dividido por 1000. Já o percentual desses componentes no testículo foi obtido a partir da multiplicação do Percentual de intertúbulo pelo Percentual de cada componente no intertúbulo dividindo-se por 100. Para o cálculo do volume total de cada um dos componentes intertubulares no parênquima testicular, foi utilizada a fórmula: (Porcentagem de cada componente no testículo x Peso gonadal líquido) / 100. Os valores médios foram expressos em μL . Considerando que a densidade do testículo é em torno de 1 (Johnson et al., 1981), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

O volume dos túbulos seminíferos (VTS) é uma função do volume do testículo e da proporção volumétrica destes túbulos no parênquima testicular. O índice tubulosomático (ITS) foi calculado para quantificar o investimento nos túbulos seminíferos em relação à massa corporal total. O ITS foi obtido dividindo-se o VTS pelo peso corporal e multiplicando o resultado por 100. O diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero foram obtidos medindo-se 20 secções transversais tubulares, que apresentaram a forma mais circular possível, independentemente do estágio do ciclo do epitélio seminífero. Nas mesmas secções utilizadas para mensurar o diâmetro foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da túnica própria até o lúmen tubular. O comprimento dos túbulos seminíferos (CT) por testículo foi estimado utilizando a fórmula: $CT = VTS / \pi R^2$, onde πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos e R = diâmetro tubular/2. Esse valor foi dividido pelo peso dos testículos para calcular o comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo.

O diâmetro médio do núcleo da célula de Leydig foi obtido a partir da mensuração de 30 células por animal, escolhendo aquelas com os núcleos mais esféricos e nucléolos evidentes.

O volume nuclear foi obtido pela fórmula $4 / 3\pi R^3$, onde $R = \text{diâmetro nuclear} / 2$. O volume citoplasmático foi estimado pela multiplicação da porcentagem de citoplasma pelo volume nuclear, dividido pela porcentagem nuclear. O volume individual de cada célula foi estimado pela soma dos volumes nucleares e citoplasmáticos. Estes valores foram expressos em μm^3 . O volume total ocupado pelas células de Leydig no parênquima testicular foi obtido através da multiplicação da porcentagem de células de Leydig no testículo pelo peso gonadal, e em seguida dividido por 100. O número de células de Leydig por testículo foi estimado a partir dos volumes individuais da célula de Leydig e o volume total ocupado pelas células de Leydig no parênquima testicular. Esse valor foi dividido pelo peso dos dois testículos, para se estimar o número de células de Leydig por grama de testículo, o que permite comparações entre diferentes espécies. O índice Leydigossomatico, que quantifica o investimento em células de Leydig com relação à massa corporal, foi estimado dividindo o volume total de células de Leydig no parênquima testicular pelo peso corporal, multiplicado por 100.

2.4 Caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero

Os estágios do ciclo do epitélio seminífero (CES) foram caracterizados pelo método de morfologia tubular (Berndtson, 1977). Foram caracterizados oito estágios baseados na forma e localização do núcleo das espermatídes e espermatócitos, bem como na morfologia das espermatogônia e na ocorrência de figuras da divisão meiótica. A frequência relativa de cada um dos estágios foi calculada com base na identificação e ocorrência de cada estágio em 200 seções transversais de túbulos seminíferos analisadas em cada animal. Assim, a frequência de cada estágio foi obtida a partir da fórmula: (contagem obtida para cada estágio / número de animais do grupo) / 2.

2.5 Quantificação do rendimento espermatogênico

A população de cada tipo de célula germinativa foi estimada contando-se os núcleos das células germinativas e nucléolos das células de Sertoli presentes no estágio 1 do CES, pela análise de 10 seções transversais tubulares por animal. Os diâmetros nucleares de 30 espermatogônias tipo A (A), espermatócitos primários em pré-leptoteno/leptoteno (PL-L), espermatócitos primários em paquíteno (P), espermatídes arredondadas (Ar) e nucléolos de células de Sertoli (S) foram medidos. As contagens foram corrigidas considerando-se a espessura de corte histológico e os diâmetros nucleares ou nucleolares, de acordo com a metodologia proposta por Abercrombie (1946), modificada por Amann e Almquist (1962).

A eficiência intrínseca da espermatogênese foi calculada a partir das taxas encontradas entre os números corrigidos das células germinativas, a fim de se quantificar a eficiência da espermatogênese. Calculou-se assim o índice mitótico, $(PL-L / A)$, a fim de se determinar a perda ou degeneração ocorrida durante a fase espermatogonial; o índice meiótico (Ar / P) , a fim de se determinar a eficiência das divisões meióticas; e o rendimento geral da espermatogênese (Ar/A) , quantificando-se a eficiência do processo espermatogênico como um todo. Determinou-se também o índice de células de Sertoli, que indica a capacidade de suporte destas células pelo número total de células germinativas $(A + PL-L + PC + Ar) / S$. O número total de células de Sertoli por testículo foi obtido multiplicando seu número corrigido pelo comprimento tubular por testículo (em μm) e dividindo-se esse valor pela espessura do corte histológico (Johnson et al., 1981). O número de células de Sertoli por grama de testículo foi obtido dividindo o valor anterior pelo peso testicular total.

Tendo em vista que a perda celular não é significativa na espermiogênese, a reserva espermática testicular (RET), ambos por testículo ou por grama de testículo, foram calculados com base na população de espermátides arredondadas no estágio 1 do CES, utilizando a fórmula: $RET = (\text{comprimento dos túbulos seminíferos} / \text{espessura do corte histológico}) \times \text{número corrigido de espermátides arredondadas por seção transversal}$ (Berndtson, 1977).

3. Resultados

3.1 Biometria e morfometria dos túbulos seminíferos

Na tabela 1 encontram-se os valores médios referentes à biometria e às proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular de *D. ecaudata*, e esta organização é apresentada na figura 1. Os animais apresentaram peso corporal médio de 24,64 g e peso testicular médio de 0,12 g, sendo que 8,39 % dos testículos foram representados pela túnica albugínea. O parênquima testicular apresentou-se composto predominantemente por túbulos seminíferos, e o compartimento tubular foi composto em sua maior parte pelo epitélio seminífero.

O volume tubular médio foi de 0,12 mL, resultando em um ITS de 0,47 %. Enquanto que o diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero apresentaram valores médios de 195,09 μm e 44,26 μm , respectivamente. Um total de 3,90 m de túbulos seminíferos formaram os testículos de *D. ecaudata*, sendo 32,20 m de túbulos seminíferos por grama de testículo.

Tabela 1. Médias da biometria e morfometria de componentes testiculares do morcego *Diphylla ecaudata*. Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Média ±desvio padrão
Peso corporal (g)	24,64±1,45
Peso gonadal (g)	0,12±0,04
Índice gonadosomático (IGS) (%)	0,49±0,17
Túnica albugínea (%)	8,39±1,27
Túbulos seminíferos (%)	95,98±0,92
Volume tubular (mL)	0,12±0,04
Túnica própria (%)	4,49±0,61
Epitélio seminífero (%)	63,37±3,13
Lúmen (%)	28,13±3,44
Intertúbulo (%)	4,02±0,92
Índice tubulossomático (%)	0,47±0,16
Diâmetro do túbulo seminífero (µm)	195,09±6,00
Altura do epitélio seminífero (µm)	44,26±4,31
Comprimento tubular por testículo (m)	3,90±1,31
Comprimento tubular por grama de testículo (m/g)	32,20±2,00

