

DANIELLE BARBOSA MORAIS

**ESPERMATOGÊNESE NO MORCEGO *Sturnira lilium*  
(CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE): ASPECTOS MORFOLÓGICOS,  
MORFOMÉTRICOS E ULTRAESTRUTURAI**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M827e  
2012

Morais, Danielle Barbosa, 1983-  
Espermatogênese no morcego *Sturnia lilium*  
(Chiroptera: Phyllostomidae): aspectos morfológicos,  
morfométricos e ultraestruturais / Danielle Barbosa Morais  
– Viçosa, MG, 2012.  
xii, 83f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Morcego - Reprodução. 2. Testículos. 3. Testículos -  
Histologia. 4. Espermatogênese em animais. 5. Sertoli,  
Células de. 6. Meiose. 7. Células germinativas. 8. Morcego -  
Espermatozoides. 9. Testosterona. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 559.4

DANIELLE BARBOSA MORAIS

**ESPERMATOGÊNESE NO MORCEGO *Sturnira lilium*  
(CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE): ASPECTOS MORFOLÓGICOS,  
MORFOMÉTRICOS E ULTRAESTRUTURAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 06 de julho de 2012.

---

Mariella Bontempo Duca de Freitas

---

Hélio Chiarini-Garcia

---

Ita de Oliveira Silva

---

Juliana Silva Rocha

---

Sérgio Luis Pinto da Matta  
(Orientador)

Dedico esta tese e todos estes anos de estudos aos meus pais e irmãos, que sempre me apoiaram, se orgulharam e torceram por mim. Sempre.

Dedico este trabalho ao Sérgio, meu orientador e às amigas de estudos em espermatogênese, Ana Carolina, Ana Paula, Maytê e Michele.

## **Agradecimentos**

À Deus, por me dar forças e por permitir que tudo isso se realizasse em minha vida.

À minha família pelo amor, pela confiança, pela torcida, por tentar entender minhas ausências. Mamãe, Papai, Neide, Celinha, Angela, Valinha, Tatina, Ronildo, Naldinho, Nino. Aos sobrinhos (as), em especial aos meus pequenos príncipes, Gabriel e Enzo e aos cunhados (as), em especial ao Watson e Fernando. Vocês me dão forças para seguir em frente. Este título é nosso.

Ao Éder pelo carinho, pela paciência, pela companhia constante e pelo apoio em todos os momentos. Sem você teria sido tudo muito mais difícil.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Geral, pela valiosa oportunidade de realização do mestrado e do doutorado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos, que foi fundamental.

À FAPEMIG, pelo importante apoio à participação em diversos eventos científicos.

Ao professor Sérgio da Matta pela orientação desde o mestrado, por tantos ensinamentos, pela paciência, dedicação, apoio e bom-humor. Serei eternamente grata.

À professora Mariella Freitas pela acolhida, simpatia, apoio, pelos conselhos e pelo incentivo de sempre.

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros, Departamento de Biologia Animal, em especial à amiga Mirlaine, pela fundamental ajuda na coleta dos animais. Valeu Mimi, muitíssimo obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Biologia Estrutural, de agora e de outras épocas, em especial à Maytê, Carol, Michele e Ana Paula Matta, com as quais pude contar sempre. Obrigada pela amizade sincera. Ao querido e saudoso Cilada's group: Jane, Mariana Lanna, Luana, Lílian, Silvinha, Sirlene, Katiane, Vinícius, Madu, Alípio e Riviane. Vocês foram muito especiais. Manu, Claudinha, Edalton, Fernandinho, Arlete, Rômulo, Alex, Grazi, Tati, Mário, Kyvia, Juliana, Fabíola, Suelen, Pamela, Diego, Marli, Diane, Bruna Moraes, Bruna Thomazini, Reggiani, Mônica, Jesy, Juliano. Vocês fizeram parte da minha trajetória de alguma forma. Muito obrigada pelos momentos de descontração, que em muito alegraram os meus dias em Viçosa e pela preciosa convivência que, intencionalmente ou não, muito contribuiu para meu crescimento pessoal.

Ao professor Tarcízio A.R. de Paula pelos valiosos ensinamentos em espermatogênese, que foram fundamentais para a realização deste e de outros trabalhos.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Geral, Alex, Beth, Diana, João Bosco e Matheus, e do Núcleo de Microscopia e Microanálise, Carla, Patrícia e Gilmar. Obrigada pela simpatia e pela ajuda sempre que possível.

À Jane, Claudinha e Luis Fernando pela ajuda com o material para a microscopia eletrônica e ao professor Lino pelo apoio sempre que solicitado.

À Karine e ao Marcos pela ajuda com o kit para detecção de apoptose e ao professor Leandro Licursi pelo fornecimento de parte das enzimas necessárias.

À professora Luzimar, Departamento de Biologia Vegetal, por permitir a utilização do fotomicroscópio.

A todos os professores do curso, em especial Sérgio, Clóvis, Izabel, Lino e Tarcízio, pelos exemplos de dedicação e profissionalismo.

Aos professores Mariella D.B. de Freitas, Hélio Chiarini-Garcia, Ita O. Silva e Juliana S. Rocha, por aceitarem participar da banca examinadora e aos suplentes Juliano V. Peixoto e João Bosco G. Barros pela disponibilidade.

À todas as moradoras que passaram pela república nestes 6 anos de Viçosa, em especial à Joyce, Nivea, Maria Fernanda e Estela. Obrigada pela convivência.

À acolhedora cidade de Viçosa, onde passei, sem dúvidas, alguns dos melhores anos da minha vida.

Muito obrigada.

Sentirei saudades.

## **Biografia**

Danielle Barbosa Morais, filha de José de Paiva Morais (*in memoriam*) e Alídia Barbosa Morais, nasceu na cidade de Timóteo, Minas Gerais, em 01 de Maio de 1983.

Graduou-se como Bacharel em Ciências Biológicas em Julho de 2006, pelo Centro Universitário do Leste de Minas Gerais (UnilesteMG), Ipatinga-MG. Durante sua graduação desenvolveu trabalhos na área de morfofisiologia reprodutiva, tendo sido bolsista de iniciação científica por 2 anos e atuado como monitora da disciplina Biologia do Desenvolvimento.

Em Outubro de 2006 ingressou no curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, onde desenvolveu trabalhos na área de histofisiologia da reprodução, defendendo sua dissertação em Julho de 2008.

Em Agosto de 2008 ingressou no curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, com defesa da tese em Julho de 2012.

## Sumário

Resumo.....	ix
Abstract .....	xi
1. Introdução geral .....	1
2. Justificativa .....	2
3. Objetivos .....	3
4. Revisão de literatura.....	4
4.1. Ordem Chiroptera.....	4
4.2. <i>Sturnira lilium</i> .....	5
4.3. A reprodução em morcegos.....	6
4.4. O testículo.....	8
4.5. O processo espermatogênico .....	9
5. Referências Bibliográficas .....	11
Artigo 1: Estádios e duração do ciclo do epitélio seminífero no morcego frugívoro <i>Sturnira lilium</i> (E. Geoffroy, 1810, Chiroptera: Phyllostomidae) .....	17
Resumo .....	17
1. Introdução.....	18
2. Material e Métodos.....	19
2.1. Área de estudo .....	19
2.2. Coleta dos animais e processamento histológico.....	20
2.3. Estádios do ciclo do epitélio seminífero e suas frequências relativas .....	21
2.4. Duração do ciclo do epitélio seminífero .....	21
2.5. Análise estatística .....	22
3. Resultados .....	22
3.1. Estádios do ciclo do epitélio seminífero, frequências relativas e duração do CES .....	22
3.2. Ultraestrutura das espermátides .....	27
4. Discussão.....	28
4.1. Estádios do ciclo do epitélio seminífero, frequências relativas e duração do ciclo.....	28

4.2. Ultraestrutura das espermátides .....	29
5. Conclusões.....	30
Referências Bibliográficas.....	30
Artigo 2: Avaliação da população celular do epitélio seminífero e índices indicativos de produção espermática no morcego <i>Sturnira lilium</i> (Chiroptera: Phyllostomidae) .....	35
Resumo .....	35
1. Introdução.....	36
2. Material e Métodos.....	37
2.1. Área de estudo .....	37
2.2. Coleta dos animais, biometria e processamento histológico .....	38
2.3. Ensaio de TUNEL e contagem de células apoptóticas .....	39
2.4. Morfometria testicular .....	40
2.5. Duração do ciclo do epitélio seminífero (CES).....	40
2.6. Contagens celulares .....	41
2.7. Análise estatística .....	42
3. Resultados .....	43
3.1. Biometria e morfometria testicular .....	43
3.2. Contagens celulares .....	45
3.3. Ultraestrutura das células germinativas .....	47
3.4. Rendimento da espermatogênese.....	49
3.5. Reserva espermática testicular e produção espermática diária.....	49
4. Discussão.....	50
4.1. Biometria e morfometria testicular .....	50
4.2. Contagens celulares .....	52
4.3. Ultraestrutura das células germinativas .....	53
4.4. Rendimento da espermatogênese.....	54
4.5. Reserva espermática testicular e produção espermática diária.....	55
Referências Bibliográficas.....	56

Artigo 3: Caracterização histomorfométrica do compartimento intertubular dos testículos do morcego <i>Sturnira lilium</i> (Chiroptera: Phyllostomidae) .....	64
Resumo .....	64
1. Introdução.....	65
2. Material e Métodos.....	66
2.1. Área de estudo .....	66
2.2. Processamento histológico.....	67
2.3. Biometria e morfometria testicular .....	68
2.4. Dosagem de testosterona .....	69
2.5. Análise estatística .....	69
3. Resultados .....	69
4. Discussão.....	73
Referências Bibliográficas.....	77
Conclusões Gerais .....	83

## Resumo

MORAIS, Danielle Barbosa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Espermatogênese no morcego *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae): aspectos morfológicos, morfométricos e ultraestruturais.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta. Coorientadores: Tarcizio Antônio Rêgo de Paula e Mariana Machado Neves.

O morcego *Sturnira lilium* possui hábito alimentar predominantemente frugívoro, sendo um importante polinizador, sobretudo para espécies de plantas que dependem dos morcegos para a polinização e dispersão de suas sementes. Pela sua importância, torna-se fundamental que se conheça como esta espécie de morcego se reproduz, bem como se há influência de fatores ambientais sobre seu ciclo reprodutivo, uma vez que esta influência tem sido reportada para diversas espécies de morcegos. Por existir pouca informação disponível sobre quantificação e caracterização da espermatogênese de morcegos objetivou-se, neste estudo, fornecer informações sobre a atividade testicular de *S. lilium* ao longo das estações climáticas anuais. Assim, foi realizada a caracterização morfológica e morfométrica, com cálculo dos índices indicativos de produção espermática, caracterização dos estádios que compõem o ciclo do epitélio seminífero e quantificação de sua capacidade androgênica, nos testículos de indivíduos adultos. Foram capturados 14 animais nas estações seca (n=7) e chuvosa (n=7), no município de Viçosa, MG. Após eutanásia, fragmentos testiculares foram processados histologicamente para avaliação morfológica, morfométrica e histoquímica, em microscópio de luz e para análise ultraestrutural, em microscópio eletrônico de transmissão. Os animais apresentaram IGS médio de 0,27 % e seus testículos seguiram a organização geral descrita para mamíferos. A análise ultraestrutural permitiu o acompanhamento da formação do capuz acrossômico nas espermátides arredondadas, além da caracterização de outras células que compõem os compartimentos tubular e intertubular. Considerando-se indivíduos de ambas as estações, o parênquima testicular foi composto por cerca de 85 % de túbulos seminíferos e 15 % de intertúbulo, sendo o comprimento tubular por grama de testículo de aproximadamente 80 m. A contagem de células em apoptose não revelou diferenças significativas entre as estações. A maior reserva espermática testicular foi observada na estação chuvosa, com  $43,47 \times 10^6$  células, bem como a produção espermática diária, cuja média foi de  $12,60 \times 10^6$  células na mesma estação. A presença de espermatócitos primários em zigóteno no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, segundo o método da morfologia tubular, difere de muitos mamíferos descritos até o momento. Os animais deste estudo apresentaram índice

mitótico médio de 15,4 células, índice meiótico de 2,9 células, rendimento geral da espermatogênese de 68,7 células e capacidade suporte das células de Sertoli de 7,0 células. Um ciclo do epitélio seminífero teve duração média estimada em 3,45 dias e aproximadamente 15,52 dias foram requeridos para a formação dos espermatozoides, a partir da espermatogônia. As células de Leydig foram o principal componente do intertúbulo, seguido pelos vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e espaço linfático. O número de células de Leydig por grama de testículo foi de  $11 \times 10^7$  células, não variando ao longo das estações climáticas, bem como o índice Leydigossomático (média de 0,03 %) e a dosagem plasmática de testosterona (média de 21 ng/mL). A análise ultraestrutural mostrou gotículas lipídicas abundantes no citoplasma das células de Leydig, além de fibras colágenas no tecido conjuntivo e espaços linfáticos de paredes delgadas, circundando os túbulos seminíferos. *S. liliium* apresentou comprimento tubular por grama de testículo maior do que o já observado nos demais mamíferos, contrastando com a menor duração de ciclo espermatogênico já registrada. Observou-se ainda elevado rendimento da espermatogênese, baixa capacidade suporte pelas células de Sertoli e grande investimento em células de Leydig. Conclui-se que morcegos *S. liliium* machos apresentam padrão reprodutivo anual contínuo na referida área de estudo, uma vez que a quantificação de grande parte dos componentes tubulares e intertubulares, bem como os níveis de testosterona se mantiveram constantes ao longo das estações climáticas anuais.

## Abstract

MORAIS, Danielle Barbosa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Spermatogenesis in the bat *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae): morphological, morphometric and ultrastructural aspects.** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-advisers: Tarcizio Antônio Rêgo de Paula and Mariana Machado Neves.

The bat *Sturnira lilium* has a dietary habit predominantly frugivorous, being an important pollinator, especially for plant species that depend on bats for pollination and dispersal of their seeds. Due to its importance, it becomes essential to know how this bat species reproduces, as well as if there is influence of environmental factors on their reproductive cycle, since this influence has been reported for several bat species. Once little information is available about the quantification and characterization of spermatogenesis in bats, this study aimed to provide information about testicular activity of *S. lilium* throughout the annual climatic seasons. To this end, we performed a morphological and morphometric characterization, with calculation of indices indicative of sperm production, characterization of the stages that compose the seminiferous epithelium cycle, and quantification of its androgenic capacity, in the testes of adult individuals. Thus, 14 animals were captured in the dry ( $n = 7$ ) and rainy seasons ( $n = 7$ ), in Viçosa city-MG. After euthanasia, testicular fragments were processed histologically for morphological, morphometric and histochemical analysis by light microscopy and ultrastructural analysis under transmission electron microscopy. The animals showed GSI average of 0.27 %, and their testes followed the general organization described for mammals. The ultrastructural analysis allowed observing the formation of the acrosomal cap in round spermatids, besides the characterization of other cells that compose the tubular compartment. Considering both seasons, the testicular parenchyma was composed of about 85 % of seminiferous tubules and 15 % of intertubule, and the tubular length per gram of testis had approximately 80 m. There was no difference in the count of apoptotic cells between the seasons. The highest spermatid reserve of the testes was observed during the rainy season, with  $43.47 \times 10^6$  cells, as well as the daily sperm production, whose average was  $12.60 \times 10^6$  cells at the same season. The presence of primary spermatocytes at zygotene in the stage 1 of the seminiferous epithelium cycle, according to the tubular morphology method, differs from many mammalian described so far. The animals of this study showed an average mitotic index of 15.4 cells, meiotic index of 2.9, general yield of spermatogenesis of 68.7 cells, and support capacity of the Sertoli cells of 7.0 cells. The duration of one seminiferous epithelium

cycle was 3.45 days, and approximately 15.52 days were required for development of sperm from spermatogonia. Leydig cells were the main component of intertubule, followed by blood vessels, connective tissue and lymphatic space. The number of Leydig cells per gram of testis, whose average was  $11 \times 10^7$  cells, showed no significant difference throughout the seasons, as well as the Leydigosomatic index (mean of 0.03 %) and the plasmatic levels of testosterone (mean of 21 ng/ml). The ultrastructural analysis revealed abundant lipid droplets in the cytoplasm of Leydig cells, as well as collagen fibers in connective tissue and lymph spaces with thin walls, surrounding the seminiferous tubules. *S. liliium* showed tubular length per gram of testis above the observed in other mammals, in contrast to the lowest ever recorded for the spermatogenic process. It was also observed high efficiency of spermatogenesis, low carrying capacity by Sertoli cells and a large investment in Leydig cells. It can be concluded that bats *S. liliium* males have annual reproductive pattern continuous at the area of study, once that the quantification of great part of the tubular and intertubular components, as well as testosterone levels remained constant throughout the year.

## 1. Introdução geral

Os morcegos possuem importância fundamental na regulação dos ecossistemas tropicais, uma vez que atuam no ambiente de diversas maneiras, seja como dispersores de sementes e polinizadores ou atuando no controle de populações de insetos. Algumas espécies pertencentes à família Phyllostomidae estão ainda relacionadas à transmissão do vírus da raiva (Reis et al., 2007). Adicionalmente, este grupo de mamíferos possui características únicas que o tornam alvo de grande interesse científico.

Apesar do grande número de estudos ecológicos envolvendo estes animais, são escassas as pesquisas que avaliam a dinâmica de suas gônadas. Estes conhecimentos são fundamentais, pois possibilitam conhecer a fundo o ciclo reprodutivo dos morcegos. Sabe-se que sua reprodução pode ser diretamente influenciada por fatores ambientais, sobretudo no caso de morcegos que habitam regiões temperadas (Gustafson, 1987). Morcegos de regiões tropicais, por sua vez, podem manter sua atividade reprodutiva durante todo o ano, embora algumas espécies possam diminuir a atividade reprodutiva em determinada estação (Ortêncio-Filho et al., 2007; Morais, 2008).

A avaliação de parâmetros testiculares podem fornecer informações seguras sobre a atividade reprodutiva de uma espécie (Kenagy e Trombulak, 1986; Azevedo et al., 2010). Deste modo, o conhecimento da atividade reprodutiva de uma espécie pode ser obtido a partir da quantificação histológica das gônadas, sendo este um requisito básico para estudos que envolvam parâmetros reprodutivos (Paula et al., 2002). Ademais, análises ultraestruturais e imunohistoquímicas podem trazer importantes informações adicionais sobre a atividade das células que compõem o parênquima testicular.