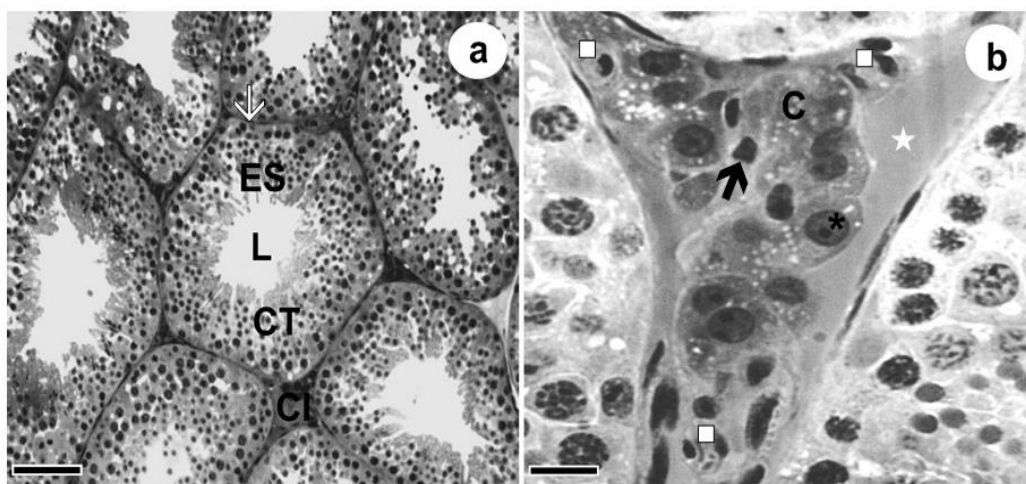


Figura 1. Secções transversais dos testículos de *Diphylla ecaudata*. **C:** Citoplasma de Leydig; **CI:** Compartimento intertubular; **CT:** Compartimento tubular; **ES:** Epitélio seminífero; **L:** Lúmen ; **☆:** Vaso linfático; **□:** Vaso sanguíneo; *****: Núcleo da célula de Leydig; **Seta branca:** Túnica própria; **Seta preta:** Tecido conjuntivo. Barra: a: 30 µm, b: 10 µm.

3.2 Estádios do ciclo do epitélio seminífero

Na figura 2 são apresentados os 8 estádios que compõem o CES de *D. ecaudata*, de acordo com o método da morfologia tubular. Células de Sertoli e espermatogônias tipo A foram observadas em todos os estádios. Durante a mitose espermatogonial, a espermatogônia

do tipo A passa por transição para o tipo intermediário, o que apareceu no estágio 6, enquanto a espermatogônia de tipo B surgiu no estágio 7. A espermatogônia do tipo B origina o espermatócito primário em pré-leptóteno no estágio 8 e esse tipo celular inicia a primeira divisão meiótica. A transição de pré-leptóteno para leptóteno ocorre nos estágios 1 a 2, originando o espermatócito primário em zigóteno no estágio 2. Este espermatócito foi observado até o estágio 4, onde originou o espermatócito primário em paquíteno. Neste estágio o espermatócito primário em paquíteno originou o espermatócito primário em diplóteno, ocorrendo assim o término da primeira divisão meiótica, seguido pela segunda divisão meiótica, originando os espermatócitos secundários. Uma vez que a segunda divisão meiótica é mais rápida do que a primeira, o espermatócito secundário originou rapidamente as espermátides arredondadas, ainda no estágio 4. Essas espermáticas arredondadas recém-formadas iniciam o processo de alongamento apenas no próximo estágio 2, sendo, portanto, vistas tanto até o final do CES corrente quanto até o início do ciclo seguinte. Assim, a partir do estágio 3 surgem as espermátides alongadas, que serão visualizadas até o estágio 8.

Portanto, enquanto diferentes gerações de espermatócitos podem ser vistas nos estágios 1 a 8, apenas uma geração de espermátides é observada nos estágios 1 a 3 e duas gerações de espermátides podem ser observadas nos estágios 5 ao 8 (Figura 4). O estágio 4 é caracterizado pela transição de espermatócitos primários em diplóteno para espermatócitos secundários, e destes para espermátides arredondadas. Nos estágios 5 a 8 podem ser observadas tanto estas espermátides arredondadas recém-formadas quanto as espermátides alongadas que iniciaram seu alongamento no estágio 2, e sofrerão espermição no estágio 8.

De acordo com as frequências médias representadas por cada estágio (Figura 3), as fases pré-meiótica (estágios 1 a 3), meiótica (estágio 4) e pós-meiótica (estágios 5 a 8) representaram respectivamente 56,20%, 9,30% e 34,50% do CES de *D. acaudata*.

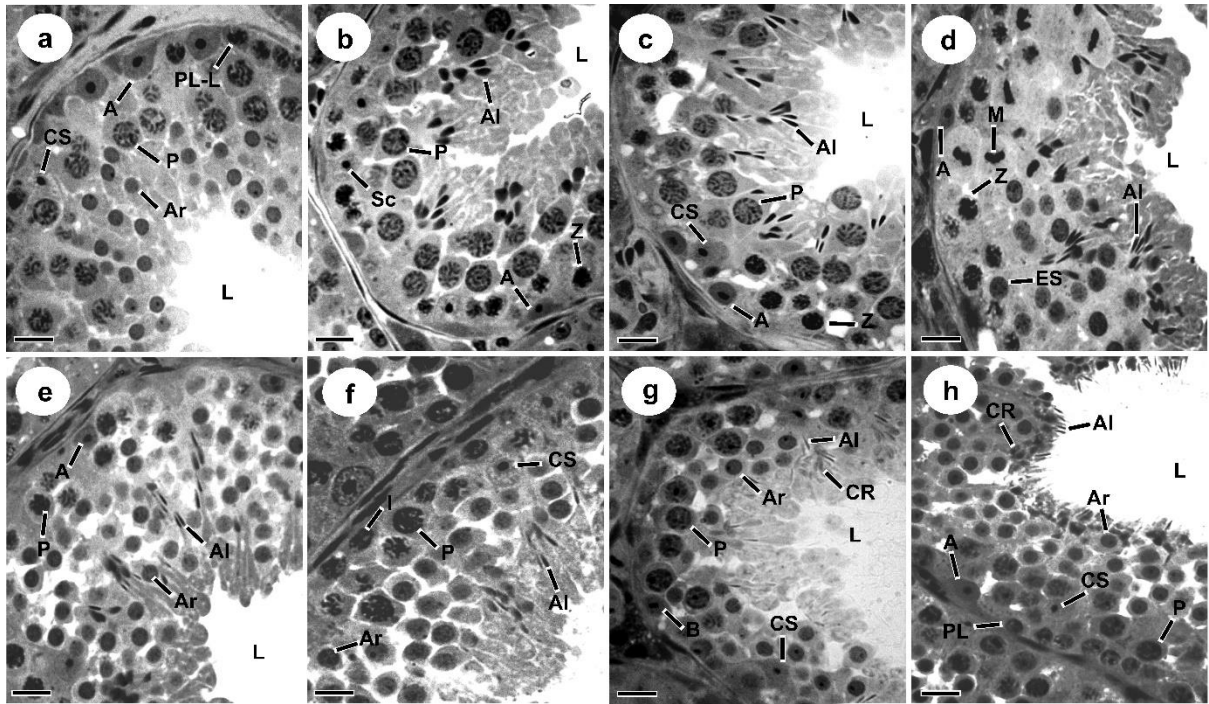


Figura 2. Secções transversais dos testículos de *Diphylla ecaudata* ilustrando os 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero, de acordo com o método a morfologia tubular. **a:** Estádio 1; **b:** Estádio 2; **c:** Estádio 3; **d:** Estádio 4; **e:** Estádio 5; **f:** Estádio 6; **g:** Estádio 7; **h:** Estádio 8. **CS:** Célula de Sertoli; **A:** Espermatogônia do tipo A; **I:** Espermatogônia do tipo intermediária; **B:** Espermatogônia do tipo B; **PL-L:** Espermatócito primário na transição de pré-leptóteno para leptóteno; **Z:** Espermatócito primário em zigóteno; **P:** Espermatócito primário em paquíteno; **M:** Figuras de divisão meiótica; **ES:** Espermatócito secundário; **Ar:** Espermátides arredondadas; **Al:** Espermátides alongadas; **CR:** Corpo residual; **L:** Lúmen. Barras: 20 μ m.

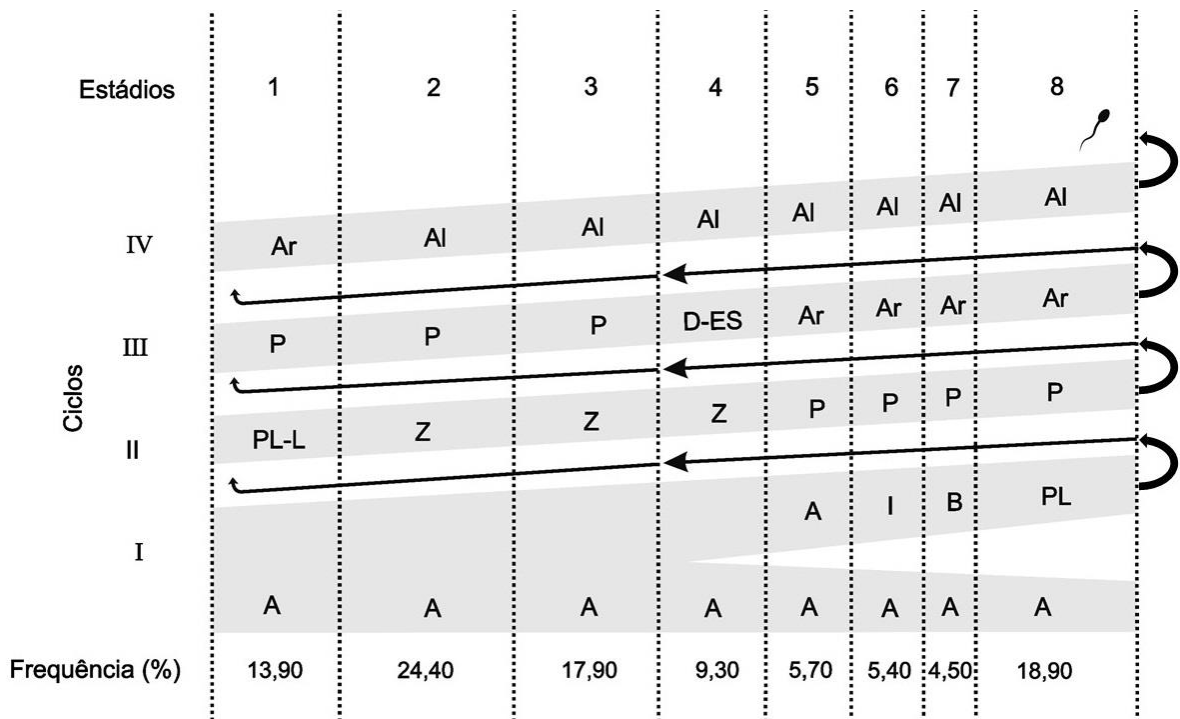


Figura 3. Diagrama do processo espermatogênico em *Diphylla ecaudata*, representando a frequência média (%) de cada um dos oito estágios do ciclo do epitélio seminífero. Cada linha corresponde a uma geração de células espermatogênicas e cada coluna corresponde a um estágio. Os números romanos indicam os ciclos espermatogênicos. **A**: espermatogônia do tipo A; **I**: espermatogônia intermediária; **B**: espermatogônia tipo B; **PL-L**: espermatócito primário na transição de pré-leptoteno para leptoteno; **Z**: espermatócito primário em zigoteno; **P**: espermatócito primário em paquíteno; **D**: espermatócito primário em Diplóteno; **ES**: espermatócito secundário; **Ar**: espermátide arredondada; **Al**: espermátide alongada.

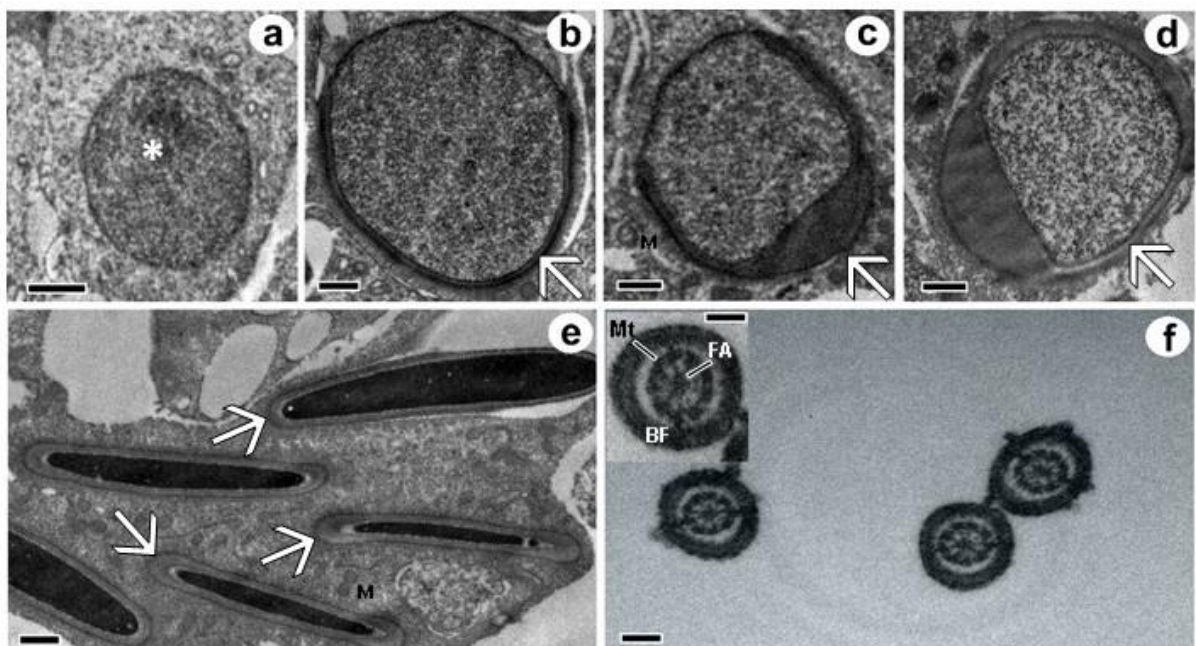


Figura 4. Aspectos ultraestruturais da espermiogênese em *Diphylla ecaudata*. **a:** espermátide arredondada sem a presença de capuz acrossômico, no estágio 5 do CES; **b-d:** espermátides em fase inicial de alongamento, com diferentes graus de ocupação nuclear pelo capuz acrossômico; **e:** espermátides alongadas com formação completa do capuz acrossômico; **f:** secções transversais dos flagelos. *: nucléolo; **Seta branca:** acrossomo; **M:** mitocôndria; **BF:** bainha fibrosa; **FA:** filamento axial; **Mt:** microtubulos. Barras: a: 2 µm, b: 0,5 µm, c: 1 µm, d: 0,2 µm, e: 0,5 µm, f: 0,2 µm, Detalhe: 0,2 µm.

3.3 Quantificação do rendimento espermatogênico

A quantificação da população celular presente no estágio 1 do CES é apresentada na Tabela 2. Com uma população de espermatogônias A de aproximadamente 0,9 células por secção transversal tubular, e uma população de espermátócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno de aproximadamente 15 células, os animais apresentaram um índice mitótico de 19,37%. O rendimento obtido quanto ao número de espermátides arredondadas e espermátócitos primários em paquíteno levou a um índice meiótico de 2,81%, enquanto o número de espermátides arredondadas obtidas a partir da população de espermatogônias A levou a um rendimento espermatogênico total de aproximadamente 67%. Considerando todas as células da linhagem germinativa, uma única célula Sertoli de *D. ecaudata* foi capaz de suportar cerca de 30,16 células germinativas. Cada testículo de *D. ecaudata* possuiu em média de $37,67 \times 10^5$ células de Sertoli e a reserva espermática testicular encontrada foi de $69,36 \times 10^6$ células.

Tabela 2. Médias da população celular do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero e índices indicativos de produção espermática no morcego *Diphylla ecaudata*.

Parâmetros	Média ± Desvio padrão
Célula de Sertoli	2,83±0,63
Espermatogônia tipo A	0,90±0,40
Espermátócito primário em Pré-leptóteno/Leptóteno	15,00±4,24
Espermátócito primário em Paquíteno	17,67±3,39
Espermátide arredondada	49,33±10,51
Índice mitótico	19,37±11,13
Índice meiótico	2,81±0,38
Rendimento geral da espermatogênese	67,03±41,19
Índice de células de Sertoli	30,16±7,26
Nº de células de Sertoli por testículo ($\times 10^5$)	37,67±14,17

Nº de células de Sertoli por grama de testículo (x10 ⁶)	59,44±13,36
Reserva espermática testicular (x10 ⁶)	69,36±40,06
Reserva espermática por grama de testículo (x10 ⁷)	103,65±21,67

3.4 Morfometria e morfologia do compartimento intertubular

Na tabela 3 são apresentadas as médias referentes à morfometria do compartimento intertubular de *D. ecaudata*. Este mostrou-se composto predominantemente por células de Leydig, seguido por vasos sanguíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo. A ocupação do intertúbulo e do parênquima testicular por vasos sanguíneos e linfáticos apresentou-se semelhante, enquanto o volume de vasos linfáticos por parênquima testicular foi maior do que o volume de vasos sanguíneos (Figura 1b).