Para este trabalho foi escolhido como objeto de estudo o morcego *Sturnira lilium*, uma espécie frugívora amplamente distribuída pelo território brasileiro e que apresenta fundamental importância para a regeneração florestal, havendo espécies de plantas que dependem exclusivamente deste morcego para a dispersão de suas sementes (Marinho-Filho e Vasconcellos-Neto, 1994; Sazima et al., 2003). Apesar do grande número de estudos relacionados à ecologia destes animais, bem como sobre características de seu ciclo reprodutivo, trabalhos sobre a atividade reprodutiva dos machos são raros, especialmente utilizando-se métodos morfométricos.

## 2. Justificativa

Apesar de estarem usualmente associados à transmissão do vírus rábico, os morcegos possuem importantes papéis ecológicos, envolvendo desde o controle de insetos até a recuperação de áreas florestais degradadas.

Existem inúmeros trabalhos abordando a ecologia destes animais, bem como suas características fisiológicas e comportamentais (Marinho Filho e Sazima, 1998; Simmons, 2005; Reis et al., 2007; Mello et al, 2008; Freitas et al., 2010; Carvalho-Costa et al., 2012; Genoud e Christe, 2011; Jonasson e Willis, 2011). Porém, com relação ao seu ciclo reprodutivo, a maioria dos estudos em morcegos avalia as variações de peso nas gônadas masculinas e femininas, presença de fêmeas gestantes e/ou lactantes, bem como de filhotes e indivíduos jovens, presença de testículos em posição abdominal ou escrotados, presença ou ausência de espermatozóides na luz dos túbulos seminíferos e epidídimo e presença ou ausência de folículos ovarianos pré-ovulatórios. Poucos trabalhos abordam com maior detalhe a histologia das gônadas, sendo que até o momento não foram encontrados trabalhos descrevendo em nível histomorfométrico o processo espermatogênico do morcego neotropical *S. lilium*. Neste sentido, o conhecimento de sua atividade espermatogênica torna-se de fundamental importância por permitir a caracterização reprodutiva de uma espécie de tamanha importância ecológica.

O entendimento do ciclo reprodutivo e dos fatores que interferem na atividade reprodutiva dos morcegos é complexo, diante do variado conjunto de estratégias reprodutivas e de sistemas de acasalamento encontrados entre os quirópteros (Fleming et al., 1972; Myers, 1977; Bradbury e Vehrencamp, 1977; Wilson, 1979; Altringham, 1998; Pulchério-Leite, 2008; Bernardi, 2011). Assim, a aplicação de análises morfométricas testiculares, aliadas à morfologia das gônadas, permitem inferir sobre a dinâmica gonadal e conseqüentemente sobre a capacidade reprodutiva do animal, podendo-se desvendar os padrões de espermatogênese, avaliando inclusive sua variação reprodutiva sazonal. Para tal podem ser utilizados cálculos que permitem quantificar a produção espermática a partir da compartimentalização do testículo em seus diferentes componentes funcionais e estruturais. Além disso, demais análises morfométricas podem fornecer dados relevantes para a avaliação da eficiência espermatogênica, podendo-se estimar até mesmo o número de espermatozóides produzidos por testículo.

### 3. Objetivos

Neste estudo objetivou-se avaliar a atividade espermatogênica do morcego frugívoro *Sturnira lilium* através da caracterização das células que compõem o epitélio seminífero e dos componentes do compartimento intertubular. Para tal, foram feitas as seguintes análises morfométricas:

- Índice Gonadossomático (IGS);
- Proporção volumétrica e volume dos componentes do parênquima testicular;
- Diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero;
- Comprimento dos túbulos seminíferos;
- Índice Tubulossomático (ITS);
- Caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero e suas frequências;
- Estimativa da população celular do epitélio seminífero:
  - Contagem de células do epitélio seminífero no estágio 1;
  - Mensuração dos diâmetros nucleares de células espermatogênicas e nucleolares de células de Sertoli no estágio 1;
- Rendimento intrínseco da espermatogênese:
  - Coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais;
  - Rendimento meiótico;
  - Rendimento geral da espermatogênese;
- Índice de células de Sertoli;
- Número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo;
- Índice apoptótico;
- Reserva espermática testicular;
- Duração do ciclo do epitélio seminífero;
- Produção espermática diária;
- Proporção volumétrica e volume dos componentes intertubulares;
- Proporção nucleoplasmática de células de Leydig;
- Volume nuclear, citoplasmático e celular de Leydig;
- Volume total de células de Leydig por testículo;
- Índice Leydigossomático (ILS);
- Número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;
- Dosagem de testosterona;
- Caracterização da ultraestrutura testicular.

## 4. Revisão de literatura

### 4.1. Ordem Chiroptera

A Ordem Chiroptera representa a segunda maior ordem de mamíferos do mundo, sendo reconhecidas aproximadamente 1.100 espécies (Simmons, 2005). No Brasil constituem um terço da fauna de mamíferos (Marinho Filho e Sazima, 1998), apresentando grande importância ecológica por sua alta diversidade e abundância em regiões tropicais, o que torna este grupo um interessante objeto de estudos (Nowak, 1991; Cole e Wilson, 1996). Os morcegos possuem características únicas que os tornam alvo de grande interesse científico, por serem os únicos mamíferos voadores e, portanto, possuírem grande facilidade de dispersão e uma fisiologia única adaptada ao voo.

Dois subordens são registradas dentro da ordem Chiroptera: Megachiroptera e Microchiroptera. Os megaquirópteros ocorrem no Velho Mundo e Oceania, e seu peso corporal pode ultrapassar 1,5 Kg, com envergadura de até 2 m. Esta subordem compreende apenas uma família, com 42 gêneros e 185 espécies. Os microquirópteros encontram-se amplamente distribuídos por todo o globo, envolvendo 17 famílias, 157 gêneros e mais de 900 espécies, com variações de peso entre 2 a 200 g (Simmons, 2005).

Os morcegos são animais noturnos e constituem um dos grupos de mamíferos mais diversificados quanto aos hábitos alimentares, onde praticamente todos os grupos tróficos podem ser encontrados, excetuando-se saprófagos. Deste modo, podem ser encontrados morcegos frugívoros, insetívoros, nectarívoros, polinívoros, hematófagos, piscívoros, carnívoros e onívoros, sendo que algumas espécies podem se alimentar também de outros morcegos (Fenton, 1992; Reis et al., 2007). Assim, merecem especial atenção por atuarem no ambiente de diversas maneiras, como na dispersão de sementes, polinização, controle de insetos e também como vetores de zoonoses (Reis et al., 2007, Mello et al., 2008, Carvalho-Costa et al., 2012).

Morcegos frugívoros desempenham papel de extrema importância na regulação dos ecossistemas tropicais, como a Mata Atlântica, onde atuam na manutenção e recuperação florestal, incluindo o estabelecimento de espécies pioneiras (Cole e Wilson, 1996; Mikich e Bianconi, 2005; Mello et al., 2008). A importância dos morcegos na dispersão de sementes é tão grande que eles podem até mesmo influenciar a estrutura da vegetação através das espécies de frutos que consomem (Fleming e Heithaus, 1981). Tais frutos, chamados quiropterocóricos, possuem uma série de características que os

diferenciam dos frutos geralmente consumidos por aves e mamíferos não voadores, tais como coloração discreta, geralmente verde, amarelada, esbranquiçada ou marrom; odor de fermentação ou almíscar; ligação permanente à planta mãe, mesmo após a maturação e exposição na parte externa da planta, o que facilita a apreensão em vôo (van der Pijl, 1957; Howe, 1986; Mikich, 2002).

#### 4.2. *Sturnira lilium*

O morcego *Sturnira lilium* (Fig. 1), espécie escolhida para este estudo, pertence à família Phyllostomidae, subfamília Sternodermatinae, tribo Sturnirini. Os filostomídeos constituem a maior família de morcegos americanos, com cerca de 160 espécies. Os membros desta família apresentam como característica marcante a presença de uma folha nasal membranosa, em forma de lança ou folha, na extremidade do focinho (Simmons, 2005; Reis et al., 2007).



Figura 1. Exemplar macho de *Sturnira lilium*.

*S. lilium* ocorre desde as pequenas Antilhas e do México até o nordeste da Argentina, Uruguai e Paraguai, e por todo o Brasil (Simmons, 2005; Reis et al., 2007). É uma espécie de pequeno a médio porte, com peso corporal de cerca de 20 g. Sua coloração varia do cinza ao alaranjado, podendo mostrar diferenças entre sexos, idade e distribuição geográfica (Husson, 1962; Reis et al., 2007). Os machos podem apresentar pelos laranja-vivo evidentes na altura dos ombros e glândulas que liberam odor em animais ativos reprodutivamente (Gannon et al., 1989). Tais características estão, portanto, relacionadas à maturidade sexual, sendo normalmente ausentes em indivíduos mais jovens (Goodwin e Greenhall, 1961).

São morcegos de olhos grandes, verrugas organizadas em meia-lua no lábio inferior, membrana interfemural reduzida e muitos pêlos entre os membros posteriores. Seu hábito alimentar é predominantemente frugívoro, podendo ainda atuar como polinizadores de algumas espécies de plantas (Vieira e Carvalho-Okano, 1996; Reis et al., 2007; Mello et al., 2008).

Os indivíduos desta espécie apresentam forte preferência alimentar pelos frutos da família Solanaceae, a qual representa aproximadamente 80 % de sua dieta (Mello et al., 2008). No entanto consome também outros frutos, como representantes das famílias Piperaceae, Cecropiaceae e Moraceae (Passos et al., 2003; Mello et al., 2008). Esta preferência varia provavelmente em função do período de maturação dos frutos, sendo que a grande preferência da espécie por frutos solanáceos pode estar ligada ao fato de que este gênero apresenta maior tempo de frutificação, sendo de 8 a 10 meses (Marinho-Filho, 1991).

Para as plantas é interessante que suas sementes sejam dispersas sobre grandes áreas, e os morcegos são hábeis neste serviço (Giannini, 1999). A preferência de *S. liliun* pelas solanáceas representa uma particular importância para a reprodução da espécie *Dysochroma viridiflorum*, que depende dos morcegos para a polinização e dispersão de suas sementes (Sazima et al., 2003). A frugivoria é importante ainda para a regeneração de plantas pioneiras, como *Vismia cayennensis* (Marinho-Filho e Vasconcellos-Neto, 1994).

### **4.3. A reprodução em morcegos**

O período reprodutivo é uma fase crítica para a maioria dos organismos, e condições ambientais e fatores endógenos estão fortemente associados com a reprodução em morcegos (Neuweiler, 2000). Em regiões tropicais, o ciclo reprodutivo está fortemente associado à estação chuvosa e a fatores climáticos combinados, como temperatura e precipitação pluviométrica, os quais influenciam a disponibilidade de alimento, interferindo diretamente no ciclo reprodutivo de morcegos (Fleming et al., 1972; Racey, 1982; Morais, 2008).

Morcegos podem apresentar reprodução sazonal ou assazonal e, de modo geral, possuem quatro padrões reprodutivos baseando-se na atividade reprodutiva das fêmeas: (1) monoestria sazonal, com um único período reprodutivo anual; (2) poliestria sazonal bimodal, com dois períodos próximos de nascimentos durante o ano; (3) poliestria contínua, com atividade reprodutiva durante a maior parte do ano seguida de um curto

período de inatividade (podendo-se incluir uma poliestria sazonal trimodal); (4) poliestria assazonal, com atividade reprodutiva durante todo o ano (Fleming et al., 1972; Myers, 1977; Wilson, 1979; Willig, 1985; Pulchério-Leite, 2008; Bernardi, 2011).

Os termos monoestria e poliestria foram aplicados inicialmente por Carter (1970), a morcegos com um ou mais estros por ano, respectivamente. O mesmo autor também descreveu o termo estro pós-parto como o estro que sucede o parto, sem um período intermediário de anestro. Se este estro recorrente ocorrer apenas durante um período específico do ano, ele será um dos fenômenos que constituem a poliestria sazonal (Carter, 1970). O registro de fêmeas simultaneamente grávidas e lactantes indica a ocorrência de estro pós-parto (Wilson, 1979; Trajano 1984).

Quase todas as espécies de filostomídeos são poliestras e monótocas, ou seja, produzem apenas um filhote por gestação (Carter, 1970; Reis et al., 2007). Diversos filostomídeos estudados por Fleming e colaboradores (1972) na Costa Rica e no Panamá, incluindo *Sturnira lilium* e *Artibeus lituratus*, se mostraram sazonalmente poliestros, com fêmeas produzindo dois filhotes por ano (poliestria sazonal bimodal), monótocas e com estro pós-parto. Embora os padrões reprodutivos possam variar intraespecificamente em espécies de ampla distribuição geográfica (Reis et al., 2007), a poliestria sazonal tem sido o padrão mais encontrado para *A. lituratus* (Willig, 1985; Ramirez-Pulido et al., 1993; Sosa e Ramoni-Perazzi, 1995), enquanto para *S. lilium*, tem sido freqüente a poliestria contínua (Sánchez-Hernández et al., 1986; Estrada e Coates-Estrada, 2001; Pulchério-Leite, 2008; Kaku-Oliveira et al., 2010), apesar de Bernardi (2011) ter observado nessa espécie um padrão reprodutivo poliétrico sazonal. Em machos de *S. lilium* foi observada produção contínua de espermatozóides ao longo do ano, o que parece ser comum em filostomídeos (Tamsitt e Valdivieso, 1965; Taddei, 1976; Pulchério-Leite, 2008).

O sistema de acasalamento predominante em *S. lilium* é discutível. Embora os morcegos em geral apresentem comportamento reprodutivo poligínico, com defesa de um harém por um macho dominante (Bradbury e Vehrencamp, 1977; Altringham, 1998), alguns autores sugerem para essa espécie comportamento monogâmico, diante da razão sexual de 1:1 encontrada em suas capturas (Sánchez-Hernández et al., 1986; Pulchério-Leite, 2008). No entanto, há carência de conhecimentos relativos ao comportamento de utilização de abrigos por *S. lilium* e, na maioria dos casos, faltam informações sobre as características internas desses abrigos. Além disso, de acordo com Fenton e colaboradores (2000), ainda não está claro se os indivíduos de *S. lilium* tipicamente se abrigam em grupos, solitariamente ou se ocorre uma combinação das

duas situações, o que dificulta uma inferência mais segura sobre o tamanho dos grupos desta espécie (Pulchério-Leite, 2008).

#### **4.4. O testículo**

A habilidade reprodutiva dos machos sexualmente maduros depende da capacidade dos testículos em produzir grande número de espermatozoides viáveis e de concentrações adequadas de andrógenos para promover a libido e maturação dos órgãos reprodutivos (Gier e Marion, 1970). O testículo é um órgão par, com funções exócrina e endócrina, localizado no escroto e envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo, a albugínea testicular. Esta túnica emite septos para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, dividindo o testículo em lóbulos. Funcionalmente o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos: o tubular e o intertubular (Russell et al., 1990).

O compartimento tubular é constituído pelos túbulos seminíferos e constitui a maior parte do testículo ocupando, na maioria dos mamíferos, de 70 % a 90 % do parênquima testicular (França e Russell, 1998; Morais, 2008). Estes túbulos formam alças bastante contorcidas, as quais possuem suas duas extremidades conectadas à rede testicular, localizada numa região rica em vasos e tecido conjuntivo, denominada mediastino testicular. A rede testicular encontra-se conectada ao epidídimo através dos ductulos eferentes (Russell et al., 1990). Os túbulos seminíferos são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular. A túnica própria reveste o túbulo externamente, sendo composta de células mioídes, ou peritubulares, e membrana basal. No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares de origens embriológicas distintas: as células germinativas, originárias do epiblasto, e as células de Sertoli, provenientes do epitélio celomático (Karl e Capel, 1998).

Juntamente com as células mioídes, as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas, que se encontram na porção basal do epitélio seminífero. As células de Sertoli, através de junções de oclusão que estabelecem entre si, dividem o epitélio seminífero em dois ambientes: o basal, onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (pré-leptótenos), e o adluminal, no qual se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de leptóteno, espermatócitos secundários e espermátides. Desta forma, o ambiente adluminal está totalmente sob o controle das células de Sertoli, as quais propiciam um

microambiente isolado do sistema imune, essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Setchell, 1991; Poccia, 1994; Sharpe, 1994). No lúmen tubular se encontram o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozoides recém espermiados.

Os elementos componentes do compartimento intertubular são as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável no tecido conjuntivo, constituída principalmente de fibroblastos e macrófagos (Russell et al., 1990; Setchell, 1991). A célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais freqüente do intertúbulo. Esta célula apresenta marcante produção de andrógenos, os quais são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol (Bardin, 1996; Ye et al., 2011). Dentre os andrógenos incluem-se a di-hidrotestosterona, que é responsável pela diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa (uretra, próstata, pênis e escroto) (Gilbert, 2006; Ye et al., 2011) e a testosterona, responsável pela masculinização do feto, com o desenvolvimento da genitália interna (vesícula seminal, ducto deferente e epidídimo), pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e manutenção da espermatogênese a partir da puberdade. A população de células de Leydig varia de acordo com a espécie e idade, podendo ainda passar por alterações quantitativas consideráveis em espécies cujo ciclo reprodutivo é sazonal, visto que fora do período reprodutivo os níveis de andrógenos encontram-se reduzidos a valores basais, aumentando gradativamente no período de recrudescência testicular, até entrar novamente no período reprodutivo (Gustafson, 1987; Sharpe, 1994; Zirkin et al., 1994; Gilbert, 2006).

#### **4.5. O processo espermatogênico**

A espermatogênese é um processo complexo e bem organizado que ocorre no interior dos túbulos seminíferos e dura de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos investigados. Este processo pode ser dividido em três fases, baseando-se em considerações morfológicas e funcionais: (1) fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as células sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; (2) fase meiótica ou espermatocitogênica, na qual o material genético é duplicado e passa por recombinação genética durante a meiose; e (3) fase de diferenciação ou espermiogênica, na qual as espermátides sofrem enormes modificações, transformando-se em espermatozoides, células especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos.

Cada uma destas fases dura aproximadamente 1/3 do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; França e Russell, 1998).

De maneira geral, nos animais sexualmente maduros, as espermatogônias podem ser classificadas em duas categorias básicas: espermatogônias indiferenciadas e diferenciadas (de Rooij, 1998). As espermatogônias do tipo A isoladas (Ai), pareadas (Apr) e alinhadas (Aal) pertencem à primeira categoria, enquanto as espermatogônias do tipo A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub>, intermediárias (In) e espermatogônias do tipo B pertencem à categoria das diferenciadas, estando comprometidas de forma irreversível com a formação de espermatozoides. Vale ressaltar que existem consideráveis diferenças em relação ao número de gerações de espermatogônias diferenciadas nas diversas espécies de mamíferos. No entanto, este número não ultrapassa seis gerações (Russell et al., 1990; França e Russell, 1998; de Rooij e Grooteoed, 1998).

Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, as células espermatogênicas não estão arranjadas ao acaso, mas sim organizadas numa série bem definida de associações celulares ou estádios. Dentre os sistemas utilizados para se estudar os estádios do ciclo do epitélio seminífero, o mais empregado é aquele baseado na forma e na localização dos núcleos das espermátides e espermatócitos, e na presença de figuras de divisões meióticas. Este sistema, designado como método da morfologia tubular por Berndtson (1977), permite a divisão de 8 estádios por ciclo em mamíferos. Outro método de identificação se baseia nas características morfológicas das espermátides, em particular à formação do sistema acrossômico, sendo o número de estádios variável para cada espécie (Berndtson, 1977; Russell et al., 1990).

Com exceção de algumas espécies de primatas, o arranjo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é segmentar em todos os mamíferos já investigados e usualmente existe apenas um estádio por secção transversal de túbulo seminífero (Leblond e Clermont, 1952; Russell et al., 1990). Os estádios se sucedem numa determinada área do epitélio seminífero, com o decorrer do tempo, e esta sequência constitui o processo denominado ciclo do epitélio seminífero (Leblond e Clermont, 1952; Ortavant et al., 1977; Russell et al., 1990).

## 5. Referências Bibliográficas

- Altringham, J.D. 1998. Bats: Biology and behavior. Oxford: University Press, 262 p.
- Azevedo, M.H.F.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Fonseca, C.C.; Costa, E.P.; Costa, D.S.; Peixoto, J.V. 2010. Cell population indexes of spermatogenic yield and testicular sperm reserves in adult jaguars (*Panthera onca*). Anim Reprod Sci. 118(1):83-88.
- Bardin, C.W. 1996. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: Payne, A.H.; Hardy, M.P.; Russell, L.D. (Eds.), The Leydig Cell. Vienna: Cache River Press, pp. 31-42.
- Bernardi, I.P. 2011. Estrutura de comunidade, reprodução e distribuição temporal das capturas de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em relictos de Floresta Estacional Decidual no sul do Brasil. Curitiba: UFPR, 116 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação), Universidade Federal do Paraná.
- Berndtson, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. Int J Androl. 13(4):315-326.
- Bradbury, J.W.; Vehrencamp, S.L. 1977. Social organization and foraging in emballonurid bats. I. Field studies. Behav Ecol Sociobiol. 1:337-81.
- Carter, D.C. 1970. Chiropteran reproduction. In: Slaughter, B.H.; Walton, D.W. (Eds.), About bats: A Chiropteran Symposium. Dallas: Southern Methodist University Press, pp. 233-246.
- Carvalho-Costa, F.A.; Tedesqui, V.L.; Monteiro, M.J.N.; Bóisa, M.N. 2012. Outbreaks of attacks by hematophagous bats in isolated riverine communities in the Brazilian Amazon: A challenge to rabies control. Zoonoses Public Health. 59(4):272-277.
- Cole, F.R.; Wilson, D.E. 1996. Mammalian diversity and natural history. In: Wilson, D.E.; Cole, F.R.; Nichols, J.D.; Rudran, R.; Foster, M.S. (Eds.), Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard methods for mammals. Washington: Smithsonian Institution Press, pp. 9-39.
- de Rooij, D.G. 1998. Stem cells in the testis. Int J Exp Pathol. 79(2):67-80.
- de Rooij, D.G.; Grootegoed, J.A. 1998. Spermatogonial stem cells. Curr Opin Cell Biol. 10(6):694-701.

- Estrada, A.; Coates-Estrada, R. 2001. Species composition and the reproductive phenology of bats in a tropical landscape at Los Tuxtlas, México. *J Trop Ecol.* 17:627-646.
- Fenton, M.B. 1992. *Bats*. New York: Facts on file, Inc, 207 p.
- Fenton, M.B.; Vonhof, M.J.; Bouchard, S.; Gill, S.A.; Johnston, D.S.; Reid, F.A.; Riskin, D.K.; Standing, K.L.; Taylor, J.R.; Wagner, R. 2000. Roosts used by *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae) in Belize. *Biotropica.* 32(4a):729-733.
- Fleming, T.H.; Heithaus, E.R. 1981. Frugivorous bats, seed shadows, and the structure of tropical forests. *Biotropica* 13(Suppl.):45-53.
- Fleming, T.H.; Hooper, E.T.; Wilson, D.E. 1972. Three Central American bat communities: structure, reproductive cycles and movement patterns. *Ecology.* 53(4):555-569.
- França, L.R.; Russell, L.D. 1998. The testis of domestic mammals. In: Regadera, J.; Martinez-Garcia, F. (Eds.), *Male Reproduction: a Multidisciplinary Overview*. Madrid: Churchill Communications, pp.197-219.
- Freitas, M.B.; Goulart, L.S.; Morais, D.B.; Amaral, T.S.; Barros, M.S.; Matta, S L.P. 2010. Energy metabolism and fasting in male and female insectivorous bats *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Braz J Biol.* 70(3):617-621.
- Gannon, M.R.; Willig, M.R.; Jones Jr, J.K. 1989. *Sturnira lilium*. *Mamm Species.* 333:1-5.
- Genoud, M.; Christe, P. 2011. Thermal energetics and torpor in the common pipistrelle bat, *Pipistrellus pipistrellus* (Vespertilionidae: Mammalia). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 160(2):252-259.
- Giannini, N. 1999. Selection of diet and elevation by sympatric species of *Sturnira* in an Andean rainforest. *J Mammal.* 80:1186-1195.
- Gier, H.T.; Marion, G.B. 1970. Development of mammalian testis. In: Johnson, A.D.; Gomes, W.R.; Van Der Mark, N.L. (Eds.), *The Testis*. Londres: Academic Press, pp. 2-45.
- Gilbert, F.S. 2006. *Developmental Biology*. 8. ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc, pp. 751.

- Goodwin, G.G.; Greenhall, A.M. 1961. A review of the bats of Trinidad and Tobago: descriptions, rabies infections and ecology. *Bull Am Mus Nat Hist.* 122(3):187-302.
- Gustafson, A.W. 1987. Changes in Leydig cell activity during the annual testicular cycle of the bat *Myotis lucifugus lucifugus*: histology and lipid histochemistry. *Am J Anat.* 178(4):312-325.
- Howe, H.F. 1986. Seed dispersal by fruit eating birds and mammals. In: Murray, D.R. (Ed.), *Seed dispersal*. Sydney: Academic Press, pp. 123-189.
- Husson, A.M. 1962. The bats of Suriname. *Zoologische Verhandelingen.* 58:1-282.
- Jonasson, K.A.; Willis, C.K. 2011. Changes in body condition of hibernating bats support the thrifty female hypothesis and predict consequences for populations with white-nose syndrome. *PLoS One.* 6(6):e21061.
- Kaku-Oliveira, N.Y.; Munster, L.C.; Rubio, M.B.G.; Passos, F.C. 2010. Reprodução em cinco espécies de morcegos filostomídeos na Reserva Natural do Salto Morato, Guaraqueçaba, Paraná. *Chiroptera Neotropical Anais V EBEQ Suppl.* 16(1):22-24.
- Karl, J.; Capel, B. 1998. Sertoli cells of mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developl Biol.* 203(2):323-333.
- Kenagy, G.J.; Trombulak, S.C. 1986. Size and function of mammalian testis in relation to body size. *J Mammal.* 67:1-22.
- Leblond, C.P.; Clermont, Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 55(4):548-584.
- Marinho-Filho, J.S. 1991. The coexistence of two frugivorous bat species and the phenology of their food plants in Brazil. *J Tropical Ecol.* 7(1):59-67.
- Marinho-Filho, J.S.; Sazima, I. 1998. Brazilian bats and conservation biology: a first survey. In: Kuntz, T.H.; Racey, P.A. (Eds.), *Bat: Biology and Conservation*. Washington: Smithsonian Institution Press, pp.282-294.
- Marinho-Filho, J.; Vasconcellos-Neto, J. 1994. Dispersão de sementes de *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers. (Guttiferae) por morcegos na região de Manaus, Amazonas. *Acta Bot Bras.* 8(1):87-96.

- Mello, M.A.R.; Kalko, E.K.V.; Silva, W.R. 2008. Diet and abundance of the bat *Sturnira lilium* (Chiroptera) in a Brazilian montane Atlantic Forest. *J Mammal.* 89(2):485-492.
- Mikich, S.B. 2002. A dieta dos morcegos frugívoros (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae) de um pequeno remanescente de Floresta Estacional Semidecidual do Sul do Brasil. *Rev Bras Zool.* 19(1):239-249.
- Mikich, S.B.; Bianconi, G.V. 2005. Potencializando o papel dos morcegos frugívoros na recuperação de áreas degradadas. *Boletim de Pesquisa Fl., Colombo.* 51:155-164.
- Morais, D.B. 2008. Morfologia e morfometria testicular em morcego insetívoro (*Molossus molossus*, Pallas, 1776 Chiroptera: Molossidae). Viçosa: UFV, 74 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Federal de Viçosa.
- Myers, P. 1977. Patterns of reproduction in four species of vespertilionid bats in Paraguay. *Univ Calif Publ Zool.* 107:1-41.
- Neuweiler, G. 2000. The biology of bats. Oxford: Oxford University Press, 310 p.
- Nowak, R.M.; Paradiso, J.L. 1991. Walker's mammals of the world. 5. ed. Vol 1. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 642 p.
- Ortavant, R.; Courot, M.; Hochereau-De-Reviers, M.T. 1977. Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole, H.H.; Cupps, P.T. (Eds.), *Reproduction in Domestic animals.* 3. ed. New York: Academic Press, pp. 203-227.
- Ortêncio-Filho, H.; Reis, N.R.; Pinto, D.; Vieira, D.C. 2007. Aspectos reprodutivos de *Artibeus lituratus* (Phyllostomidae) em fragmentos florestais na região de Porto Rico, Paraná, Brasil. *Chiropt Neotrop.* 13(2):313-318.
- Passos, F.C.; Silva, W.R.; Pedro, W.A.; Bonin, M.R. 2003. Frugivoria em morcegos (Mammalia, Chiroptera) no Parque Estadual Intervales, sudeste do Brasil. *Rev Bras Zool.* 20(3):511-517.
- Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Costa, D.S., 2002. Avaliação histológica e quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. *Biosci J.* 18(1):121-136.
- Poccia, D. 1994. Molecules of the somatic cells. In: Poccia, D. (Ed.), *Molecular biology intelligence unit: molecular aspects of spermatogenesis.* Austin: R.G. Landes Company, pp.75-90.

- Pulchério-Leite, A. 2008. Uso do espaço por *Artibeus lituratus* e *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae) em fragmentos florestais urbanos de Curitiba, Paraná. Curitiba: UFPR, 113 p. Tese (Doutorado em Zoologia), Universidade Federal do Paraná.
- Racey, P.A. 1982. Ecology of bat reproduction. In: Kunz, T.H. (Ed.), Ecology of Bats. Nova York: Plenum, pp. 57-104.
- Ramirez-Pulido, J.; Armella, M.A.; Castro-Campillo, A. 1993. Reproductive patterns of three neotropical bats (Chiroptera: Phyllostomidae) in Guerrero, México. Southwest Nat. 38(1):24-29.
- Reis, N.R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A.; Lima, I.P. 2007. Morcegos do Brasil. 1. ed. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina, 256 p.
- Russell, L.D.; Ettlín, R.A.; Sinha-Hikim, A.P.; Clegg, E.D. 1990. Mammalian spermatogenesis. In: Russell, L.D.; Ettlín, R.A.; Sinha-Hikim, A.P.; Clegg, E.D. (Eds.), Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Bolesta: Cache River Press, pp. 1-40.
- Sánchez-Hernández, C.; Osorio, M.T.C.; Tapia, C.B.C. 1986. Patron reproductivo de *Sturnira lilium parvidens* (Chiroptera: Phyllostomidae) en la costa central del Pacifico de México. Southwest Nat. 31(3):331-340.
- Sazima, M.; Buzato, S.; Sazima, I. 2003. *Dyssochroma viridiflorum* (Solanaceae): a reproductively bat-dependent epiphyte from the Atlantic rainforest in Brazil. Ann Bot. 92(5):725-730.
- Setchell, B.P. 1991. Male reproductive organs and semen. In: Cupps, P.T. (Eds.), Reproduction in Domestic Animals. 4. ed. San Diego: Academic Press, pp. 221-250.
- Sharpe, R.M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E.; Neill, J.D. (Eds.), The Physiology of Reproduction. 2. ed. New York: Raven Press, pp.1363-1434.
- Simmons, N. B. 2005. Order Chiroptera. In: Wilson, D.E.; Reeder, D.M. (Eds.), Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. 3. ed. Maryland: Johns Hopkins University Press, pp. 312-529.
- Sosa, M.; P. Ramoni-Perazzi. 1995. Reproductive pattern of *Artibeus jamaicensis* Leach, 1821 and *A. lituratus* (Olfers, 1818) (Chiroptera: Phyllostomidae), in an arid zone of Venezuelan Andes. Rev Bras Biol. 55(4):705-713.

- Taddei, V.A. 1976. The reproduction of some Phyllostomidae (Chiroptera) from the northwestern region of the state of São Paulo. *Bol Zool Univ São Paulo*. 1:313-330.
- Tamsitt, J.R.; Valdivieso, D. 1965. The male reproductive cycle of the bat *Artibeus lituratus*. *American Midland Naturalist*. 73 (1):150-160.
- Trajano, E. 1984. Ecologia de populações de morcegos cavernícolas em uma região cárstica do sudeste do Brasil. *Rev Bras Zool*. 2(5):255-320.
- van der Pijl, L. 1957. The dispersal of plants by bats (Chiropterochory). *Acta Bot Neerland*. 6:291-315.
- Vieira, M.F.; Carvalho-Okano, R.M. 1996. Pollination biology of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) in Southeastern Brazil. *Biotropica*. 28(1):61-68.
- Willig, M.R. 1985. Reproductive patterns of bats from Caatingas and Cerrado biomes in Northeast Brazil. *J Mammal*. 66(4):668-681.
- Wilson, D.E. 1979. Reproductive patterns. In: Baker, R.J.; Jones Jr, J.K.; Carter, D.C. (Eds.), *Biology of Bats of the New World Family Phyllostomatidae*. Part III. Texas: Museum of Texas Tech Univ, pp. 317-378.
- Ye, L.; Su, Z.J.; Ge, R.S. 2011. Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes. *Molecules*. 16(12):9983-10001.
- Zirkin, B.R.; Awoniyi, C.; Griswold, M.D.; Russell, L.D.; Sharpe, R. 1994. Is FSH required for adult spermatogenesis? *J Androl*. 15(4):273-276.

## Artigo 1

### Estádios e duração do ciclo do epitélio seminífero no morcego frugívoro *Sturnira lilium* (E. Geoffroy, 1810, Chiroptera: Phyllostomidae)

#### Resumo

O conhecimento dos estádios que compõem o ciclo do epitélio seminífero (CES) e a determinação da duração do processo espermatogênico é fundamental para a quantificação e o entendimento da dinâmica da espermatogênese. Neste sentido, objetivou-se a caracterização dos estádios que compõem o CES do morcego *Sturnira lilium*, com a avaliação da frequência média de cada um destes estádios ao longo do ano, acompanhado do cálculo da duração do processo espermatogênico e caracterização da ultraestrutura das células que compõem o epitélio seminífero. Após eutanásia, fragmentos testiculares foram processados para análises morfológicas e imunohistoquímicas em microscópio de luz, e para análise ultraestrutural sob microscopia eletrônica de transmissão. De acordo com o método da morfologia tubular, o CES em *S. lilium* foi dividido em 8 estádios, seguindo o padrão encontrado nos demais mamíferos. Foram encontrados espermátocitos primários em zigóteno no estágio 1 do ciclo. Não houve variação na frequência de cada um dos estádios ao longo do ano, sendo que o estágio 1 foi o mais frequente e o estágio 7 o menos frequente. Um ciclo espermatogênico teve duração estimada em 3,45 dias, e a duração total da espermatogênese foi calculada em 15,52 dias. A caracterização ultraestrutural permitiu o acompanhamento da formação do capuz acrossômico nas espermátides arredondadas. Tais achados permitem concluir que os estádios que compõem o CES em *S. lilium* apresentaram-se, de um modo geral, semelhantes ao descrito para outros mamíferos e o processo espermatogênico apresentou a menor duração já registrada para mamíferos. A presença de espermátocitos primários em zigóteno no estágio 1 do ciclo se deve possivelmente à maior duração deste estágio.

**Palavras-chave:** Reprodução em morcegos, Bromodeoxiuridina, Espermatogônia, Espermátocito, Espermátide.

## 1. Introdução

As células que compõem o epitélio germinativo estão rigorosamente organizadas, e à medida que se dividem, progridem das camadas mais basais do epitélio seminífero em direção ao lúmen tubular, onde o espermatozóide será liberado. As diferentes fases pelas quais passam uma célula germinativa levam ao aparecimento de uma série de associações celulares, ou estádios, os quais podem ser observados ao longo do túbulo seminífero. Estes estádios se sucedem numa determinada área do epitélio seminífero com o decorrer do tempo e o seu aparecimento cíclico constitui o processo denominado ciclo do epitélio seminífero - CES (Leblond e Clermont, 1952; Ortavant et al., 1977; Russell et al., 1990).

O conhecimento dos estádios que compõem o CES e a determinação da sua frequência, associada à morfometria testicular, é fundamental para a quantificação e o entendimento da dinâmica da espermatogênese (Roosen-Runge e Giesel Jr., 1950; Courot et al., 1970; Ortavant et al., 1977). Sabe-se que a frequência média de cada um dos estádios do CES apresenta diferenças entre espécies, sendo um parâmetro relativamente constante entre indivíduos de uma mesma espécie (Amann, 1962; Courot et al., 1970; Clermont, 1972; Ortavant, 1977). Sua duração, no entanto, apresenta grandes diferenças interespecíficas. Uma vez que em torno de 4,5 ciclos são necessários para se completar o processo espermatogênico em mamíferos, a duração média da espermatogênese varia de 30 a 75 dias, sendo considerada uma constante espécie-específica (Clermont, 1972; Russell et al., 1990; França e Russell, 1998; Hess e França, 2007; Balarini et al., 2011).

Atualmente são conhecidas mais de 1.100 espécies de morcegos (Reis et al., 2007) e não se sabe até o momento quantos dias dura o CES em qualquer uma delas. Dentre as poucas informações existentes sobre a organização do epitélio seminífero e frequência dos estádios que compõem o CES em morcegos, Beguelini e colaboradores (2009) mostraram que a organização dos estádios nestes animais parece seguir o padrão observado em outros mamíferos.

Morcegos frugívoros desempenham papel de extrema importância na regulação dos ecossistemas tropicais, como a Mata Atlântica, onde atuam na manutenção e recuperação florestal, incluindo o estabelecimento de espécies pioneiras (Marinho-Filho e Vasconcellos-Neto, 1994; Cole e Wilson, 1996; Mikich e Bianconi, 2005; Mello et al., 2008). Sabe-se que fatores abióticos como temperatura e fotoperíodo possuem grande influência sobre o ciclo reprodutivo de morcegos (Heideman et al., 1992; Mello et al.,

2009). Deste modo, uma mesma espécie pode comportar-se de diferentes maneiras dependendo de sua área de ocorrência e das condições climáticas que lá predominam (Altringham, 1998; Neuweiler, 2000). Foi demonstrado que o ciclo reprodutivo do morcego frugívoro *Sturnira lilium* pode ser diretamente influenciado por fatores como a temperatura e a disponibilidade alimentar (Bronson, 1985; Mello et al., 2009). Esta espécie representa grande importância ecológica por sua atuação na polinização e dispersão de sementes de diversas plantas, sobretudo aquelas pertencentes à família Solanaceae (Marinho-Filho e Vasconcellos-Neto, 1994; Vieira e Carvalho-Okano, 1996; Sazima et al., 2003).

Diante da grande importância que o morcego *S. lilium* representa para a manutenção e recuperação florestal (Mikich, 2002; Mikich, et al., 2005) e da escassez de informações acerca de seu ciclo reprodutivo, foram feitas coletas ao longo das diferentes estações climáticas anuais objetivando a caracterização dos estádios que compõem o CES de *S. lilium*, com avaliação da frequência média de cada um destes estádios ao longo das estações, acompanhado da determinação da duração do CES e caracterização da ultraestrutura de células que compõem o epitélio seminífero. Tais informações são fundamentais, porque permitem um melhor entendimento da dinâmica e caracterização do processo espermatogênico nesta espécie, sendo básica para futuras publicações que avaliem a duração do CES em morcegos.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Área de estudo*

As capturas foram realizadas no município de Viçosa, região da Zona da Mata do estado de Minas Gerais, Brasil, nos anos de 2009 e 2010 (autorização nº 214887-1/SISBIO/IBAMA). Viçosa está localizada a 20°45'S e 42°07'W, a uma altitude média de 650 m, no sudeste do estado de Minas Gerais. Esta região é caracteristicamente montanhosa, inserida no bioma da Mata Atlântica cujo clima é do tipo Cwa (mesotérmico, úmido com verões chuvosos e invernos secos), segundo a classificação de Köppen. Apresenta déficit hídrico no período de maio a setembro e excedente de precipitação entre dezembro e março (Golfari, 1975). As médias anuais registradas no período de coletas para precipitação pluviométrica, temperatura e umidade relativa do ar foram, respectivamente, 0,91 mm, 18 °C e 78 % na estação seca (abril a setembro) e 7,20 mm, 23 °C e 79 % na estação chuvosa (outubro a março) (Fonte: Estação

Meteorológica do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa).

## 2.2. Coleta dos animais e processamento histológico

Foram capturados 14 espécimes de *Sturnira lilium*, machos e adultos, ao longo das diferentes estações climáticas dos anos de 2009 e 2010, sendo os animais agrupados nas estações seca (n=7) e chuvosa (n=7). A identificação dos animais adultos foi feita baseando-se na observação da fusão da cartilagem epifisária do quarto dedo, na junção metacarpo-falangeal, segundo Kunz e Anthony (1982).

Os animais foram abrigados em gaiolas e receberam frutas (mamão ou banana) e água *ad libitum*, desde a captura até a eutanásia, que foi realizada na manhã seguinte à noite da captura. A eutanásia foi feita por injeção de pentobarbital sódico (Nembutal), na concentração de 40 mg/Kg via intraperitoneal, seguido por injeção de solução saturada de cloreto de potássio. Após a eutanásia os animais foram pesados e seus testículos removidos. Todo procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFV – nº 93/011).

Para análises morfológicas sob microscopia de luz, os testículos foram fixados por imersão em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 h e transferidos para etanol 70 %. Fragmentos testiculares foram desidratados em série etanólica crescente realizando-se a inclusão em glicol-metacrilato (Historesin<sup>®</sup>, Leica) para as análises morfométricas e em Paraplast<sup>®</sup> (Sigma) para determinação da duração do CES. Para os fragmentos incluídos em resina foram realizadas secções semisseriadas de 3 µm de espessura, em micrótomo rotativo (Leica RM2255), respeitando-se um intervalo de 40 µm entre os cortes analisados. As preparações foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1 %.

Para análise da ultraestrutura, fragmentos testiculares foram fixados em solução de Karnovsky por 1 hora e depois transferidos para solução de glutaraldeído 2,5 % por 23 h. Após lavagem em tampão fosfato, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1 % no mesmo tampão por 2 h. A desidratação foi realizada em etanol e acetona, seguindo-se a inclusão em resina Epon 812. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 3 % e citrato de chumbo 3 % e observados em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

### 2.3. Estádios do ciclo do epitélio seminífero e suas frequências relativas

Os estádios do CES foram caracterizados de acordo com o método da morfologia tubular descrito por Berndtson (1977), sendo caracterizados 8 estádios baseando-se na forma e na localização do núcleo das espermatídes e espermatócitos e na ocorrência de figuras de divisão meiótica. As frequências relativas de cada um dos 8 estádios descritos foram obtidas a partir da contagem de 200 secções transversais de túbulos seminíferos por animal, fazendo-se uma varredura horizontal de todo o corte histológico.

### 2.4. Duração do ciclo do epitélio seminífero

Para cálculo da duração do CES foram realizadas injeções intra-testiculares de 0,1 mL de bromodeoxiuridina (BrdU, Invitrogen) em dois espécimes de *S. lilium*, sendo os animais eutanasiados com 1 hora e 1 dia após a aplicação de BrdU. Após fixação, os testículos foram desidratados em série etanólica crescente, diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast<sup>®</sup> (Sigma). Secções histológicas a 4 µm de espessura foram então submetidas à detecção de BrdU utilizando-se anticorpo monoclonal. As preparações foram desparafinizadas, hidratadas e lavadas em tampão fosfato 0,1 M (PBS), seguindo-se o bloqueio da atividade da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio + metanol por 10 min. Após nova lavagem em PBS, as secções foram incubadas com tripsina por 10 min em câmara úmida a 37 °C. Após lavagem em água destilada, procedeu-se a desnaturação em temperatura ambiente por 45 min. As secções foram lavadas novamente em PBS e incubadas com solução bloqueadora por 10 min, seguindo-se a incubação com anticorpo monoclonal biotinilado anti-BrdU de camundongo por 2 h, em temperatura ambiente. Seguiu-se a lavagem em PBS e incubação com streptavidina-peroxidase por 10 min. Foi feita a revelação com 3,3-diaminobenzidino tetracolorido (DAB) e peróxido de hidrogênio por 5 min, ao abrigo da luz. As secções foram contracoradas com hematoxilina, desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e montadas.

A estimativa da duração do CES foi calculada a partir da detecção do tipo celular mais avançado no epitélio seminífero a apresentar marcação positiva. Desta forma foi calculada a frequência total dos estádios percorridos, desde a incorporação da BrdU nas espermatídes e nos espermatócitos jovens, até a marcação da célula mais avançada no momento da coleta do material. A frequência dos estádios percorridos corresponde ao intervalo de tempo decorrido, sendo calculado o período relativo ao de um CES.

## 2.5. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva, e as médias obtidas quanto à frequência dos estádios entre as estações seca e chuvosa foram comparadas pelo teste t de Student para amostras independentes (STATISTICA). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão (DP), considerando-se um nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ).

## 3. Resultados

### 3.1. Estádios do ciclo do epitélio seminífero, frequências relativas e duração do CES

Diferentes gerações de células germinativas foram observadas nas secções transversais do epitélio seminífero, de maneira compartimentalizada. As espermatogônias foram observadas no ambiente basal, junto à túnica própria (Fig. 1b; d; f e Fig. 3a; b). A espermatogônia A esteve presente em todos os estádios. No estádio 6 estas células originam a espermatogônia intermediária e no estádio 7 é observada a espermatogônia B. À medida que estas células se dividem, originam os espermatócitos primários, que passam a ocupar o ambiente adluminal, apesar de ainda localizados próximo à túnica própria (Fig. 1 e Fig. 3b; c). Espermatócitos primários de gerações mais antigas ocuparam uma camada intermediária no epitélio seminífero (Fig. 1 e Fig. 3d) e as espermatídes estavam distribuídas na camada mais próxima ao lúmen do túbulo seminífero (Fig. 1). Os núcleos das células de Sertoli apresentaram formato arredondado a triangular, com cromatina frouxa e nucléolo bem desenvolvido (Fig. 1 e Fig. 3c). Em todos os estádios foram observados núcleos de células de Sertoli (Fig. 1).

Pelo método da morfologia tubular, o CES de *S. lilium* foi dividido em 8 estádios. A distribuição destes estádios é do tipo segmentar ao longo do comprimento do túbulo seminífero encontrando-se, portanto, apenas um estádio por secção transversal tubular.

*Estádio 1:* espermatócitos primários de três tipos foram observados neste estádio, estando na transição de pré-leptóteno para leptóteno ou já em zigóteno, próximos à túnica própria e em paquíteno, na região intermediária do epitélio. Espermatídes arredondadas foram observadas próximo ao lúmen tubular, constituindo de 3 a 4 camadas de células (Fig. 1a).

*Estádio 2:* foram observadas neste estágio espermatogônias do tipo A e espermatócitos primários em zigóteno próximos à lâmina basal do epitélio e espermatócitos primários em paquíteno na região intermediária. A característica mais marcante deste estágio é o início do alongamento nuclear das espermátides, orientados em direção aos núcleos das células de Sertoli (Fig. 1b).

*Estádio 3:* espermatócitos primários em zigóteno e na transição de paquíteno para diplóteno, cujos núcleos são caracteristicamente grandes, estavam presentes neste estágio. Os núcleos das espermátides continuavam a alongar-se formando feixes inseridos profundamente no epitélio seminífero, com suas cabeças orientadas em direção ao ambiente basal (Fig. 1c).

*Estádio 4:* caracteristicamente, neste estágio foram observadas figuras de metáfase meiótica, indicando a transição de espermatócitos primários em diplóteno para espermatócitos secundários, e destes para espermátides arredondadas. Assim como no estágio anterior, feixes de espermátides foram observados, estando estas células ainda mais alongadas (Fig. 1d).

*Estádio 5:* apenas uma geração de espermatócitos primários na transição de zigóteno para paquíteno estava presente neste estágio, uma vez que a geração mais tardia de espermatócitos deu origem a uma geração de espermátides. Assim, duas gerações de espermátides são observadas a partir deste estágio: espermátides arredondadas recém-formadas e espermátides alongadas localizadas em feixes mais compactos profundamente inseridos no epitélio seminífero (Fig. 1e).

*Estádio 6:* as espermatogônias do tipo A originaram espermatogônias intermediárias, as quais usualmente apresentaram núcleo mais escuro quando comparadas às espermatogônias A. Espermatócitos primários em paquíteno estavam presentes e os feixes de espermátides apresentaram-se mais próximos ao lúmen, comparado ao estágio anterior. Todas as gerações de células germinativas apresentaram-se muito semelhantes ao observado no estágio anterior (Fig. 1f).

*Estádio 7:* neste estágio foram encontradas na base do túbulo seminífero espermatogônias do tipo A e do tipo B, as quais se dividem e originam os espermatócitos primários do próximo estágio. Espermatócitos primários em paquíteno, espermátides arredondadas e espermátides alongadas também estavam presentes, sendo que seus feixes começaram a dissociar-se e se colocar mais próximos do lúmen tubular (Fig. 1g).

*Estádio 8:* foram observadas espermatogônias A e espermatócitos primários em pré-leptóteno, originados da espermatogônia B. Foram observados ainda espermatócitos

primários em paquíteno e espermátides arredondadas. O aspecto mais marcante deste estágio foi a localização das espermátides alongadas na porção mais apical do epitélio, prontas para serem liberadas no lúmen tubular, com suas caudas voltadas para o lúmen do túbulo, e grande quantidade de corpos residuais das espermátides na borda luminal (Fig. 1h).

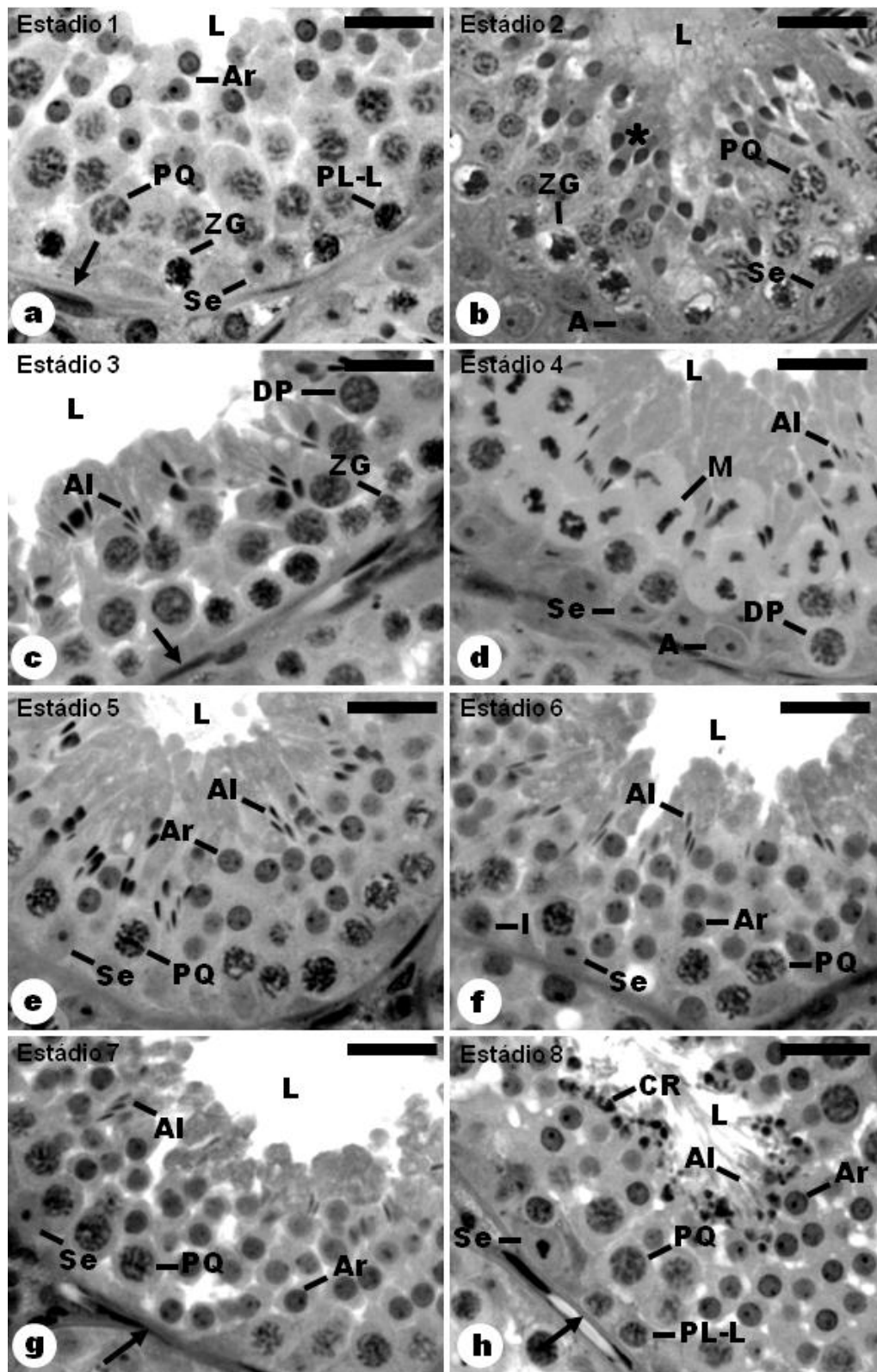


Figura 1. Fotomicrografias representativas dos 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero no morcego *Sturnira lilium*, sob microscopia de luz. **PL-L**: espermátocito primário na transição de pré-leptóteno para leptóteno; **ZG**: espermátocito primário em zigóteno; **PQ**: espermátocito primário em paquíteno; **DP**: espermátocito primário em diplóteno; **Ar**: espermátide arredondada; **\***: espermátides em fase de alongamento; **Al**: espermátide alongada; **A**: espermátogônia A; **I**: espermátogônia intermediária; **Se**: núcleo de célula de Sertoli; **M**: figura de divisão meiótica; **CR**: corpos residuais; **L**: lúmen do túbulo seminífero; **→**: túnica própria. Azul de toluidina+borato de sódio. Barras: 10 µm.

Não foram observadas diferenças na frequência relativa de cada um dos 8 estádios entre as estações climáticas anuais, sendo que o estágio 1 foi o mais frequente, com duração estimada em 3,3 dias, enquanto o estágio 7 foi o menos frequente, com duração estimada em 0,9 dias. As fases pré-meiótica, meiótica e pós-meiótica da espermatogênese de *S. lilium* representaram respectivamente 46,1, 7,3 e 46,6 % do ciclo (Fig. 2).