Tabela 3. Percentuais de células de Leydig, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo no intertúbulo, no testículo, seus volumes por parênquima testicular do morcego *Diphylla ecaudata*.

Parâmetros	Média ±Desvio padrão
Volume do intertúbulo (mL)	0,006±0,002
Percentual no intertúbulo (%)	
Células de Leydig	48,45±14,31
Vasos sanguíneos	24,20±9,06
Vasos linfáticos	20,27±19,12
Tecido conjuntivo	7,08±3,25
Percentual no parênquima testicular (%)	
Células de Leydig	2,26±1,10
Vasos sanguíneos	1,12±0,61
Vasos linfáticos	0,97±0,94
Tecido conjuntivo	0,34±0,18
Volume total por parênquima testicular (µL)	
Células de Leydig	2,52±0,86
Vasos sanguíneos	1,23±0,38
Vasos linfáticos	1,42±1,67
Tecido conjuntivo	0,44±0,29

As médias referentes à morfometria das células de Leydig e ao índice Leydigossomático de *D. ecaudata* podem ser encontradas na Tabela 4. Estas células

apresentaram diâmetro nuclear médio de 13,32 μm , resultando num volume celular individual de aproximadamente 5.640 μm^3 . O Índice Leydigossomático apresentou média de 0,005% e foram encontradas cerca de 5,78 $\times 10^5$ células de Leydig por testículo.

Tabela 4. Morfometria das células de Leydig do morcego *Diphylla ecaudata*.

Parâmetros	Média \pm desvio padrão
Diâmetro nuclear (μm)	13,32 \pm 2,31
Percentual do núcleo (%)	26,97 \pm 7,41
Volume do núcleo (μm^3)	1335,73 \pm 758,16
Percentual do citoplasma (%)	73,03 \pm 7,41
Volume do citoplasma (μm^3)	4305,02 \pm 3744,37
Volume individual da célula (μm^3)	5640,75 \pm 4469,36
Nº de células de Leydig por testículo ($\times 10^5$)	5,78 \pm 3,05
Nº de células de Leydig por grama de testículo ($\times 10^5$)	47,82 \pm 16,64
Índice Leydigossomático (%)	0,005 \pm 0,006

3.5 Imunohistoquímica

Os receptores de andrógeno apresentaram imunorreatividade nos núcleos das células de Sertoli (Fig. 5a) e no citoplasma das células de Leydig (Fig. 5b), enquanto que a Aromatase foi detectada apenas nos núcleos das células de Sertoli (Fig. 5c). A Imunorreatividade para FGF2 (Fig. 6a) e BCL-2 (Fig. 6b) foi detectada no citoplasma dos espermatócitos primários em Paquíteno e em Zigóteno, bem como nas espermátides arredondadas (tabela 5). Já as espermátides alongadas apresentaram imunorreatividade apenas para o FGF2.

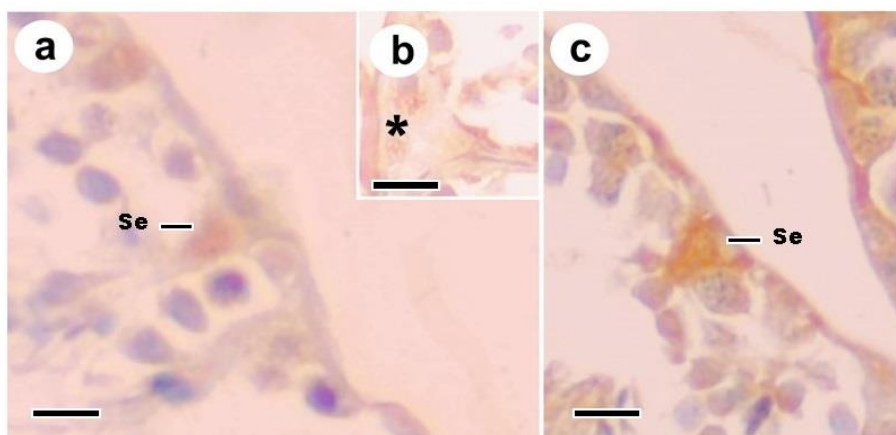


Figura 5. Detecção imunohistoquímica de receptores de Andrógeno (a-b) e Aromatase (c) nos testículos de *Diphylla ecaudata*. **Se:** Célula de Sertoli; *****: Citoplasma de Célula de Leydig. Barras: (a-c): 10 μ m.

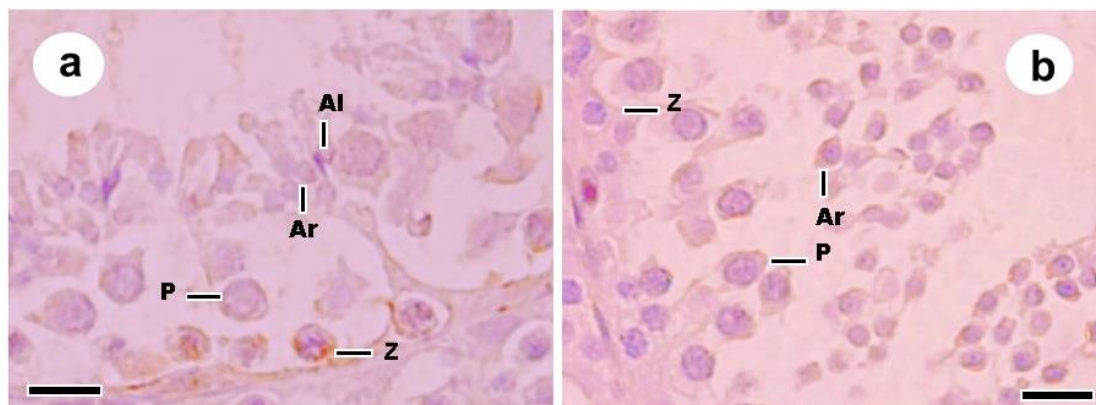


Figura 6. Detecção imunohistoquímica de FGF2 (a) e BCL-2 (b) nos túbulos seminíferos de *Diphylla ecaudata*. **Z:** Espermátócito primário em Zigóteno; **P:** Espermátócito primário em Paquíteno; **Ar:** Espermátide arredondada; **Al:** Espermátide alongada. Barras: (a-b): 15 μ m.

Tabela 5. Frequência da expressão dos Receptores de andrógênio, Aromatase, FGF 2 e BCL-2 nas células do testículo de *Diphylla ecaudata*. Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Tipo celular marcado	Andrógênio	Aromatase	FGF 2	BCL-2
Célula de Sertoli	0,32 \pm 0,18	1,00 \pm 0,09	---	---
Célula de Leydig	0,02 \pm 0,04	---	---	---
Espermátócito primário em Zigóteno	---	---	1,00 \pm 0,79	1,00 \pm 1,00
Espermátócito primário em Paquíteno	---	---	1,00 \pm 0,12	1,00 \pm 0,16
Espermátide arredondada	---	---	1,00 \pm 0,17	1,00 \pm 0,00
Espermátide alongada	---	---	1,00 \pm 0,31	---

4. Discussão

Considerando-se que *D. ecaudata* é uma espécie de distribuição restrita, que não foram encontrados quaisquer estudos acerca da reprodução dos machos desta espécie, e que o primeiro registro de sua ocorrência no estado do Rio Grande do Norte é recente (Vargas-Mena et al., 2018), este estudo destaca-se por ser o primeiro a realizar a descrição de seu processo espermato gênico.

4.1 Biometria e morfometria dos túbulos seminíferos

Diphylla ecaudata é a menor espécie de morcego hematófago (Reis et al., 2007), apresentando peso corporal de 24,64 g, enquanto *D. rotundus* tem em média 36,53 g (Morais et al., 2017) e a média do peso corporal do *Diaemus youngi* varia entre 30 e 38 g (Aguiar et al., 2006). Já o seu peso gonadal do *D. ecaudata* foi semelhante ao encontrado em outras espécies de morcegos (Duarte e Talamani, 2010; Morais et al., 2013a; Morais et al., 2014b).

Tanto o IGS quanto o ITS de *D. ecaudata* também foram semelhantes ao observado em outras espécies de morcegos neotropicais (Morais et al., 2013a; Morais et al., 2014b; Costa, 2016; Morais et al., 2017; Roy e Krishna, 2010). Como a maioria destes animais vive em sistemas de haréns compostos por um macho dominante e grupos de 8 a 12 fêmeas adultas (Crichton e Krutzsch, 2000), é requerido destes um maior investimento em gônadas e em túbulos seminíferos quando comparado a animais monogâmicos (Caldeira et al., 2010). Conforme Kenagy e Trombulak (1986), o tamanho testicular está intimamente relacionado ao comportamento reprodutivo, sendo que animais monogâmicos apresentam menor investimento testicular em relação a espécies com comportamentos reprodutivos promíscuos. Desta forma, o IGS e o ITS de *D. ecaudata* confirmam o relatado na literatura quanto a um sistema de acasalamento poligínico em morcegos (Barros et al., 2013; Nowak, 1994; Altringham, 1998;).

Tanto o arranjo do parênquima testicular quanto seus percentuais representados por túbulos seminíferos e intertúbulo também foram semelhantes ao observado em outros morcegos, a exemplo de *D. rotundus* (Morais et al., 2017). Pode-se notar, no entanto, que estes filostomídeos da subfamília Desmodontinae tem apresentado percentual de ocupação do parênquima testicular por túbulos seminíferos um pouco maior do que o observado em outros indivíduos das famílias Phyllostomidae e Molossidae, por exemplo (Morais et al., 2013a; Morais et al., 2014b). Já o percentual do compartimento tubular representado por epitélio seminífero em *D. ecaudata* foi inferior à registrada para essas outras espécies de morcegos.

O diâmetro tubular, cuja média foi de 195,09 μm , foi maior que o observado em outros morcegos (137,50 μm -Beguelini et al., 2014b; 139,54 μm -Morais et al., 2014b; 175,00 μm -Kurohmaru et al., 2002; 188,04 μm -Morais et al., 2017), e próximo ao apresentado por *Artibeus lituratus* (200,7 μm -Duarte e Talamani, 2010) enquanto a altura do epitélio seminífero esteve dentro da faixa observada nestes animais. A média do comprimento tubular por gama de testículo foi inferior ao registrado para outros morcegos, onde observou-se variação de 48,91 a 79,63 m (Morais et al., 2013a; Morais et al., 2014b), porém se assemelhou ao exibido por *Desmodus rotundus*, com 34,70 m (Morais et al., 2017).

4.2 Estádios do ciclo do epitélio seminífero

Em *D. ecaudata*, os 8 estágios que compõem o ciclo do epitélio seminífero, de acordo com o método da morfologia tubular (Berndtson, 1977), seguiram o padrão encontrado em outros morcegos, bem como nos demais mamíferos. O estágio 2 foi o mais frequente, diferindo do observado em diversos outros mamíferos, onde usualmente o estágio 1 é o mais frequente (Morais et al., 2013a; Moraes et al., 2013c; França e Russel, 1998; Paula et al., 2002; Farias et al., 2015; Moraes et al., 2017). Espermatócitos primários em zigóteno surgiram apenas a partir do estágio 2, o que se assemelha ao observado na maioria dos mamíferos já estudados, porém difere do observado em outras espécies de morcegos, como *Molossus molossus* e *Sturnira lilium*, onde estes espermatócitos foram observados já no estágio 1 (Morais et al., 2013a; Moraes et al., 2013c; França e Russel, 1998; Costa et al., 2011). O espermatócito em paquíteno é visto em todos os estádios porque esse estado pode durar horas, dias ou até semanas, conforme a espécie.

Espermatogônias estão presentes em todos os estádios do CES, devido à sua atividade mitótica constante. Deste modo, puderam ser observadas espermatogônias do tipo A em todas os estádios, bem como as do tipo intermediária no estágio 6 e as do tipo B no estágio 7, assim como observado nos morcegos *Sturnira Lilium*, *Desmodus rotundus* e *Myotis levis* (Morais et al., 2013c; Farias et al., 2015; Moraes et al., 2017) e em outros mamíferos como o gato doméstico e o rato-do-brejo (França e Godinho 2003; Moraes et al., 2009), sendo diferente no entanto do exibido pelo porco-do-mato, onde espermatogônias intermediárias foram observadas no estágio 5 e espermatogônias do tipo B nos estádios 6 e 7 estádios (Costa et al., 2010).

Cerca de 4,5 ciclos de divisões celulares são necessários para que o processo de espermatogênese seja completado, passando desde uma espermatogônia tipo A à espermiacção (Amann e Schanbacher, 1983). Considerando-se todos os estádios do CES, usualmente o estágio 1 é o escolhido para quantificação da população celular e rendimento da espermatogênese por contemplar todos os ciclos espermatogênicos, além de apresentar uma única geração de cada tipo celular, especialmente de espermátides.

A análise ultraestrutural das espermátides mostrou a formação do acrossoma, sendo este formado por vesículas pró-acrossômicas do complexo de Golgi, que se aglutinam e aderem à superfície nuclear, ocupando cerca de dois terços do núcleo em espermatozoides maduros em mamíferos em geral (Christensen e Fawcett, 1966; Holt & Moore, 1984). Os estágios iniciais da formação do flagelo também foram evidentes na região que originará a cauda do espermatozoide. Nas secções transversais das peças finais da cauda dos espermatozoides foi

observado o filamento axial e os microtúbulos, mas ao longo do comprimento das peças finais, a organização do filamento axial foi perdida, no término da peça final, havia apenas 11 microtúbulos, esse padrão de organização dos microtúbulos apresentado por *D. ecaudata* foi semelhante ao encontrado em outras espécies de morcegos (Beguelini et al., 2012; Beguelini et al., 2013; Beguelini et al., 2014a; Bueno et al., 2014).

4.3 Quantificação do rendimento espermatogênico

Enquanto a população de células da linhagem germinativa presentes no estágio 1 do CES de *D. ecaudata* foi semelhante à observada em outras espécies de morcegos, a quantidade de células de Sertoli foi consideravelmente menor, o que refletiu em um menor número destas células por grama de testículo. Deste modo, enquanto *D. ecaudata* apresentou aproximadamente 2,8 células de Sertoli por secção transversal tubular no estágio 1 e 59×10^6 células de Sertoli por grama de testículo, *D. rotundus*, *M. molossus* e *S. liliium* apresentaram, respectivamente, 5,76, 8,48 e 8,51 células de Sertoli por secção do estágio 1 e $13,10 \times 10^7$, $28,09 \times 10^7$ e $22,31 \times 10^{13}$ células de Sertoli por grama de testículo (Morais et al. 2013a; Morais et al, 2014b; Morais et al., 2017). Por outro lado, a capacidade de suporte realizada pelas células de Sertoli foi de aproximadamente 30 células, sendo maior do que o observado em outros mamíferos, cuja média varia de 10 a 22 células (França e Russell, 1998; Costa et al., 2007; Costa et al., 2010; Costa et al., 2011; Zhengwei et al., 1998; Zhengwei et al., 1997), o que indica uma maior eficiência destas células em *D. ecaudata*.

O índice mitótico de *D. ecaudata* (19,37%) foi maior que o observado em *D. rotundus* (16,93%; Morais et al., 2017), *S. liliium* (15,48%; Morais et al, 2014b) e *M. molossus* (13,76%; Morais et al. 2013a), enquanto que o índice meiótico, assim como o rendimento geral da espermatogênese, foi semelhante entre essas espécies de morcegos. Já a reserva espermática encontrada para cada grama de testículo de *D. eucadata*, de $103,65 \times 10^7$ células, foi consideravelmente superior ao encontrado nestas outras espécies de morcegos, cuja média variou de $56,64 \times 10^7$ a $76,52 \times 10^7$ células, bem como em outros grupos de mamíferos, cuja média variou de $103,80 \times 10^6$ a $165,90 \times 10^6$ células (Bittencourt et al., 2004; Azevedo et al., 2008). Este índice é calculado a partir do comprimento estimado para os túbulos seminíferos e da população de espermátides arredondadas, uma vez que se considera que as perdas celulares que ocorrem durante a espermiogênese são mínimas. Assim, a população de espermátides arredondadas é considerada um parâmetro seguro para se estimar a quantidade de espermatozoides que serão produzidos (França e Russell, 1998). Este achado indica,

portanto, que *D. ecaudata* possui as maiores taxas de produção de espermatozoides dentre as já registradas.