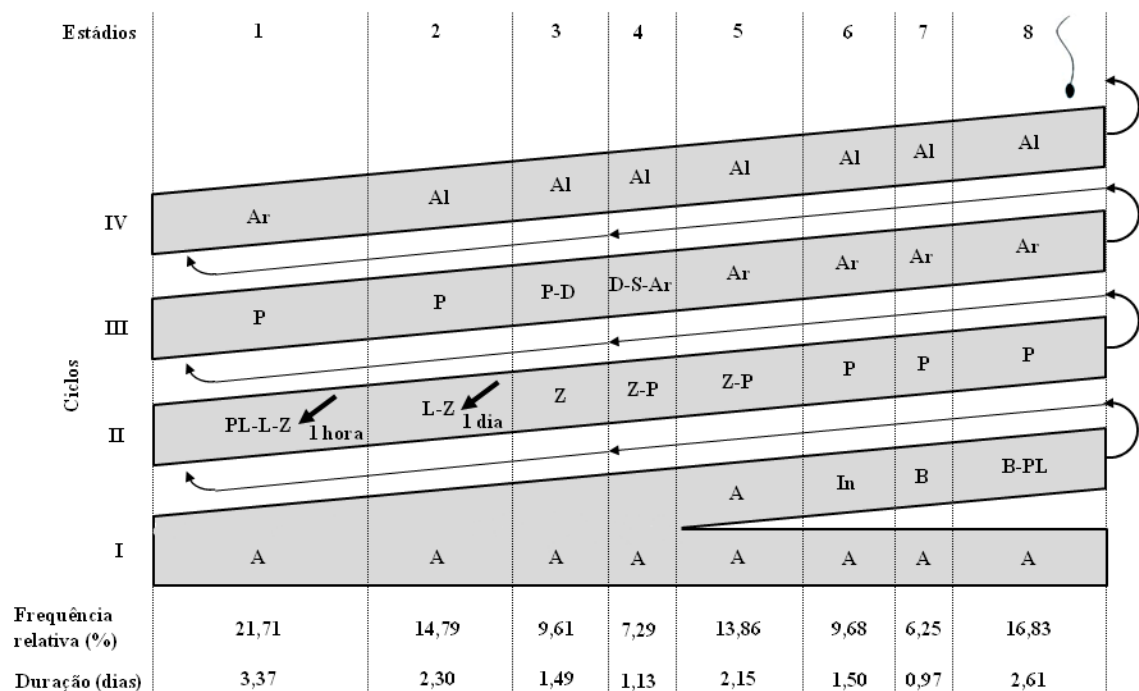


Figura 2. Diagrama do processo espermatogênico em *Sturnira lilium*, com a frequência média (%) e a duração em dias de cada um dos 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero. Cada linha corresponde a uma geração de células espermatogênicas e cada coluna corresponde a um estágio. O número de ciclos espermatogênicos é representado em algarismos romanos. A célula germinativa mais avançada 1 dia após aplicação de

bromodeoxiuridina foi o espermatócito primário na transição de leptóteno para zigóteno, no estágio 2 (→). **A:** espermatogônia A; **In:** espermatogônia intermediária; **B:** espermatogônia B; **PL:** espermatócito primário em pré-leptóteno; **L:** espermatócito primário em leptóteno; **Z:** espermatócito primário em zigóteno; **P:** espermatócito primário em paquíteno; **D:** espermatócito primário em diplóteno; **S:** espermatócito secundário; **Ar:** espermátide arredondada; **Al:** espermátide alongada.

A marcação mais evidente para a BrdU foi obtida após 1 dia de sua aplicação. As marcações das células germinativas mais avançadas no epitélio seminífero no momento da coleta ocorreram nos espermatócitos primários na transição de leptóteno para zigóteno, no estágio 2 (Fig. 3a), sendo que ao início do estágio 3 estas células não mais apresentaram marcação (Fig. 3b). As espermatogônias, por estarem presentes em todos os estádios do CES e devido à sua atividade mitótica constante, puderam ser observadas com marcação BrdU-positivas em todos os estádios do ciclo.

Em 1 dia, houve uma progressão de aproximadamente 29 % do CES (frequência média do estágio 1 até metade do estágio 2), levando assim a um ciclo com duração média de 3,45 dias. Considerando-se que cerca de 4,5 ciclos são necessários para se completar o processo espermatogênico, a duração total da espermatogênese de *S. lilium* foi estimada em 15,52 dias.

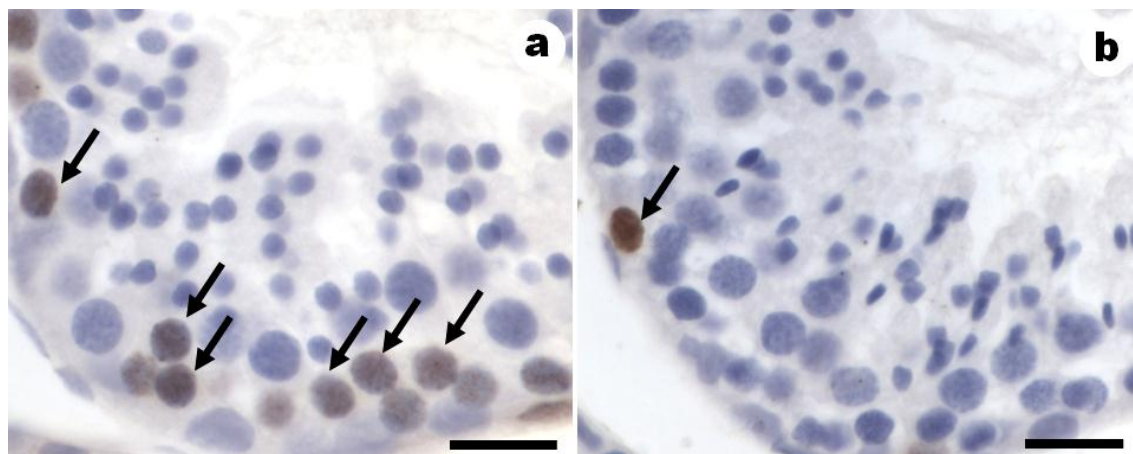


Figura 3. Marcação das células germinativas após 1 dia de injeção de bromodeoxiuridina (BrdU) nos testículos de *Sturnira lilium* (setas). **a)** Espermatócitos primários na transição de leptóteno para zigóteno no estágio 2 do ciclo do epitélio seminífero com marcação positiva para a BrdU. **b)** Marcação para BrdU apenas na espermatogônia A no estágio 3. Barras: 20 µm.

### 3.2. Ultraestrutura das espermátides

Na Figura 4 são observados núcleos de diferentes tipos de espermátides, desde sua inicial arredondada (Fig. 4a), com estágio inicial (Fig. 4b-d) e intermediário (Fig. 4e-g) de formação do acrossoma, até espermátide alongada, onde o capuz acrossômico cobre grande parte da superfície nuclear (Fig. 4h-i). Observam-se ainda a manchete de microtúbulos e o início da formação do flagelo (Fig. 4e; h). Esta fase espermiogênica corresponde à segunda metade do 3º ciclo espermatogênico, onde surge a espermátide arredondada, até o final do 4º ciclo, onde surge a espermátide alongada, culminando com a liberação do espermatozoide (Fig. 2).

Uma única geração de espermátides arredondadas está presente no estágio 1 do CES. Nesta fase, pôde-se perceber a existência do capuz acrossômico cobrindo parte da superfície nuclear (Fig. 4d). A partir do estágio 2, esta geração de espermátides começa a se alongar, e gradativamente o capuz acrossômico se estende sobre a superfície nuclear (Fig. 4e-h). A partir do estágio 3 (Fig. 4h), esta mesma geração de espermátides alongadas atinge gradativamente seu grau máximo de alongamento e condensação nuclear, como será observado no estágio 8 (Fig. 4i). A segunda divisão da meiose, que ocorre no estágio 4 origina, a partir do estágio 5, duas gerações bem definidas de espermátides, sendo as espermátides arredondadas iniciais, que ainda não apresentam o acrossoma (Fig. 4a), até a espermátide completamente alongada (Fig. 4i). Estas duas gerações de espermátides estarão presentes até o estágio 8, onde ocorre a espermição.

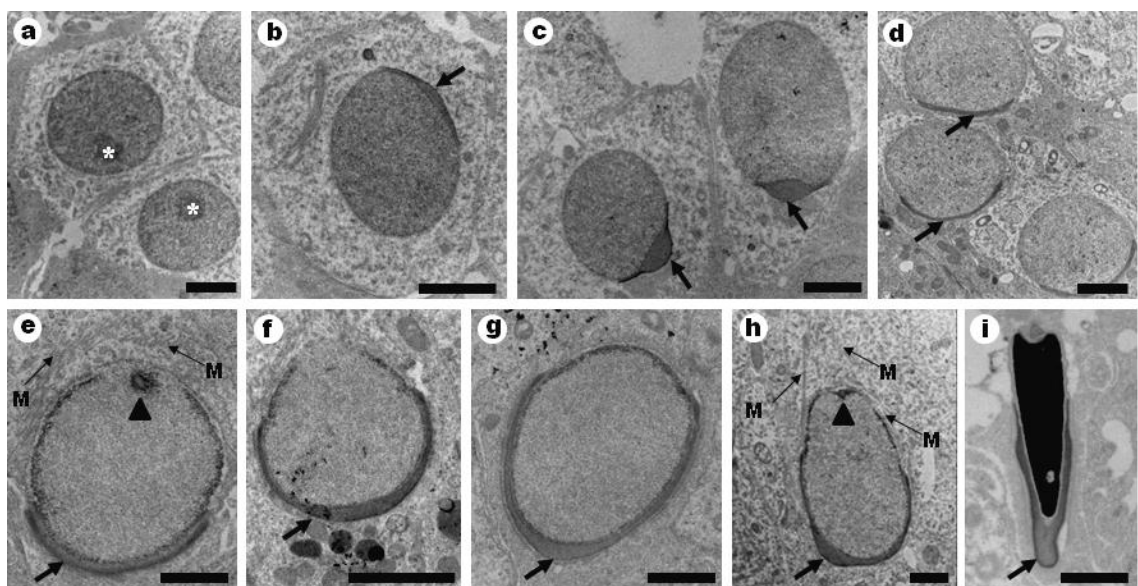


Figura 4. Ultraestrutura nuclear das espermatídes arredondadas e alongadas e formação do acrossoma em *Sturnira lilium*. **a)** Espermatíde arredondada, sem acrossoma; \*: nucléolo. **b-d)** Espermatídes arredondadas em diferentes graus de ocupação da superfície nuclear pelo acrossoma; →: capuz acrossômico. **e-h)** Espermatídes em fase de alongamento com diferentes graus de ocupação da superfície nuclear pelo acrossoma; →: capuz acrossômico; **i)** Espermatíde alongada com formação completa do acrossoma. Barras: **a-d)** 2 µm; **e)** 1 µm; **f)** 2 µm; **g-i)** 1 µm.

#### 4. Discussão

Os resultados obtidos à partir deste estudo são de grande importância, pois permitem, pela primeira vez, conhecer a duração do ciclo do epitélio seminífero de uma espécie de morcego.

##### 4.1. Estádios do ciclo do epitélio seminífero, frequências relativas e duração do ciclo

Morfologicamente, o epitélio seminífero de *S. lilium* segue o padrão observado nos demais mamíferos, apresentando distintos arranjos entre as diferentes gerações de células germinativas. Os 8 estádios do CES, designados em *S. lilium* segundo o método da morfologia tubular, seguiram o padrão encontrado em outros mamíferos não primatas (França e Russell, 1998; Paula et al., 1999; Guião-Leite et al., 2006; Bittencourt et al., 2007; Beguelini et al., 2009; Costa et al., 2011).

Sabe-se que a frequência média de cada um dos estádios do CES apresenta diferenças entre espécies, sendo, porém um parâmetro relativamente constante entre indivíduos de uma mesma espécie (Amann, 1962; Courot et al., 1970; Clermont, 1972; Ortavant, 1977). Seguindo estes achados, confirmou-se neste estudo a inexistência de variação na frequência média de cada um dos estádios entre as diferentes estações do ano. A maior frequência observada para o estágio 1 (21 %) e a menor frequência observada para o estágio 7 (6 %) foram semelhantes ao observado na paca (Costa et al., 2010a). Comumente, o estágio 1 tem sido reportado como um dos mais frequentes, enquanto o estágio 7 tem sido reportado como um dos menos frequentes (Bittencourt et al. 2007; Costa et al., 2010a; Balarini et al., 2011; Costa et al., 2011).

A maior frequência apresentada por um determinado estágio indica que este apresenta maior duração dentro do CES. Em *S. lilium*, a maior frequência do estágio 1 permitiu o aparecimento de espermatócitos primários em zigóteno ainda neste estágio,

enquanto na maioria das espécies já estudadas este tipo celular surge à partir do estágio 2 (França e Russell, 1998; Paula et al., 1999; Bittencourt et al., 2004; Beguelini et al., 2009; Costa et al., 2010a; Balarini et al., 2011).

Devido às grandes variações encontradas para a frequência dos estádios entre diferentes espécies, para que possam ser feitas análises comparativas, Courot e colaboradores (1970) sugerem o agrupamento das frequências em fases pré-meiótica (estádios 1 ao 3), meiótica (estádio 4) e pós meiótica (estádios 5 ao 8). Enquanto em muitos mamíferos as fases pré ou pós-meiótica apresentam duração maior ou menor quando comparadas entre si (Nakai et al., 2004; Guião-Leite et al., 2006; Costa et al., 2008; Costa et al., 2010a; Costa et al., 2010b; Costa et al., 2011), em *S. liliium* tais fases apresentaram frequências semelhantes dentro do CES, assim como observado no gato do mato (Balarini et al., 2011).

Assim como a frequência relativa de cada estágio, a duração do ciclo espermatogênico é uma constante espécie específica, uma vez que ambas são controladas pelo genótipo das células germinativas (França et al., 1998). A existência de um ciclo espermatogênico com duração de 3,45 dias em *S. liliium* representa a menor das durações já registradas para mamíferos. A menor duração previamente registrada foi para o roedor *Cletheriomys glareolus*, com 6,7 dias, e a maior foi no gambá *Didelphis albiventris*, com 17,3 dias (Grocock e Clark, 1976; Queiroz e Nogueira, 1992). A média geral registrada para mamíferos é de 7 a 14 dias (França e Russell, 1998). Do mesmo modo, a duração total da espermatogênese de *S. liliium* esteve bem abaixo da média previamente registrada para mamíferos, que varia de 30 a 75 dias (França e Russell, 1998; Leal e França, 2006; Hess e França, 2007).

#### 4.2. Ultraestrutura das espermátides

A ultraestrutura das espermátides permitiu acompanhar a formação do capuz acrossômico. O acrossoma é formado a partir de vesículas pró-acrossômicas do complexo de Golgi que coalescem, recobrando à superfície nuclear e ocupando cerca de 2/3 da porção anterior do núcleo no espermatozoide maduro nos mamíferos em geral (Bishop e Smiles, 1963; Christensen e Fawcett, 1966). Suas enzimas são responsáveis por abrir espaço através dos revestimentos do ovócito durante o processo de fertilização (Primakoff e Myles, 2002). No citoplasma das espermátides alongadas observou-se a presença de manchetes, as quais são estruturas formadas por microtúbulos e filamentos de actina. Estas constituem vias de transporte intracelular, onde se inclui o transporte

das vesículas pró-acrossomais, além de serem responsáveis pela determinação da polaridade das espermátides, participando ainda no alongamento e determinação da forma do núcleo das espermátides durante a espermiogênese (Kierszenbaum et al., 2004; Kierszenbaum et al., 2011). Observou-se ainda o início de formação do flagelo, na região que irá originar a cauda do espermatozoide. Esta organização observada para o citoesqueleto em *S. liliun* é típica do citoplasma das espermátides alongadas, e as características observadas quanto à espermição foram semelhantes ao descrito em outras espécies de morcegos (Beguelini et al., 2011; Beguelini et al., 2012).

## **5. Conclusões**

Pode-se concluir que a organização dos estádios que compõem o CES em *S. liliun*, bem como as características do epitélio seminífero, apresentou-se, de um modo geral, semelhante ao descrito para outros mamíferos. No entanto, espermátócitos primários em zigóteno foram observados já no estágio 1 do ciclo, o que acreditamos estar relacionado à maior duração deste estágio. A frequência média de cada um dos 8 estádios não apresentou variações significativas entre as estações do ano. A duração de cada ciclo espermatogênico, bem como a duração total da espermatogênese de *S. liliun*, foram as menores já registradas para mamíferos.

## **Agradecimentos**

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida.

## **Referências Bibliográficas**

- Altringham, J.D. 1998. Bats: Biology and Behavior. Oxford: University Press, 262 p.
- Amann, R. 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. Am J Anat. 110:69-78.
- Balarini, M.K.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Peixoto, J.V.; Guião-Leite, F.L.; Rossi Júnior, J.L.; Czermak Júnior, A.C.; Walker, N.J. 2011. Stages and duration of the cycle of the seminiferous epithelium in oncilla (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775). Theriogenology. 77(5):873-880.

- Beguelini, M.R.; Moreira, P.R.L.; Faria, K.C.; Marchesin, S.R.C.; Morielle-Versute, E. 2009. Morphological characterization of the testicular cells and seminiferous epithelium cycle in six species of neotropical bats. *J Morphol.* 270(8):943-953.
- Beguelini, M.R.; Puga, C.C.I.; Taboga, S.R.; Morielle-Versute, E. 2011. Ultrastructure of spermatogenesis in the white-lined broad-nosed bat, *Platyrrhinus lineatus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Micron.* 42(6):586-599.
- Beguelini, M.R.; Taboga, S.R.; Morielle-Versute, E. 2012. Ultrastructural Characteristics of Spermatogenesis in Pallas's Mastiff Bat, *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Micros Res Tech.* 00:000-000.
- Berndtson, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J Anim Sci.* 44(5):818-883.
- Bishop, M.W.; Smiles, J. 1963. Differentiation of the acrosome in living mammalian spermatozoa and spermatids by fluorescence microscopy. *J Reprod Fertil.* 6:297-303.
- 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. 2004. 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.* 28(2):108-113.
- Bittencourt, V.L.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Fonseca, C.C.; Benjamin, L.A.; Costa, D.S. 2007. The seminiferous epithelium cycle and daily spermatid production in the adult maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811). *Micron.* 38(6):584-589.
- Bronson, F.H. 1985. Mammalian reproduction: an ecological perspective. *Biol Reprod.* 32(1):1-26.
- Christensen, A.K.; Fawcett, D.W. 1966. The fine structure of testicular interstitial cells in mice. *Am J Anat* 118(2):551-571.
- Clermont, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 52(1):198-236.
- Cole, F.R.; Wilson, D.E. 1996. Mammalian diversity and natural history. In: Wilson, D.E.; Cole, F.R.; Nichols, J.D.; Rudran, R.; Foster, M.S. (Eds.), *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard methods for mammals.* Washington: Smithsonian Institution Press, pp. 9-39.

- Costa, G.M.J.; Chiarini-Garcia, H.; Morato, R.G.; Alvarenga, R.L.L.S.; França, L.R. 2008. Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar (*Panthera onca*). *Theriogenology*. 70(7):136-1146.
- Costa, G.M.; Leal, M.C.; Ferreira, A.C.; Guimarães, D.A.; França, L.R. 2010a. Duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in two large neotropical rodent species: the agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*). *J Androl*. 31(5):489-499.
- Costa, G.M.J.; Leal, M.C.; Silva, J.V.; Ferreira, A.C.S.F; Guimarães, D.A.; França, L.R. 2010b. Spermatogenic cycle length and sperm production in a feral pig species (Collared Peccary, *Tayassu tajacu*). *J Androl*. 31(2):221-230.
- 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.L.M.C. 2011. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Anim Reprod Sci*. 127(3-4):202-212.
- Courot, M.; Hochereau-De-Reviere, M.T.; Ortavant, R. 1970. Spermatogenesis. In: Johnson, A.D.; Gomer, W.R.; Vandemark, N.L. (Eds.), *The Testis*. New York: Academic Press, pp. 399-432.
- França, L.R.; Ogawa, T.; Avarbock, M.R.; Brinster, R.L.; Russell, L.D. 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod*. 59(6):1371-1377.
- França, L.R.; Russell, L.D. 1998. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia, F., Regadera, J. (Eds.), *Male reproduction: A Multidisciplinary Overview*. Madrid: Churchill Livingstone, pp.197-219.
- Golfari, L. 1975. Zoneamento ecológico do Estado de Minas Gerais para reflorestamento. Belo Horizonte: PRODEPEF/PNUD/FAO/IBDF/Bra-45. Série técnica 3. 65 p.
- Grocock, C.A.; Clark, J.R. 1976. Duration of spermatogenesis in the vole (*Microtus agrestis*) and the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *J Reprod Fertil* 47(1):133-135.
- Guião-Leite, F.L.; Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Neves, M.T.D., Barros, J.B.G. 2006. Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). *Anim Reprod Sci*. 91(3-4):307-316.

- Heideman P.D.; Deoraj, P.; Bronson, F.H. 1992. Seasonal reproduction of a tropical bat, *Anoura geoffroyi*, in relation to photoperiod. *J Reprod Fertil.* 96(2):765-773.
- Hess, R.A.; França, L.R. 2007. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Cheng, C.Y. (Ed.), *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. New York: Landes Bioscience, pp. 1-15.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol.* 27:137.
- Kierszenbaum, A.L.; Tres, L.L. 2004. The acrosome–acroplaxome–manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol.* 67(4):271-284.
- Kierszenbaum, A.L.; Rivkin, E.; Tres, L.L. 2011. Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility. *Spermatogenesis.* 1(3):221-230.
- Kunz, T.H.; Anthony, E.L.P. 1982. Age estimation and post-natal growth in the bat *Myotis lucifugus*. *J Mammal.* 63:23-32.
- Leal, M.C.; França, L.R. 2006. The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biol Reprod.* 74:616-624.
- Leblond, C.P.; Clermont, Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann NY Acad Sci.* 55(4):548-584.
- Marinho-Filho, J.; Vasconcellos-Neto, J. 1994. Dispersão de sementes de *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers. (Guttiferae) por morcegos na região de Manaus, Amazonas. *Acta Bot Bras.* 8(1):87-96.
- Mello, M.A.R.; Kalko, E.K.V.; Silva, W.R. 2008. Diet and abundance of the bat *Sturnira lilium* (Chiroptera) in a Brazilian montane Atlantic Forest. *J Mammal.* 89(2):485-492.
- Mello, M.A.R.; Kalko, E.K.V.; Silva, W.R. 2009. Ambient temperature is more important than food availability in explaining reproductive timing of the bat *Sturnira lilium* (Mammalia: Chiroptera) in a montane atlantic forest. *Can J Zool.* 87:239-245.
- Mikich, S. B. 2002. A dieta dos morcegos frugívoros (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae) de um pequeno remanescente de Floresta Estacional Semidecidual do Sul do Brasil. *Rev Bras Zool.* 19(1):239-249.

- Mikich, S.B.; Bianconi, G.V. 2005. Potencializando o papel dos morcegos frugívoros na recuperação de áreas degradadas. *Bol Pesq Fl., Colombo.* 51:155-164.
- Nakai, M.; Van Cleeff, J.K.; Bahr, J.M. 2004. Stages and duration of spermatogenesis in the domestic ferret (*Mustela putorius furo*). *Tissue Cell.* 36(6):439-446.
- Neuweiler, G. 2000. *The Biology of Bats.* New York: Oxford University Press, 310 p.
- Ortavant, R.; Courot, M.; Hochereau-De-Reviers, M.T. 1977. Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole, H.H.; Cupps, P.T. (Eds.), *Reproduction in Domestic Animals.* New York: Academic Press, pp. 203-227.
- Paula, T.A.; Chiarini-Garcia, H.; França, L.R. 1999. Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Tissue Cell.* 31(3):327-334.
- Primakoff, P.; Myles, D.G. 2002 Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science.* 296:2183-2185.
- Queiroz, G.F.; Nogueira, J.C. 1992. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and quantitative histology of the testis of the South American white-belly opossum (*Didelphis albiventris*), Marsupialia. *Reprod Fertil Dev.* 4(2):213-222.
- Reis, N.R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A.; Lima, I.P. 2007. Subfamília Sternodermatinae. In: Zortéa, M. (Ed.), *Morcegos do Brasil.* Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina, pp. 121-122.
- Roosen-Runge, E.C.; Giesel Jr., L.O. 1950. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *Am J Anat.* 87(1):1-30.
- Russell, L.D.; Ettlin, R.A.; Sinha Hikim, A.P.; Clegg, E.D. 1990. Mammalian spermatogenesis. In: Russell, L.D.; Ettlin, R. A.; Sinha Hikim, A. P.; Clegg, E. D. (Eds), *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis.* Clearwater: Cache River Press, pp. 1-40.
- Sazima, M.; Buzato, S.; Sazima, I. 2003. *Dyssochroma viridiflorum* (Solanaceae): a reproductively bat-dependent epiphyte from the Atlantic rainforest in Brazil. *Ann Bot.* 92(5):725-730.
- Vieira, M.F.; Carvalho-Okano, R.M. 1996. Pollination biology of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) in Southeastern Brazil. *Biotropica.* 28(1):61-68.

## Artigo 2

### **Avaliação da população celular do epitélio seminífero e índices indicativos de produção espermática no morcego *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae)**

#### **Resumo**

Diante da escassez de informações acerca dos padrões de espermatogênese em morcegos, objetivamos neste estudo fornecer informações sobre a atividade testicular do morcego *Sturnira lilium* ao longo das estações climáticas anuais. Para tal foi feita a caracterização morfológica, morfométrica e cálculo dos índices indicativos de produção espermática nos testículos de indivíduos adultos. Fragmentos testiculares de animais capturados nas estações seca (n=7) e chuvosa (n=7) foram processados histologicamente para avaliação morfológica e morfométrica sob microscopia de luz e para análise ultraestrutural, em microscópio eletrônico de transmissão. Os animais apresentaram IGS médio de 0,27 %. Seus testículos seguiram o padrão de organização descrito para outros mamíferos, e não foram observadas diferenças significativas quanto à morfometria testicular entre as estações seca e chuvosa. Não houve diferença no número de células apoptóticas entre as estações. A ultraestrutura das células de Sertoli e espermatogênicas foi caracterizada. Cada secção transversal tubular no estágio 1 foi composta em média por 0,5 espermatogônias do tipo A, 4,4 espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno e 3,7 em zigóteno, 11,9 em paquíteno, 35,6 espermátides arredondadas e 8,5 células de Sertoli. O índice mitótico foi de 15,4 células, o índice meiótico de 2,9 células e o rendimento geral da espermatogênese foi de 68,7 células. O índice de células de Sertoli foi de 7,0 células, a reserva espermática testicular foi de  $37,61 \times 10^6$  células, com maior média na estação chuvosa e a produção espermática diária por grama de testículo teve média de  $209,68 \times 10^6$  células, também com maior média na estação chuvosa. Conclui-se que morcegos *S. lilium* machos apresentam padrão reprodutivo anual contínuo, elevado rendimento da espermatogênese e baixa capacidade suporte pelas células de Sertoli.

**Palavras-chave:** Célula de Sertoli, Espermatogônia, Espermatócito primário, Espermátide.

## 1. Introdução

A evolução da ordem Chiroptera mostra um diversificado conjunto de estratégias reprodutivas, sendo sua reprodução mais variada do que na maioria das outras ordens de mamíferos (Crichton e Krutzsch, 2000). Os morcegos têm uma reprodução diretamente relacionada à condição corporal individual, o que faz da disponibilidade de alimento um fator determinante para o início do ciclo reprodutivo nestes animais (Baker, 1938; Bronson, 1985). De modo geral, tanto morcegos de regiões temperadas como de regiões tropicais apresentam padrão reprodutivo sazonal (Fleming et al., 1972; Wilson, 1979; Racey, 1982; Heideman e Utzurrum, 2003), embora algumas espécies possam não estar restritas a esta sazonalidade (Crichton e Krutzsch, 2000). Como fatores ambientais interferem diretamente no ciclo reprodutivo dos quirópteros, uma mesma espécie pode comportar-se de diferentes maneiras, dependendo da área de sua ocorrência e das condições climáticas que lá predominam (Altringham, 1998; Neuweiler, 2000).

O morcego *Sturnira lilium* apresenta hábito alimentar essencialmente frugívoro e possui grande importância ecológica por sua atuação na dispersão de sementes. A frugivoria é altamente benéfica para diversas plantas, principalmente as Solanáceas, família de grande valor ecológico e econômico, sendo que algumas espécies vegetais dependem primordialmente dos morcegos para sua progressão (Sazima et al., 2003, Mello et al., 2008).

Foi descrito para *S. lilium*, no território brasileiro, um padrão reprodutivo com poliestria bimodal com duas estações reprodutivas ao ano (Wilson, 1979; Mello et al., 2009), nos meses de março e outubro (Pacheco, 2001; Kaku-Oliveira et al., 2010), embora variações regionais possam ocorrer (Zortéa, 2002; Bernardi, 2011). Segundo Kaku-Oliveira e colaboradores (2010), bem como Bernardi (2011), a atividade reprodutiva das fêmeas, incluindo gestação e lactação, se concentra no período chuvoso. Variações regionais também foram observadas para o morcego insetívoro *Molossus molossus*, que foi definido como poliestral sazonal ou monoestral sazonal, dependendo de sua área de ocorrência (Fabián e Marques, 1989; Pacheco, 2001). Adicionalmente foram observadas variações na morfometria gonadal desta espécie nas diferentes estações do ano (Morais, 2008). Diante destas variações, a avaliação da atividade gonadal constitui uma importante ferramenta, permitindo inferir de modo mais preciso sobre a atividade reprodutiva de uma espécie.

O peso testicular tem uma relação direta com a produção espermática (Amann, 1970; França e Russell, 1998), de modo que quanto maior o investimento em gônadas,

maior a produção de espermatozóides. Segundo Kenagy e Trombulak (1986), o tamanho testicular está intimamente relacionado ao comportamento reprodutivo, sendo que espécies com comportamento monogâmico ou poligínico, como é o caso da maioria dos morcegos (Nowak, 1994; Altringham, 1998), possuem testículos menores se comparados a espécies com comportamento reprodutivo promíscuo ou poliândrico. Além disto, podem-se obter dados quantitativos de produção espermática a partir da avaliação da atividade das células que compõem o epitélio seminífero (Paula et al., 2002). Deste modo, a realização da biometria e morfometria testiculares, aliadas à estimativa das taxas de produção espermática podem fornecer importantes informações sobre o desempenho reprodutivo de uma espécie.

Apesar de *S. lilium* ser amplamente distribuído no Brasil, pouco se sabe sobre sua biologia reprodutiva e padrões de espermatogênese. Assim, o objetivo deste estudo foi obter informações sobre sua atividade testicular ao longo das estações climáticas anuais, a partir da caracterização morfológica, morfométrica e de índices quantitativos de produção espermática nos testículos de indivíduos adultos, a fim de determinar seu padrão reprodutivo, além da estimativa das células em apoptose no interior dos túbulos seminíferos.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Área de estudo*

As capturas foram realizadas no município de Viçosa, região da Zona da Mata do estado de Minas Gerais, nos anos de 2009 e 2010 (licença nº 214887-1/SISBIO/IBAMA). Viçosa está localizada a 20°45'S e 42°07'W, a uma altitude média de 650 m, no sudeste de Minas Gerais. Esta região é caracteristicamente montanhosa, inserida no bioma da Mata Atlântica cujo clima é do tipo Cwa (mesotérmico, úmido com verões chuvosos e invernos secos), segundo a classificação de Köppen. Apresenta déficit hídrico no período de maio a setembro e excedente de precipitação entre dezembro e março (Golfari, 1975). As médias anuais registradas no período de coletas para precipitação pluviométrica, temperatura e umidade relativa do ar foram, respectivamente, 0,91 mm, 18 °C e 78 % na estação seca (abril a setembro) e 7,20 mm, 23 °C e 79 % na estação chuvosa (outubro a março) (Fonte: Estação Meteorológica do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa).

## 2.2. Coleta dos animais, biometria e processamento histológico

Foram capturados 14 espécimes de *Sturnira lilium*, machos e adultos, ao longo das diferentes estações climáticas dos anos de 2009 e 2010, sendo os animais agrupados nas estações seca (n=7) e chuvosa (n=7). A identificação dos animais adultos foi feita baseando-se na observação da fusão da cartilagem epifisária do quarto dedo, na junção metacarpo-falangeal, segundo Kunz e Anthony (1982).

Os animais foram abrigados em gaiolas e receberam frutas (mamão ou banana) e água *ad libitum*, desde a captura até a eutanásia, que foi realizada na manhã seguinte à noite da captura. A eutanásia foi feita por injeção de pentobarbital sódico (Nembutal), na concentração de 40 mg/Kg via intraperitoneal, seguido por injeção de solução saturada de cloreto de potássio. Após a eutanásia os animais foram pesados e seus testículos removidos. Todo procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFV – nº 93/011).

Os testículos foram fixados por imersão em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 h e transferidos para etanol 70 %. Os testículos foram pesados e a albugínea de um deles foi removida e pesada, sendo seu peso descontado do peso gonadal para cálculo do volume do parênquima testicular.

Fragmentos testiculares foram desidratados em série etanólica crescente, procedendo-se a inclusão em glicol-metacrilato (Historesin<sup>®</sup>, Leica) para as análises morfológicas e morfométricas sob microscopia de luz, ou em Paraplast<sup>®</sup> (Sigma) para detecção de células em apoptose. Secções semisseriadas de 3 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Leica RM2255), respeitando-se um intervalo de 40 µm entre os cortes analisados. As preparações foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1 % e as análises morfométricas foram feitas a partir de imagens capturadas em diferentes aumentos, utilizando-se foto-microscópio Olympus BX-40, através do *software* Image-Pro Plus<sup>®</sup>.

Foi calculado o índice gonadossomático (IGS) a partir do peso corporal e do peso de ambos os testículos utilizando-se a fórmula: (peso gonadal/peso corporal) x 100.

Para análise da ultraestrutura, fragmentos testiculares foram fixados em solução de Karnovsky por 1 hora e depois transferidos para solução de glutaraldeído 2,5 % por 23 h. Após lavagem em tampão fosfato, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1 % no mesmo tampão por 2 h. A desidratação foi realizada em etanol e acetona, seguindo-se a inclusão em resina Epon 812. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 3 % e citrato de chumbo 3 % e observados em microscópio eletrônico

de transmissão (Jeol 1011), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

### *2.3. Ensaio de TUNEL e contagem de células apoptóticas*

A fim de se detectar células em apoptose no epitélio seminífero, foi aplicado o método de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) em secções histológicas testiculares a 4 µm de espessura, incluídas em Paraplast®. O ensaio de TUNEL foi feito de acordo com o protocolo do kit de detecção Calbiochem.

As secções histológicas foram desparafinizadas e hidratadas em etanol. A seguir foram incubadas com Proteinase K por 20 min em temperatura ambiente, lavadas em água destilada e incubadas com peróxido de hidrogênio + metanol por 5 min, a fim de se interromper a atividade da peroxidase endógena. As preparações foram então incubadas com Tdt Equilibrium Buffer em água destilada, em câmara úmida e temperatura ambiente por 20 min. Procedeu-se a incubação com Tdt enzima e Tdt mix por 60 min, a 37 °C. As células imunorreativas foram detectadas através da incubação das lâminas com uma mistura de 3,3-diaminobenzidino tetraclorido (DAB) e peróxido de hidrogênio por 13 min, em câmara úmida e ao abrigo da luz. As secções foram contracoradas com hematoxilina, desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e montadas.

Preparações do mesmo material foram utilizadas como controle negativo e positivo. Para o controle negativo omitiu-se do processamento a Tdt enzima, de modo que não se observou qualquer marcação apoptótica e os núcleos apresentaram-se corados apenas pela hematoxilina. As preparações destinadas ao controle positivo foram incubadas com 1,00 U/µl de DNase I (Invitrogen) em tampão DNase por 10 min, antes do bloqueio da peroxidase endógena. Ademais, foram seguidos os mesmos passos da técnica de TUNEL descritos acima. Preparações dos diferentes grupos foram coradas ao mesmo tempo, a fim de se evitar discrepâncias na comparação dos resultados.

O número médio de células apoptóticas por secção transversal tubular foi quantificado considerando-se a contagem das células por área observada (µm<sup>2</sup>), em ocular de 10 x combinada com objetiva de 20x. A identificação das células apoptóticas foi feita baseando-se em suas características nucleares, bem como na observação das células vizinhas e no estágio do ciclo do epitélio seminífero em que se encontravam.

#### 2.4. Morfometria testicular

Uma vez que o testículo pode ser dividido nos compartimentos tubular e intertubular, as proporções volumétricas entre estes elementos foram estimadas pela contagem de 3.520 pontos projetados sobre 10 imagens obtidas de preparações histológicas por animal, em aumento de 100x, sendo quantificados túbulos seminíferos, intertúbulo, túnica própria, epitélio seminífero e lúmen. O volume dos túbulos seminíferos foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume do parênquima testicular. O volume do epitélio seminífero foi obtido multiplicando-se o percentual de epitélio seminífero pelo volume tubular, sendo este valor dividido por 100.

A fim de se quantificar o investimento em túbulos seminíferos em relação à massa corporal, foi calculado o índice tubulossomático (ITS), dividindo-se o volume tubular pelo peso corporal e multiplicando-se este valor por 100. O diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero foram obtidos a partir da mensuração de 20 secções transversais de túbulos por animal, que apresentavam contorno o mais circular possível, sem levar em consideração o estágio do ciclo. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular mensurou-se a altura do epitélio seminífero, medida da túnica própria até o lúmen tubular.

Estimou-se o comprimento dos túbulos seminíferos (CT), expresso em metros, por testículo e por grama de testículo. O CT por testículo foi calculado a partir da fórmula  $CT = VTS / \pi R^2$ , onde VTS=volume dos túbulos seminíferos,  $\pi R^2$ =área da secção transversal dos túbulos seminíferos e  $R$ =diâmetro tubular/2. Para cálculo do comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo dividiu-se o valor anterior pelo peso testicular total.

A frequência relativa dos estádios do CES foi calculada baseando-se na identificação e ocorrência de cada estágio em 200 secções transversais de túbulo seminífero por animal.