Os morcegos apresentem uma maior longevidade quando comparados a mamíferos de tamanho semelhante. Enquanto um rato vive até 2 anos (Reis et al., 2007), *D. rotundus* pode viver aproximadamente 30 anos (Conde-Pérezprina, et al., 2012) e o recorde de longevidade nos morcegos é de *Myotis brandtii*, com 41 anos em vida livre (Lilley, et al., 2014). Como o tempo médio de vida de *D. ecaudata* é de 8 anos (Martino, et al., 2006), esta menor longevidade quando comparado a *D. rotundus*, espécie pertencente à mesma família, pode ser um significado evolutivo para que *D. ecaudata* produza mais espermatozoides, já que sua expectativa de vida é menor.

4.4 Morfometria e morfologia do compartimento intertubular

O compartimento intertubular de *D. ecaudata*, também apresentou organização semelhante ao encontrado em outros mamíferos. Seu percentual no parênquima testicular, no entanto, esteve entre os menores valores registrados (França e Russell, 1998; Morais et al., 2013b; Morais et al., 2014a), porém se aproximando do valor descrito para o morcego hematófago *D. rotundus* (Morais et al., 2017).

As células de Leydig constituíram o principal componente do intertúbulo de *D. ecaudata*, assim como ao encontrado em outras espécies de morcego (Morais et al., 2013b; Morais et al., 2014a; Morais et al., 2017). O maior investimento nestas células está diretamente relacionado ao sistema de acasalamento poligínico apresentado por esta espécie (Delpietro e Russo, 2002). Sendo assim, necessitam de um maior investimento androgênico, quando comparados com espécies monogâmicas como o leão africano e a onça parda (Guião-Leite, 2003; Barros, 2005). O número médio de células de Leydig por grama de testículo encontrado foi de $47,82 \times 10^5$ células, número bem abaixo do encontrado no morcego frugívoro *S. lilium*, cuja média foi de $11,3 \times 10^7$ células (Morais et al., 2014a) e no insetívoro *M. molossus*, com $48,49 \times 10^6$ células (Morais et al., 2013b).

O ILS encontrado (0,005%) também esteve bem abaixo do encontrado em outras espécies de morcegos, cuja média variou de 0,015% a 0,04% (Morais et al., 2013b; Morais et al., 2017). Este índice foi próximo do encontrado em outros mamíferos (0,0036 % na onça-pintada, Azevedo et al., 2008; 0,007 % no camundongo, Morais et al., 2009; 0,0036% na jaguatirica, Sarti et al., 2011). Apesar do ILS ter sido baixo em comparação com outras espécies de morcegos, tanto o diâmetro nuclear das células de Leydig quanto seus volumes foram maiores que o encontrado nestas espécies, bem como em outros mamíferos (Morais et

al., 2013b; Morais et al., 2014a; Morais et al., 2017; França e Godinho, 2003; Costa et al., 2010), ao passo que seu número total por grama de testículo foi menor (Costa et al., 2010; Miranda, 2012; Morais et al., 2013b; Morais et al., 2014a; Costa, 2016). Este maior investimento no diâmetro nuclear e volume da célula de Leydig quando comparado à sua quantidade por grama testicular sugerem um meio encontrado pela espécie para suprir a demanda de testosterona que o seu comportamento reprodutivo requer para manutenção dos haréns.

4.5 Imunohistoquímica

Este é o primeiro estudo que descreve a expressão de receptores de andrógeno, aromatase, FGF2 e BCL2 nos testículos de *D. ecaudata*, permitindo assim o conhecimento de quais células do parênquima testicular apresentam imunorreatividade para estes importantes fatores, relacionados à regulação da espermatogênese.

D. ecaudata expressou receptores de andrógeno com maior frequência nas células de Sertoli em comparação com o detectado nas células de Leydig. Em consonância com esses resultados, no morcego *Artibeus lituratus*, os receptores de andrógeno apresentaram expressão mais discreta nas células de Leydig, indicando que essa população celular é mais regulada pelo estrogênio do que pelo andrógeno (Oliveira et al., 2009). A aromatase tem sido imunolocalizada em células de Leydig, células de Sertoli, espermátócitos, espermátides e espermatozóides de camundongos, ratos, ovinos e equinos (Nitta et al., 1993; Almadhidi et al., 1995; Bilinska et al., 1997; Levallet et al., 1998; Carreau et al., 2011). No entanto, em *D. ecaudata* observou-se sua expressão somente nas células de Sertoli, enquanto no morcego *Myotis nigricans* observou-se sua expressão em espermátides alongadas, células de Sertoli e de Leydig (Beguelini et al., 2014c).

Os fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs) são polipeptídios que atuam na proliferação celular, meiose e diferenciação celular (Niederberger et al., 1993). Em *D. ecaudata* observou-se expressão do FGF2 nos espermátócitos primários em Zigóteno e em Paquíteno, bem como em espermátides arredondadas e alongadas. Todavia, em outros mamíferos como roedores, bovinos, humanos e corsas, o FGF2 foi detectado exclusivamente em espermatogônias e células de Leydig (Han et al. 1993; Steger et al. 1998; Wagener et al. 2003; Abd-Elmaksoud et al., 2005). Já o padrão de expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 foi semelhante à apresentada pelo roedor *Lagostomus maximus*, em que o polipeptídio esteve localizado nos espermátócitos primários em Paquíteno e em Zigóteno e espermátides arredondadas (González et al. 2018).

5. Conclusões

Conclui-se que *D. ecaudata* apresentou padrão testicular semelhante ao de outros mamíferos, e características comuns às descritas em outras espécies de morcegos, tais como grande investimento em túbulos seminíferos e em células de Leydig. Esta espécie destacou-se por apresentar grande eficiência de células de Sertoli, as quais desempenharam uma alta capacidade de suporte às células da linhagem germinativa, e uma elevada reserva espermática testicular. Esta primeira descrição do processo espermatogênico de *D. ecaudata* representa o primeiro passo para o conhecimento da reprodução desta espécie, em especial no tocante à gametogênese dos machos. Esta informação poderá ser útil tanto para sua correlação com a reprodução das fêmeas quanto para um manejo consciente da espécie, com vistas à sua conservação, além de gerar conhecimento sobre a reprodução de indivíduos pouco conhecidos que abitam a Caatinga nordestina.

6. Referências bibliográficas

ABD-ELMAKSOU, A.; VERMEHREN, M.; NÜTZEL, F.; HABERMANN, F.A. SINOWATZ, F. Analysis of fibroblast growth factor 2 (FGF2) gene transcription and protein distribution in the bovine testis. *Growth Factors*, v. 23, n. 4, p. 295–301, 2005.

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat Record*, v. 94, p. 238–248, 1946.

AGUIAR, L.M.S.; CAMARGO, WR.; PORTELLA, A.S. Occurrence of white-winged vampire bat, *Diaemus youngi* (Mammalia, Chiroptera), in the Cerrado of Distrito Federal, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 23, n. 3, p. 893–896, 2006.

ALMADHIDI, J.; SERALINI, G.E.; FRESNEL, J.; SILBERZACHN, P.; GAILLARD, J. Immunohistochemical localization of cytochrome P450 aromatase in equine gonads. *J. Histochem. Cytochem*, v. 43, p. 571–577, 1995.

ALTRINGHAM, J. D. Bats: Biology and behavior. University Press, Oxford, 262 p. 1998.

AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive Capacity of Dairy Bulls. VIII. Direct and Indirect Measurement of Testicular Sperm Production. *Journal of Dairy Science*, 1962.

AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci*, v. 57, n. 2, p. 380-403, 1983.

AZEVEDO, M. H. F.; PAULA, T.A.R.; BALARINI, M. K.; MATTA, S.L.P.; PEIXOTO, J. V.; GUIÃO LEITE, F. L.; ROSSI, J. L.; COSTA, E.P. Organization and quantification of the elements in the intertubular space in the adult jaguar testis (*Panthera onca*, Linnaeus, 1758). *Micron*, v. 39, n. 8, p. 1166–1170, 2008.

BARROS, J.B.G. Análise morfofuncional do testículo e espermatogênese de leões africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos. 77f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

BARROS, M.S.; MORAIS, D.B.; ARAÚJO, M.R.; CARVALHO, T.F.; MATTA, S.L.P.; PINHEIRO, E.C.; FREITAS, M.B. Seasonal variation of energy reserves and reproduction in neotropical free-tailed bats *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Brazilian Journal of Biology*, v. 73, n. 3, p. 629–635, 2013.