#### 2.5. Duração do ciclo do epitélio seminífero (CES)

Para cálculo da duração do CES foram realizadas injeções intra-testiculares de 0,1 mL de bromodeoxiuridina (BrdU, Invitrogen) em dois espécimes de *S. liliam*, sendo os animais eutanasiados com 1 hora e 1 dia após a aplicação de BrdU. Após fixação, os testículos foram desidratados em série etanólica crescente, diafanizados em xilol e

incluídos em Paraplast<sup>®</sup> (Sigma). Secções histológicas a 4 µm de espessura foram então submetidas à detecção de BrdU utilizando-se anticorpo monoclonal. As preparações foram desparafinizadas, re-hidratadas e lavadas em tampão fosfato 0,1 M (PBS), seguindo-se o bloqueio da atividade da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio + metanol por 10 min. Após nova lavagem em PBS, as secções foram incubadas com tripsina por 10 min em câmara úmida a 37 °C. Após lavagem em água destilada, procedeu-se a desnaturação em temperatura ambiente por 45 min. As secções foram lavadas novamente em PBS e incubadas com solução bloqueadora por 10 min, seguindo-se a incubação com anticorpo monoclonal biotinilado anti-BrdU de camundongo por 2 h, em temperatura ambiente. Seguiu-se a lavagem em PBS e incubação com streptavidina-peroxidase por 10 min. Foi feita a revelação com 3,3-diaminobenzidino tetraclorido (DAB) e peróxido de hidrogênio por 5 min, ao abrigo da luz. As secções foram contracoradas com hematoxilina, desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e montadas.

A estimativa da duração do CES foi calculada a partir da detecção do tipo celular mais avançado no epitélio seminífero a apresentar marcação positiva. Desta forma foi calculada a frequência total dos estádios percorridos, desde a incorporação da BrdU nas espermatogônias e nos espermátócitos jovens, até a marcação da célula mais avançada no momento da coleta do material. A frequência dos estádios percorridos corresponde ao intervalo de tempo decorrido, sendo calculado o período relativo ao de um CES.

## 2.6. *Contagens celulares*

A partir da contagem dos núcleos das células germinativas e nucléolos de células de Sertoli presentes no estágio 1 do CES, foi estimada a população de cada tipo celular, utilizando-se 10 secções transversais circulares de túbulos seminíferos por animal. Foram mensurados também os diâmetros nucleares de espermatogônias do tipo A (A), de espermátócitos primários na transição pré-leptótenos/leptóteno (PL-L), espermátócitos primários em zigóteno (ZG), espermátócitos primários em paquíteno (PQ), espermátides arredondadas (Ar) e nucléolos de células de Sertoli (Se).

A população celular do estágio 1 foi quantificada tendo como base o método da morfologia tubular (Berndtson, 1977). As contagens foram corrigidas considerando-se a espessura do corte histológico e o diâmetro nuclear ou nucleolar das células contadas, de acordo com a metodologia proposta por Abercrombie (1946), modificada por Amann e Almquist (1962).

Calculou-se o rendimento intrínseco da espermatogênese a partir das razões encontradas entre os números corrigidos das células germinativas, a fim de quantificar a eficiência do processo espermatogênico. Uma vez que PL-L e ZG são uma subpopulação de espermátocitos primários iniciais (EPI), estes dois tipos celulares foram agrupados para o cálculo do índice mitótico. Determinou-se assim o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais ou índice mitótico ( $EPI / A$ ), a fim de quantificar as perdas ou degenerações celulares ocorridas durante a fase espermatogonial; o rendimento meiótico ( $Ar / PQ$ ), a fim de quantificar a eficiência das divisões meióticas e o rendimento geral da espermatogênese ( $Ar / A$ ), para a quantificação da eficiência do processo espermatogênico como um todo. O índice de células de Sertoli, que indica a capacidade de suporte das células de Sertoli por total de células germinativas, foi determinado a partir das razões encontradas entre os números corrigidos de células germinativas e o número corrigido de células de Sertoli, obtidos no estágio 1 do CES ( $A+PL-L+ZG+PQ+Ar$ ) / Se.

Assumindo-se que a perda na espermiogênese não é significativa, a reserva espermática testicular (RET) total e por grama de testículo foi calculada a partir da população celular de espermátides arredondadas no estágio 1 do CES. Deste modo, foi computado o número médio de espermátides arredondadas em secções transversais de túbulos seminíferos de espessura conhecida, sendo este número corrigido para o comprimento total do túbulo por testículo ou por grama de testículo, a partir da fórmula:  $RET = (\text{comprimento dos túbulos seminíferos} / \text{espessura do corte}) \times \text{número corrigido de espermátides arredondadas por secção transversal}$  (Berndtson, 1977).

A produção espermática diária (PED) foi calculada dividindo-se a RET pela duração do CES. Seu valor por grama de testículo foi obtido dividindo-se o valor anterior pelo peso gonadal.

## 2.7. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística descritiva, e as médias obtidas quanto à morfometria e contagens celulares entre as estações seca e chuvosa foram comparadas pelo teste *t* de Student para amostras independentes (STATISTICA). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão (DP), considerando-se um nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ).

### 3. Resultados

#### 3.1. *Biometria e morfometria testicular*

Os valores referentes à biometria e às proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular de *S. liliium*, nas estações seca e chuvosa, encontram-se na Tabela 1. Considerando-se as médias das duas estações, os animais apresentaram peso corporal de 23 g e peso testicular de 0,06 g, levando a um IGS de 0,27 %. A albugínea representou 10 % do peso testicular, e o parênquima testicular apresentou-se composto por 85 % de túbulos seminíferos e 15 % de intertúbulo. Comparando-se as estações seca e chuvosa, nenhum dos parâmetros analisados quanto à morfometria testicular apresentou alterações significativas. O compartimento tubular é formado por 3,7 % de túnica própria, 69,1 % de epitélio seminífero e 12,1 % de lúmen.

O volume do epitélio seminífero foi de 0,04 mL e o volume tubular de 0,05 mL, resultando assim no ITS de 0,21 %. O diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero apresentaram valores médios de 139,3  $\mu\text{m}$  e 40,1  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Os animais amostrados neste estudo apresentaram 3,5 m de túbulos seminíferos por testículo e 79,6 m de túbulos seminíferos por grama de testículo.

Tabela 1. Médias por estação da biometria e morfometria de componentes testiculares do morcego *S. lilium*.

Parâmetros	Estação seca	Estação chuvosa	Média
Peso corporal (g)	22,58±1,22 <sup>a</sup>	24,08±1,93 <sup>a</sup>	23,33±0,27
Peso gonadal (g)	0,05±0,02 <sup>a</sup>	0,08±0,05 <sup>a</sup>	0,06±0,02
Índice gonadossomático (%)	0,23±0,07 <sup>a</sup>	0,32±0,22 <sup>a</sup>	0,27±0,06
Albugínea (%)	8,82±3,01 <sup>a</sup>	12,05±1,34 <sup>a</sup>	10,43±2,28
Túbulos seminíferos (%)	85,38±5,45 <sup>a</sup>	84,64±9,75 <sup>a</sup>	85,01±0,52
Volume do túbulo seminífero (mL)	0,04±0,02 <sup>a</sup>	0,06±0,05 <sup>a</sup>	0,05±0,01
Túnica própria (%)	3,70±1,26 <sup>a</sup>	3,79±0,41 <sup>a</sup>	3,74±0,06
Epitélio seminífero (%)	71,44±5,33 <sup>a</sup>	66,82±6,16 <sup>a</sup>	69,13±3,27
Volume do epitélio seminífero (mL)	0,03±0,02 <sup>a</sup>	0,04±0,05 <sup>a</sup>	0,04±0,01
Lúmen (%)	10,24±2,65 <sup>a</sup>	14,02±5,94 <sup>a</sup>	12,13±2,67
Intertúbulo (%)	14,62±5,45 <sup>a</sup>	15,37±9,73 <sup>a</sup>	14,99±0,53
Volume do intertúbulo (mL)	0,006±0,002 <sup>a</sup>	0,007±0,001 <sup>a</sup>	0,007±0,000
Diâmetro do túbulo seminífero (µm)	134,42±20,88 <sup>a</sup>	144,26±25,33 <sup>a</sup>	139,54±7,24
Altura do epitélio seminífero (µm)	39,41±5,05 <sup>a</sup>	40,96±7,66 <sup>a</sup>	40,19±1,10
Índice tubulossomático (%)	0,18±0,07 <sup>a</sup>	0,25±0,19 <sup>a</sup>	0,21±0,05
CT por testículo (m)	3,06±1,00 <sup>a</sup>	3,98±1,23 <sup>a</sup>	3,52±0,65
CT por grama de testículo (m/g)	76,80±39,70 <sup>a</sup>	82,47±56,32 <sup>a</sup>	79,63±4,01

Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença estatística significativa, pelo teste *t* de Student Newman Keuls ( $p>0,05$ ). Dados expressos em Média ± DP. CT= Comprimento tubular.

A contagem de células apoptóticas não variou significativamente entre as estações, sendo observadas 0,63 e 1,66 células em apoptose por  $\mu\text{m}^2$  nas estações seca e chuvosa, respectivamente. O espermatoócito primário em paquíteno foi o tipo celular mais frequentemente observado em apoptose (Figura 1).

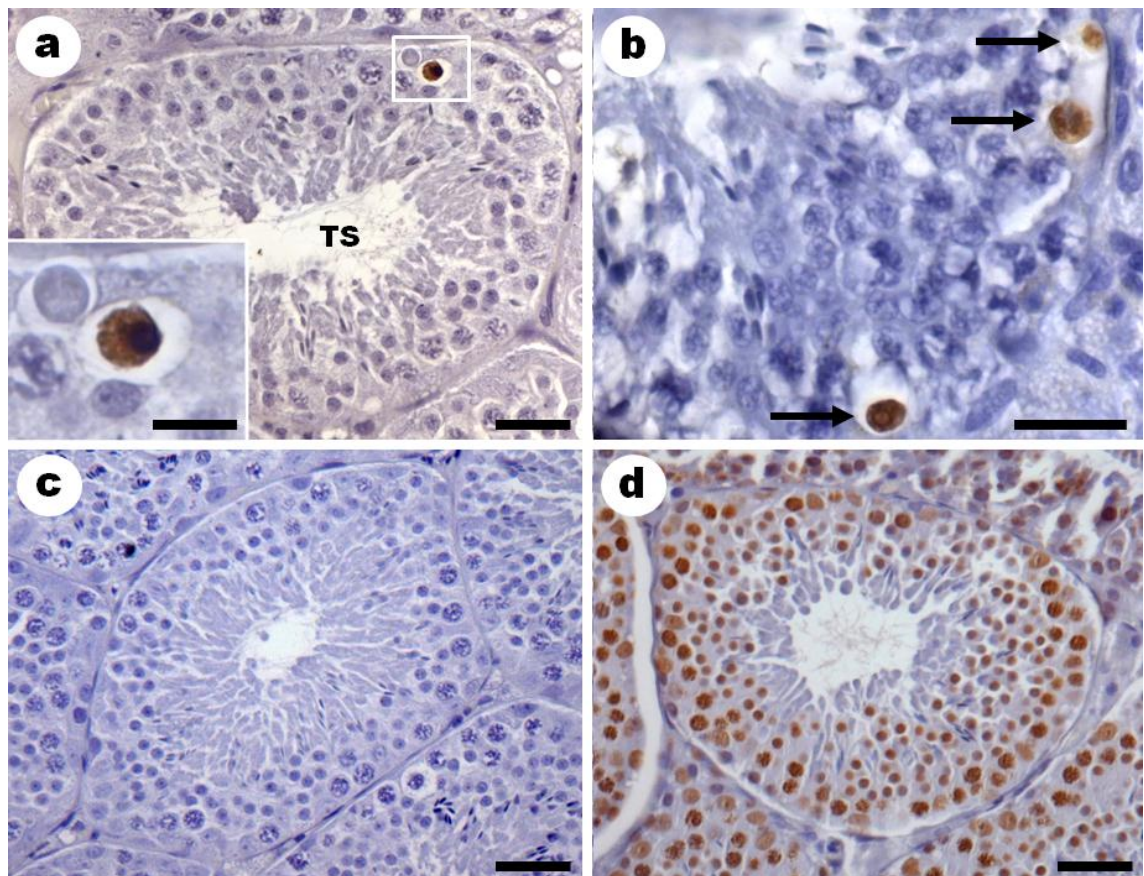


Figura 1. Secções histológicas testiculares do morcego *Sturnira lilium*, submetidas à técnica de TUNEL. Núcleos em marrom mostram células em apoptose. **a)** TS: Túbulo seminífero. Barra: 30  $\mu\text{m}$ . Detalhe: Apoptose de espermatócito primário em paquíteno. Barra: 10  $\mu\text{m}$ . **b)**  $\rightarrow$ : Apoptose de espermatócitos primários em paquíteno. Barra: 20  $\mu\text{m}$ . **c)** Controle negativo. Barra: 30  $\mu\text{m}$ . **d)** Controle positivo. Barra: 30  $\mu\text{m}$ .

### 3.2. Contagens celulares

Na Figura 2 observam-se secções transversais de túbulos seminíferos com o arranjo celular típico do epitélio seminífero no estágio 1, onde se pode observar a presença de espermatócitos primários iniciais, tanto na fase de pré-leptóteno para leptóteno, no início do estágio 1 (Fig. 2a), quanto na fase de zigóteno, ao final do estágio 1 (Fig. 2b), além dos demais tipos celulares que compõem o epitélio germinativo nesta fase.

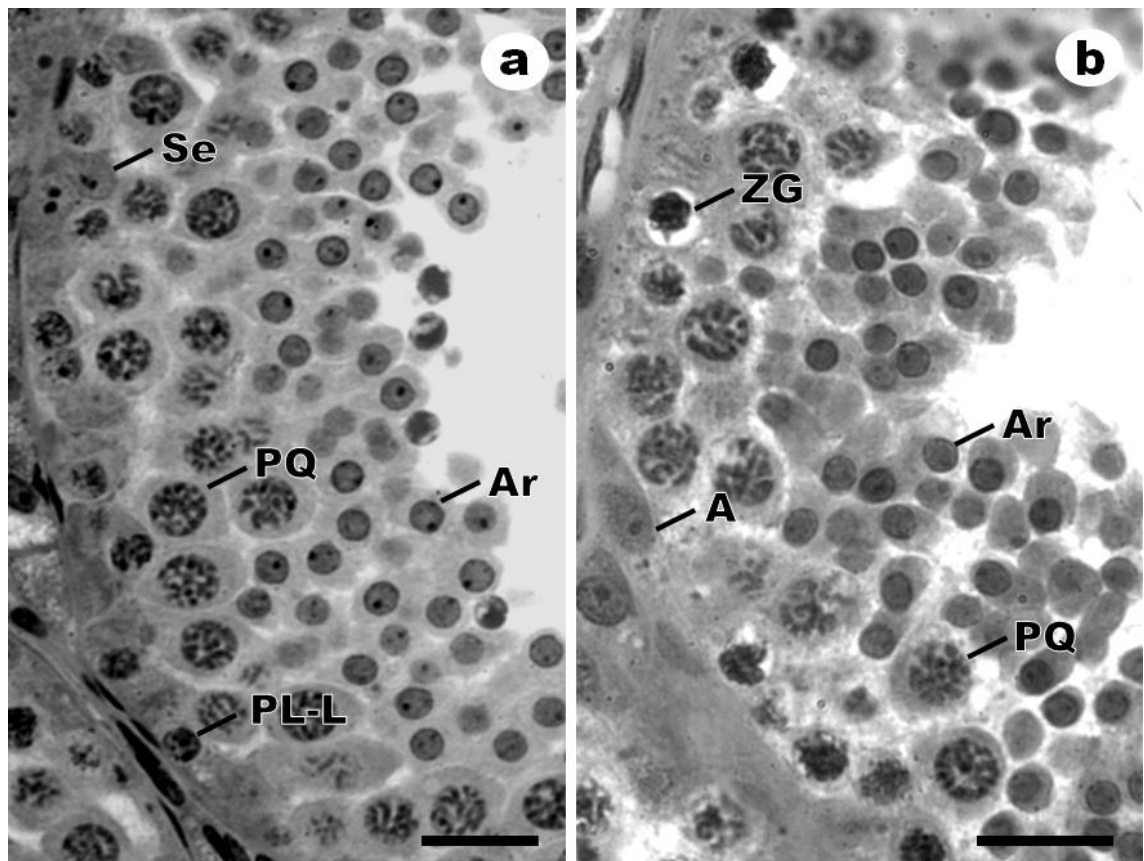


Figura 2: Fotomicrografia de luz de seções transversais de túbulos seminíferos no início (a) e final (b) do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de *Sturnira lilium*, pelo método da morfologia tubular. a) **PL-L**: Espermatócito primário na transição de pré-leptóteno para leptóteno; **PQ**: Espermatócito primário em paquíteno; **Ar**: Espermátide arredondada; **Se**: Núcleo de célula de Sertoli. Barra: 30  $\mu\text{m}$ . b) **ZG**: Espermatócito primário em zigóteno; **PQ**: Espermatócito primário em paquíteno; **Ar**: Espermátide Arredondada; **A**: Espermatogônia A. Barra: 20  $\mu\text{m}$ .

Na Tabela 2 são apresentadas as contagens corrigidas para cada tipo celular do estágio 1. Uma seção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 apresentou, em média, 8,5 células de Sertoli, 0,5 espermatogônias do tipo A, 4,4 espermatócitos primários na transição de pré-leptóteno para leptóteno, 3,7 espermatócitos primários em zigóteno, 11,9 espermatócitos primários em paquíteno e 35,6 espermátides arredondadas. Em relação à população de espermatócitos primários iniciais, os túbulos seminíferos que se encontravam no início do estágio 1 apresentaram apenas espermatócitos em pré-leptóteno para leptóteno, enquanto aqueles do final do estágio 1 já apresentavam os espermatócitos primários na fase de zigóteno. Adicionalmente, em

alguns túbulos foram observados esses dois tipos celulares, sendo que quando isto ocorreu, usualmente ocuparam porções opostas no túbulo seminífero.

As células de Sertoli apresentaram diâmetro nucleolar médio de 1,9  $\mu\text{m}$ . As espermatogônias A, espermatócitos primários na transição de pré-leptóteno para leptóteno, em zigóteno, em paquíteno, e espermatídes arredondadas apresentaram diâmetro nuclear médio de 9,7, 6,6, 7,4, 9,0 e 5,1  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Tabela 2. Médias por estação da população celular corrigida do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero e índices indicativos de produção espermiática no morcego *S. lilium*.