BEGUELINI, M.R.; BUENO, L.M.; CAUN, D.L.; TABOGA, S.R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Ultrastructure of spermatogenesis in the short-tailed fruit bat, *Carollia perspicillata* (Chiroptera: Phyllostomidae: Carollinae). *Journal of Morphology*, v. 275, n. 1, p. 111–123,

2014a.

BEGUELINI, M.R.; FALLEIROS, L.R.; GÓES, R.M.; RAHAL, P.; MORIELLE-VERSUTE, E.; TABOGA, S.R. Differential expression of aromatase, estrogen receptor alpha and 17 β -HSD associated with the processes of total testicular regression and recrudescence in the bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *General and Comparative Endocrinology*, v. 201, p. 53–64, 2014c.

BEGUELINI, M.R.; GOES, R.M.; TABOGA, S.R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Two periods of total testicular regression are peculiar events of the annual reproductive cycle of the black Myotis bat, *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Reproduction, Fertility and Development*, v. 26, n. 6, p. 834–846, 2014b.

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

BEGUELINI, M.R.; TABOGA, S.R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Ultrastructural characteristics of the spermatogenesis during the four phases of the annual reproductive cycle of the black myotis bat, *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Microscopy Research and Technique*, v. 76, n. 10, p. 1035–1049, 2013.

BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J. Anim. Sci.*, v. 44, n. 5, p. 818–883, 1977.

BILINSKA, B.; LESNIAK, M.; SCHMALZ, B. Are ovine Leydig cells able to aromatize androgens? *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 9, p.193–199, 1997.

BITTENCOURT, V.L.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; FONSECA, C.C.; NEVES, M.T.D.; COSTA, M.E.L.; MALTA, M.C.C.; COELHO, C.M.; BASTOS, J.A.B. Avaliação da população celular do epitélio seminífero e índices indicativos da produção espermática, através de biópsia testicular em lobo-Guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) adulto. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 28, n. 2, p.108-113, 2004.

BUENO, L.M.; BEGUELINI, M.R.; COMELIS, M.T.; TABOGA, S.R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Ultrastructure of spermatogenesis, spermatozoon and processes of testicular regression and recrudescence in *Eptesicus furinalis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Animal Reproduction Science*, v. 148, n. 3–4, p. 228–244, 2014.

CALDEIRA, B. C. PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; BALARINI, M.K.; CAMPOS, P.K.A.. Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyon thous*,

Linnaeus, 1766). *Revista Ceres*, v. 57, n. 5, p. 569–575, 2010.

CARREAU, S.; BOURAIMA-LELONG, H.; DELALANDE, C. Estrogens in male germ cells. *Spermatogenesis*, v. 1, p. 90-91, 2011.

CHRISTENSEN, A.K.; FAWCETT, D.W. The fine structure of testicular interstitial cells in mice. *Am J Anat*, v. 118, p. 551–571, 1966.

CONDE-PÉREZPRINA J.C.; LUNA-LÓPEZ A.; GONZÁLEZ-PUERTOS, V.Y.; ZENTENOSAVÍN, T.; LEÓN-GALVÁN, M.Á.; KÖNIGSBERG, M. DNA MMR systems, microsatellite instability and antioxidant activity variations in two species of wild bats: *Myotis velifer* and *Desmodus rotundus*, as possible factors associated with longevity. *Age*, v. 34, n. 6, p. 1473-1492, 2012.

COSTA, G.M.J.; LEAL, M.C. J.V. SILVA, J.V.; FERREIRA, A.C.S.; GUIMARÃES, D.A.; FRANÇA, L.R. Spermatogenic cycle length and sperm production in a feral pig species (*Collared peccary*,). *Journal of Andrology*, v. 31, n. 2, p. 221–230, 2010.

COSTA, K.C. Histomorfometria testicular e processo espermatogênico do morcego *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). [Dissertação]. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2016.

COSTA, K.L.C.; MATTA, S.L.P.; GOMES, M.L.M.; PAULA, T.A.R.; FREITAS, K.M.; CARVALHO, F.A.R.; SILVEIRA, J.A.; DOLDER, H.; MENDIS- HANDAGAMA, S.M.L.C. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Anim Reprod Sci*, v. 127, p. 202–212, 2011.

COSTA, D.S., MENEZES, C.M.C., PAULA, T.A.R. Spermatogenesis in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*). *Anim Reprod Sci*, v. 98, n. 3–4, p. 322–334, 2007.

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

DELPIETRO, V. H.A.; RUSSO, R. G. Observations of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) and the hairy-legged vampire bat (*Diphylla ecaudata*) in captivity. *Mammalian Biology*, v. 67, p. 65–78, 2002.

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

FARIAS, T. O.; NOTINI, A.A.; TALAMONI, S.A.; GODINHO, H.P. Testis Morphometry and Stages of the Seminiferous Epithelium Cycle in an Epididymal Sperm-storing Neotropical Vespertilionid, *Myotis levis* (Chiroptera). *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, v. 44, n. 5, p. 361–369, 2015.

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

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: Martinez- Garcia, F., Regadera, J. (Eds.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Churchill Livingstone, Madrid, pp.197-219, 1998.

GONZÁLEZ, C.R.; MUSCARSEL ISLA, M.L.; VITULLO, A.D. The balance between apoptosis and autophagy regulates testis regression and recrudescence in the seasonal-breeding South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus*. *PLoS ONE*, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2018.

GREENHALL, A.; SCHIMIDT, U.; JOERMANN, G.. *Diphylla ecaudata.pdf*. *Mammalian Species*. [S.l: s.n.]. , 1984.

GUIÃO-LEITE, F.L.; PAULA, T.A.R. Rendimento intrínseco da espermatogênese, o índice de células de Sertoli e a produção espermática diária da onça parda (*Puma concolor*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27 (1), n. 21-26, 2003.

HAN, I.S.; SYLVESTER, S.R.; KIM, K.H.; SCHELLING, M.E.; VENKATESWARAN, S.; BLANCKAERT, V.D.; MCGUINNESS, M.P.; GRISWOLD, M.D. Basic fibroblast growth factor is a testicular germ cell product which may regulate sertoli cell function. *Mol Endocrinol*, v. 7, p.889–897, 1993.

HOLT, W.V.; MOORE, H.D.M. Ultrastructural aspects of spermatogenesis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Anat*, v.138, n.175–188, 1984.

ITO, F.; BERNARD, E.; TORRES, R.A. What is for Dinner? First Report of Human Blood in the Diet of the Hairy-Legged Vampire Bat *Diphylla ecaudata*. *Acta Chiropterologica*, v. 18, n. 2, p. 509–515, 2016.

JOHNSON, L.; PETTY, C.S.; NEAVES, W.B. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biol Reprod*, v. 25, n. 217-226, 1981.

KARNOVSKY, M.J. A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use

in Electron Microscopy. *Cell Biology Source: The Journal of Cell Biology*, 1965.

KENAGY, G.J., TROMBULAK, S.C.. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *Journal of Mammalogy*, v. 67, n. 1, p. 1-22, 1986.

KUNZ, T. H.; ANTHONY, E. L. P. Age Estimation and Post-Natal Growth in the Bat *Myotis lucifugus*. *Journal of Mammalogy*, 1982.

KUROHMARU, M.; SARUWATARI, T.; KIMURA, J.; MUKOHYAMA, M.; WATANABE, G., TAYA, K.; HAYASHI, Y. Seasonal Changes in Spermatogenesis of the Japanese Lesser Horseshoe Bat, *Rhinolophus cornutus* from a Morphological Viewpoint. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* [S.l: s.n.], 2002.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. Ecologia e conservação da Caatinga. Ed. Universitária da UFPE, Recife, Brasil, 822 pp, 2003.

LEVALLET, J.; BILINSKA, B.; MITTRE, H.; GENISSEL, C.; FRESNEL, J.; CARREAU, S. Expression and immunolocalization of functional Cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol. Reprod.*, v. 58, p. 919–926, 1998.

LILLEY T.M.; STAUFFER J.; KANERVA M.; EEVA, T. Interspecific variation in redox status regulation and immune defence in five bat species: the role of ectoparasites. *Oecologia*, v. 175, n. 3, p. 811-823, 2014.

MARTINO A.M.; ARANGUREN J.; ARENDS, A. New longevity records in South American microchiropterans. *Mammalia*, v. 70, n.1-2, p. 166-167, 2006.

MIRANDA, D.C. Efeito dos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol sobre parâmetros testiculares do morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) [Dissertação]. Federal University of Viçosa, Brazil, 2012.

MORAIS, A.C.T.; BARBOSA, L.P.; NEVES, M.M.; MATTA, S.L.P.; MORAIS, D.B.; MELO, B.E.S.. Parâmetros morfofisiológicos testiculares de camundongos (*Mus musculus*) suplementados com geleia real. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 1, p. 110–118, 2009.

MORAIS, D.B.; BARROS, M.S.; FREITAS, M.B.D; PAULA, TA.R.; MATTA, S.L. Histomorphometric characterization of the intertubular compartment in the testes of the bat *Sturnira lilium*. *Animal Reproduction Science*, v. 147, n. 3–4, p. 180–186, 2014a.

MORAIS, D.B.; BARROS, M. S.; PAULA, TA.R.; FREITAS, M.B.; GOMES, M.L.; MATTA, S.L.. Evaluation of the cell population of the seminiferous epithelium and spermatogenic

indexes of the bat *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae). *PLoS ONE*, v. 9, n. 7, 2014b.

MORAIS, D.B. CUPERTINO, M.C.; GOULART, L.S.; FREITAS, K.M.; FREITAS, M.B.; 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*, v. 140, n. 3–4, p. 268–278, 2013a.

MORAIS, D.B.; OLIVEIRA, L. C.; MATTA, S. L. P.; CUPERTINO M. C.; FREITAS, K. M.; FREITAS, M. B. D. Organization and seasonal quantification of the intertubular compartment in the bat *Molossus molossus* (Pallas, 1776) testis. *Microscopy Research and Technique*, v. 76, n. 1, p. 94–101, 2013b.

MORAIS, D.B.; PAULA, T.A.R; BARROS, R.S.; BALARINI, M.K; FREITAS, M.B.D.; MATTA, S.L.P. Stages and duration of the seminiferous epithelium *Molossus molossus* (Chiroptera, Molossidae) testis: The tubular compartment and indices of sperm production. *Anim. Reprod. Sci*, v.140,p. 268-278, 2013c.

MORAIS, D. B.; PUGA, L.C.H.P.; PAULA, T.A.R.; FREITAS, M.B.D.; MATTA, S.L.P. The spermatogenic process of the common vampire bat *Desmodus rotundus* under a histomorphometric view. *PLoS ONE*, v. 12, n. 3, p. 1–18, 2017.

NIEDERBERGER, C.S.; SHUBHADA, S.; KIM, S.J.; LAMB, D.J. Paracrine factors and the regulation of spermatogenesis. *World J Urol*, v. 11, p. 120–128, 1993.

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

NITTA, H.; BUNICK, D.; HESS, R.A.; JANULIS, L.; NEWTON, S.C.; MILLETTE, C.F.; OSAWA, Y.; SHIZUTA, Y.; TODA, K.; BAHR, J.M. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology*, v. 132, p.1396–1401, 1993.

OLIVEIRA, R.L.; OLIVEIRA, A.G.; MAHECHA, G.A.B.; NOGUEIRA, J.C.; OLIVEIRA, C.A. Distribution of estrogen receptors (ER α and ER β) and androgen receptor in the testis of big fruit-eating bat *Artibeus lituratus* is cell- and stage-specific and increases during gonadal regression. *General and Comparative Endocrinology*, v. 161, n. 2, p. 283–292, 2009.

PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; COSTA, D.S. Avaliação histológica e quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. *Biosci J*, v.18, n.1, p.121- 136, 2002.

REIS, NR.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. Morcegos do Brasil. *Ecologia*,

2007.

ROY, V. K.; KRISHNA, A. Role of leptin in seasonal adiposity associated changes in testicular activity of vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 168, n. 1, p. 160–168, 2010.

SARTI, P.; PAULA, T.A.R.; POLLI, G.O.; DECO SOUZA, T.; ARAUJO, G.R.. Morfofisiologia do tecido intertubular e das células de Leydig de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) adulta. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v. 63, n. 5, p. 1060–1065, 2011.

SCHEFFER, K. C., DE BARROS, R. F., IAMAMOTO, K., MORI, E., ASANO, K. M., ACHKAR, S. M., ESTEVEZ GARCIA, A. I., LIMA, J. Y. DE O. Y DE OLIVEIRA, F. W. *Diphylla ecaudata* y *Diaemus Youngi*, Biología y comportamiento. *Acta Zoológica Mexicana*, v. 31, n. 3, p. 436–445, 2015.

STEGER, K.; TETENS, F.; SEITZ, J.; GROTHE, C.; BERGMANN, M. Localization of fibroblast growth factor 2 (fgf-2) protein and the receptors fgfr 1–4 in normal human seminiferous epithelium. *Histochem Cell Biol*, v. 110, p. 57–62, 1998.

UIEDA, W. Comportamento alimentar de morcegos hematófagos ao atacar aves, caprinos e suínos, em condições de cativeiro. Ph.D. Thesis, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil, 178 pp, 1994.

UIEDA, W. Período de atividade alimentar e tipos de presa dos morcegos hematófagos (Phyllostomidae) no Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira da Biologia*, v. 52, p. 563-573, 1992.

VARGAS-MENA, J.C.; CORDERO-SCHMIDT, E.; MEDEIROS, D.B.; MEDELLÍN, R.A.; RODRÍGUEZ-HERRERA, B.; VENTICINQUE, E.M. Diversity of cave dwelling bats in the tropical dry forest of Rio Grande do Norte, Brazil. *Mastozoología Neotropical*, 2018. In Press

WAGENER, A.; BLOTTNER, S.; GORITZ, F.; STREICH, W.J.; FICKEL, J. Differential changes in expression of a and b fgf, igf-1 and -2, and tgf-alpha during seasonal growth and involution of roe deer testis. *Growth Factors*, v. 21, p. 95–102, 2003.

ZHENGWEI, Y.; MCLACHLAN, R.I.; BREMMER, W.J.; WREFORD, N.G. Quantitative (stereological) study of the normal spermatogenesis in the adult monkey (*Macaca fascicularis*). *J Androl*, v. 18, n. 6, p. 681-687, 1997.

ZHENGWEI, Y.; WREFORD, N.G.; ROYCE, P.; KRETSER, D.M.; MCLACHLAN, R.I.
Stereological evaluation of human spermatogenesis after suppression by testosterone
treatment: heterogenous pattern of spermatogenic impairment. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 83,
n. 4, p.1284-1291, 1998.

7. CONCLUSOES GERAIS

- *Desmodus rotundus* apresentou peso corporal, peso gonadal, IGS, ITS, ILS, diâmetro tubular e altura do epitélio com médias superiores ao exibido por *Diphylla ecaudata*, tendo sido as maiores diferenças observadas entre estes dois últimos parâmetros, refletindo no menor comprimento tubular por grama de testículo de *D. rotundus* em relação a *D. ecaudata*.
- A quantificação da espermatogênese nestas duas espécies mostrou que *D. ecaudata* apresentou valores superiores quanto ao número de células de Sertoli por grama de testículo e reserva espermática por grama de testículo em relação a *D. rotundus*.
- Receptores de andrógenos foram identificados tanto em células de Leydig quanto em células de Sertoli, enquanto o padrão de expressão da Aromatase apresentou diferenças entre as duas espécies. O FGF2 foi identificado nas duas espécies em espermatócitos primários em zigóteno e em Paquíteno, espermátides arredondadas e alongadas. Em ambas as espécies houve marcação para BCL-2 em espermatócitos primários em zigóteno e em Paquíteno e espermátides arredondadas. No entanto, apenas em *D. rotundus* houve marcação do FGF2 e BCL-2 em espermatócitos secundários.
- Os resultados obtidos quanto às análises empregadas em *D. rotundus* indicam espermatogênese contínua ao longo do ano e sugerem uma maior produção de espermatozoides na estação chuvosa na Caatinga nordestina.
- Esta primeira descrição do processo espermatogênico de *D. ecaudata* representa o primeiro passo para o conhecimento da reprodução desta espécie, em especial no tocante à gametogênese dos machos.