Parâmetros	Estação seca	Estação chuvosa	Média
Célula de Sertoli	8,15 $\pm$ 1,19 <sup>a</sup>	8,88 $\pm$ 1,78 <sup>a</sup>	8,51 $\pm$ 0,52
Espermatogônia A	0,48 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	0,66 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	0,57 $\pm$ 0,13
Espermatócito primário inicial	7,24 $\pm$ 2,38 <sup>a</sup>	9,19 $\pm$ 4,12 <sup>a</sup>	8,21 $\pm$ 1,32
Pré-leptóteno/Leptóteno	4,58 $\pm$ 2,18 <sup>a</sup>	4,37 $\pm$ 2,50 <sup>a</sup>	4,47 $\pm$ 0,14
Zigóteno	2,66 $\pm$ 2,04 <sup>a</sup>	4,82 $\pm$ 2,62 <sup>a</sup>	3,74 $\pm$ 1,53
Espermatócito primário tardio: Paquíteno	11,00 $\pm$ 2,19 <sup>a</sup>	12,96 $\pm$ 6,05 <sup>a</sup>	11,98 $\pm$ 1,39
Espermatíde arredondada	34,33 $\pm$ 13,35 <sup>a</sup>	37,05 $\pm$ 18,77 <sup>a</sup>	35,69 $\pm$ 1,92
Índice mitótico	16,10 $\pm$ 7,07 <sup>a</sup>	14,85 $\pm$ 9,10 <sup>a</sup>	15,48 $\pm$ 0,88
Índice meiótico	3,05 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>	2,82 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>	2,94 $\pm$ 0,16
Rendimento geral da espermatogênese	75,59 $\pm$ 34,41 <sup>a</sup>	61,92 $\pm$ 27,39 <sup>a</sup>	68,76 $\pm$ 9,67
Índice de células de Sertoli	6,74 $\pm$ 2,81 <sup>a</sup>	7,39 $\pm$ 4,69 <sup>a</sup>	7,06 $\pm$ 0,46
CS por testículo ( $\times 10^{12}$ )	8,39 $\pm$ 3,15 <sup>a</sup>	12,14 $\pm$ 5,18 <sup>a</sup>	10,26 $\pm$ 2,65
CS por grama de testículo ( $\times 10^{13}$ )	18,48 $\pm$ 10,04 <sup>a</sup>	26,14 $\pm$ 19,84 <sup>a</sup>	22,31 $\pm$ 5,41
PED ( $\times 10^6$ )	9,20 $\pm$ 1,21 <sup>a</sup>	12,60 $\pm$ 2,34 <sup>b</sup>	10,90 $\pm$ 2,40
PED por grama de testículo ( $\times 10^6$ )	193,50 $\pm$ 60,73 <sup>a</sup>	225,87 $\pm$ 114,20 <sup>a</sup>	209,68 $\pm$ 22,89
RET ( $\times 10^6$ )	31,75 $\pm$ 4,19 <sup>a</sup>	43,47 $\pm$ 8,07 <sup>b</sup>	37,61 $\pm$ 8,28
RET por grama de testículo ( $\times 10^7$ )	75,12 $\pm$ 24,07 <sup>a</sup>	77,92 $\pm$ 39,40 <sup>a</sup>	76,52 $\pm$ 1,97

Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença estatística significativa, pelo teste *t* de Student Newman Keuls ( $p > 0,05$ ). Dados expressos em Média  $\pm$  DP. CS= número de células de Sertoli. PED= produção espermiática diária. RET= reserva espermiática testicular.

### 3.3. Ultraestrutura das células germinativas

A ultraestrutura de tipos celulares presentes no epitélio germinativo, no estágio 1 do CES, é apresentada na Figura 3. Observam-se espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno unidos por ponte citoplasmática (Fig. 3a) e células de Sertoli com seus núcleos característicos e nucléolo fragmentado evidente (Fig. 3b). Estes tipos

celulares localizaram-se próximos à lâmina basal. No núcleo de um espermátócito primário em leptóteno puderam ser observadas regiões de cromatina linear, que são elementos desemparelhados que formarão o complexo sinaptonêmico. Este espermátócito não está mais em contato com a lâmina basal (Fig. 3c). São observadas também espermátides arredondadas, com capuz acrossômico cobrindo parte da superfície nuclear (Fig. 3d).

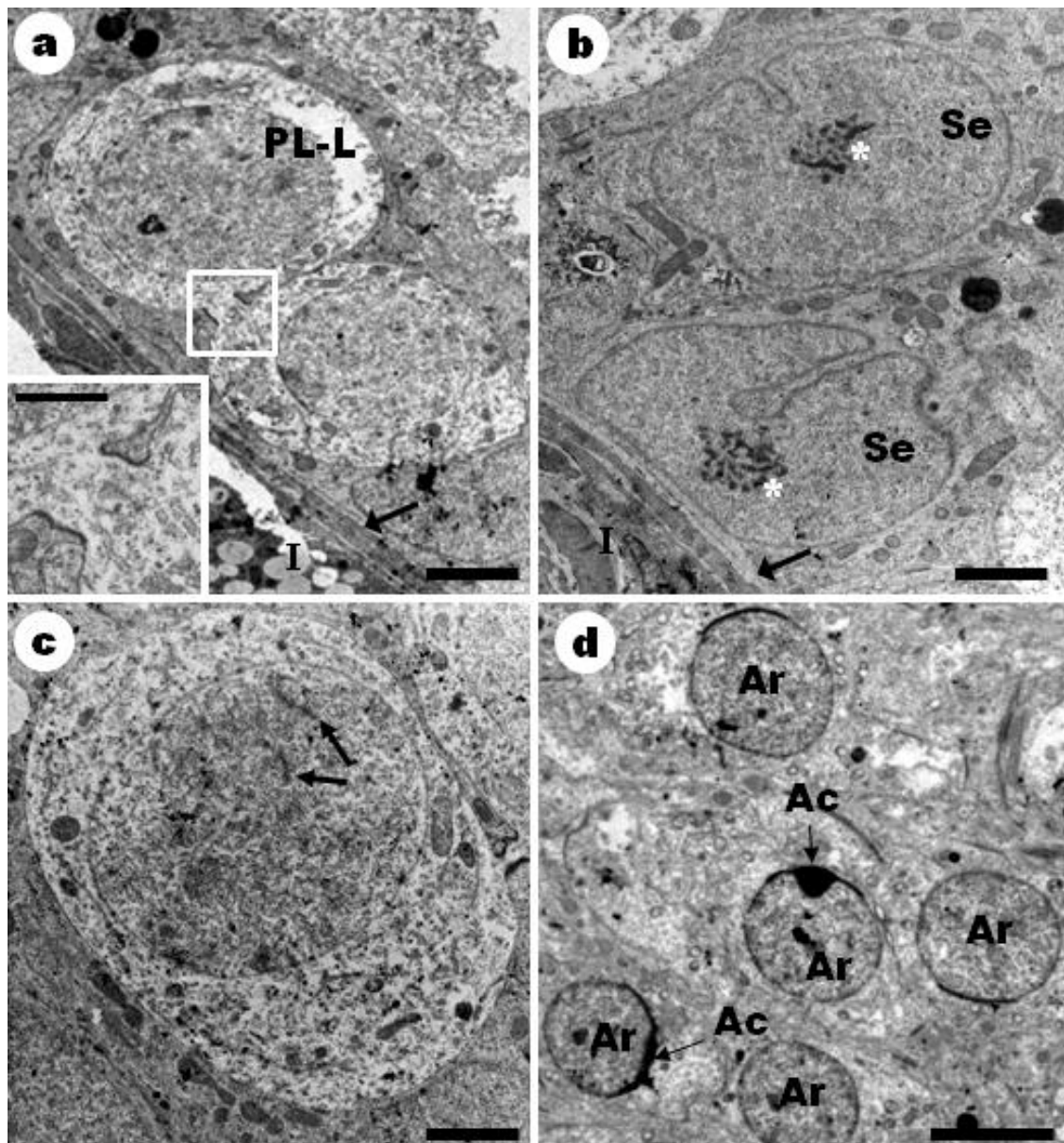


Figura 3. Ultraestrutura de células presentes nos túbulos seminíferos de *Sturnira lilium* no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero. **a)** A: Espermátócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno unidos por ponte citoplasmática; →: Lâmina basal; I: Intertúbulo. Detalhe: Ponte citoplasmática. Barras 3µm. **b)** Se: Núcleo da célula de Sertoli; \*:

Nucléolo da célula de Sertoli; →: Lâmina basal; I: Intertúbulo. Barra 2 $\mu$ m. c) →: Regiões de cromatina linear presentes no núcleo de um espermatócito primário em leptóteno. Barra 2 $\mu$ m. d) Ar: Núcleo da espermátide arredondada; Ac: Capuz acrossômico. Barra 5 $\mu$ m.

### 3.4. *Rendimento da espermatogênese*

Na Tabela 2 estão os valores referentes ao rendimento intrínseco da espermatogênese. O índice mitótico revelou que em média 15,4 espermatócitos primários iniciais foram produzidos por cada espermatogônia A. A meiose dos espermatócitos primários rendeu 2,9 espermátides e o rendimento geral da espermatogênese foi de 68,7 células, considerando-se todas as estações. Estes parâmetros não sofreram alterações significativas quando comparadas as estações seca e chuvosa.

Considerando-se todas as células da linhagem germinativa, uma célula de Sertoli de *S. liliun* pode suportar em média 7 células germinativas. Cada testículo de *S. liliun* apresentou em média  $10,26 \times 10^{12}$  células de Sertoli, e em cada grama de testículo podem ser encontradas em média  $22,31 \times 10^{13}$  células de Sertoli.

### 3.5. *Reserva espermática testicular e produção espermática diária*

A reserva espermática encontrada em cada testículo foi significativamente maior na estação chuvosa em relação à estação seca, enquanto a reserva espermática por grama de testículo não variou significativamente entre as estações, apresentando média de  $76,52 \times 10^7$  células (Tabela 2).

A marcação mais evidente para a BrdU foi obtida após 1 dia de sua aplicação. A marcação da célula germinativa mais avançada no epitélio seminífero no momento da coleta ocorreu no espermatócito primário na transição de leptóteno para zigóteno, no estágio 2 (Fig. 4). Assim, com 1 dia houve uma progressão de aproximadamente 29 % do CES, levando a um ciclo com duração média de 3,45 dias.

A quantificação da produção espermática diária revelou que cada testículo de *S. liliun* produz em média  $10,90 \times 10^6$  espermatozoides, sendo que esta produção foi significativamente maior na estação chuvosa em relação à estação seca, não apresentando diferenças significativas no seu valor por grama de testículo (Tabela 2).

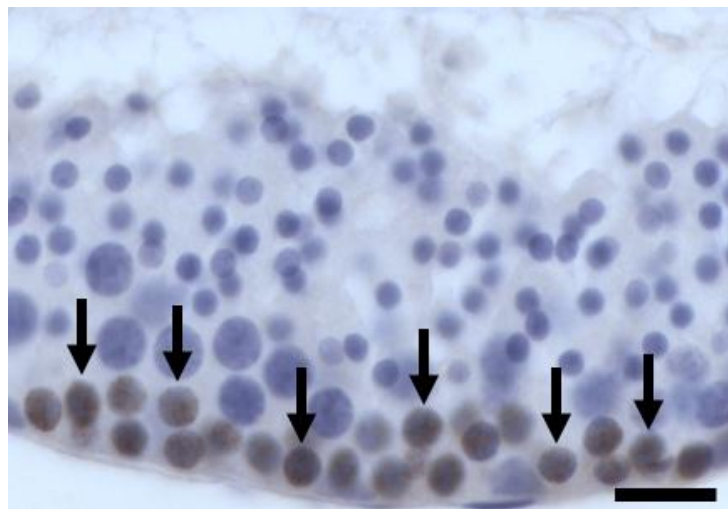


Figura 4. Espermatócitos primários na transição de pré-leptóteno para leptóteno no estágio 2 do ciclo do epitélio seminífero do morcego *Sturnira lilium* com marcação para bromodesoxiuridina (→). Barra: 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4. Discussão

##### 4.1. Biometria e morfometria testicular

Poucos estudos avaliam a morfometria testicular em morcegos, sendo que não foram encontrados trabalhos prévios acerca dos índices indicativos de produção espermática na ordem Chiroptera.

Uma estratégia reprodutiva comum entre os morcegos é o sistema de acasalamento poligínico, onde um macho defende um harém, não permitindo que outros machos se aproximem, e este macho dominante pode então copular com várias fêmeas (Bradbury e Vehrencamp, 1977; Altringham, 1998). Assim, estes animais podem apresentar menor investimento em massa testicular quando comparado a espécies com comportamentos promíscuos ou poliândricos (Kenagy e Trombulak, 1986). O IGS encontrado em *S. lilium* (0,27 %) esteve abaixo do observado em outras espécies poligínicas, como *M. molossus* (0,47 %, Morais, 2008) e *A. lituratus* (0,40 %, Miranda, 2012). Estes valores estão acima do observado em animais monogâmicos como o cachorro do mato (0,06 %, Caldeira et al., 2010), ou que apresentem monogamia facultativa como o lobo guará (0,04 %, Bittencourt, 2007).

O percentual do parênquima testicular representado pela albugínea, cuja média foi de 10 %, esteve de acordo com o relatado para diversas espécies de mamíferos (França e Russell, 1998). Este percentual é usualmente descontado da massa testicular total para obtenção do peso do parênquima, que é a porção secretora e gametogênica testicular, já que a albugínea não participa diretamente das funções espermatogênica e androgênica (Johnson et al., 2000). Do mesmo modo, o peso corporal observado nos animais deste estudo (média de 23 g) foi semelhante ao previamente relatado para a espécie no Brasil (Reis et al., 2007).

A histoarquitetura testicular de *S. lilium* apresentou-se de acordo com o observado em outras espécies de mamíferos (França e Russell, 1998; Paula et al., 2002; Couto e Talamoni, 2005; Bittencourt, et al., 2007; Caldeira et al., 2010; Costa et al., 2008; Costa et al., 2011; Balarini et al., 2011) e seguiu o padrão de organização observado também em outros morcegos (Singwi e Lall, 1983; McGuckin e Blackshaw, 1987; Morais et al., 2008; Beguelini et al., 2009; Oliveira et al., 2009).

De modo geral, as médias observadas quanto à proporção volumétrica dos componentes testiculares em *S. lilium* (85 % de túbulos seminíferos e 15 % de intertúbulo) foram menores que o observado em *M. molossus*, (Morais, 2008), mas dentro da faixa já registrada para diversos mamíferos, onde o percentual de túbulos seminíferos varia de 60 a 90 %, e o percentual de intertúbulo de 11 a 40 % (França e Russell, 1998).

O diâmetro tubular (média de 140  $\mu\text{m}$ ) apresentou-se próximo dos menores valores observados para outros animais que variam de 133 a 300  $\mu\text{m}$  (França e Russell, 1998; Couto e Talamoni, 2005; Leal e França, 2006; Morais, 2008; Melo et al., 2010; Balarini et al., 2011; Miranda, 2012). De modo semelhante, a altura registrada para o epitélio seminífero, com média de 40  $\mu\text{m}$ , esteve dentre os menores valores já observados para mamíferos, cuja variação é de 31 a 100  $\mu\text{m}$  (Almeida et al., 2006; Morais, 2008; Caldeira et al., 2010; Costa et al., 2010; Melo et al., 2010; Costa et al., 2011; Miranda, 2012), o que permitiu um elevado comprimento tubular por grama de testículo, que em *S. lilium* (média de 80 m) esteve cerca de 5 vezes acima do observado na maioria dos mamíferos, nos quais a média é de 15 m (França e Russell, 1998; Paula et al., 2002; Leal e França, 2006; Costa et al., 2008). Elevado comprimento tubular por grama de testículo foi também encontrado no morcego *M. molossus* (48 m, Morais, 2008) e *A. lituratus* (27 m, Miranda 2012), sugerindo que esta seja uma característica comum dentre os morcegos. Fora da ordem Chiroptera, os maiores valores previamente

reportados de comprimento tubular por grama de testículo foram encontrados na cutia e na paca, com 32 e 35 m, respectivamente (Costa et al., 2010).

O ITS (média de 0,21%) também foi elevado quando comparado a espécies como o leão africano (0,001 %, Barros et al., 2006) e cachorro do mato (0,04 %, Caldeira et al., 2010), porém menor que o relatado para o rato (0,50 %, Melo et al., 2010) e *M. molossus* (0,37 %, Morais, 2008). Os elevados, comprimento tubular por grama de testículo e ITS reforçam a tendência descrita por Kenagy e Trombulak (1986) de maior investimento em produção espermática em animais de menor porte.

Como a maioria dos parâmetros analisados quanto à morfometria testicular não mostrou alterações significativas entre as estações seca e chuvosa, sugere-se que *S. liliium* apresente um padrão reprodutivo anual contínuo. Todos os animais utilizados neste estudo apresentaram epitélio germinativo desenvolvido e todos os estádios do CES, incluindo as espermátides alongadas prontas para espermição no estágio 8. Comprimento tubular por grama de testículo e ITS elevados podem estar relacionados também a este padrão reprodutivo contínuo, que requer maior investimento em túbulos seminíferos para suportar a espermatogênese durante todo o ano.

#### 4.2. *Contagens celulares*

Comumente são encontrados no estágio 1 do CES espermatogônias A, espermátocitos primários em pré-leptóteno/leptóteno, espermátocitos primários em paquíteno e espermátides arredondadas (França e Russell, 1998; Paula et al., 1999; Bittencourt et al., 2004; Almeida et al., 2006; Beguelini et al., 2009; Costa et al., 2010; Balarini et al., 2011), sustentados pelas células de Sertoli. No entanto, em *S. liliium* foram também observados espermátocitos primários já em zigóteno, indicando que, ou a progressão do espermátocito primário na transição de pré-leptóteno para leptóteno e zigóteno é rápida, ou este estágio apresenta maior duração.

Foram encontradas poucas espermatogônias A (0,57 células em média) quando comparado a outras espécies como rato (1,3, Melo et al., 2010) e queixadas (2,4, Costa et al., 2007). A contagem das demais células da linhagem germinativa que compõem o epitélio seminífero no estágio 1 também esteve abaixo do registrado para outros animais, como a onça pintada por exemplo (Azevedo et al., 2010). Por outro lado, o número de células de Sertoli por secção transversal tubular foi elevado, estando a média encontrada para *S. liliium* (8,5 células) acima do observado em queixada (5,8, Costa et

al., 2007) e no lobo guará (7,7, Bittencourt et al., 2004), e próximo do encontrado em cães (8,1, Mascarenhas et al., 2006).

#### 4.3. Ultraestrutura das células germinativas

A ultraestrutura do epitélio seminífero no estágio 1 do CES permitiu a visualização de uma ponte citoplasmática entre espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno. Sabe-se que no epitélio seminífero, todas as células germinativas de uma determinada geração encontram-se unidas por pontes citoplasmáticas e esta ligação permite um desenvolvimento sincrônico das células germinativas. Assim, as diferentes gerações celulares observadas no epitélio seminífero ao longo da secção transversal do túbulo, estão em uma sequência de maturação crescente, da base para o lume tubular (Russell et al., 1990). Esta sincronização pôde, portanto, ser confirmada em *S. lilium*.

O núcleo das células de Sertoli, com seu formato irregular e indentações típicas, apresentou-se de acordo com o observado nos demais mamíferos conhecidos (Russell et al., 1990; Russell e Griswold, 1993), incluindo outras espécies de morcegos (Orsi et al., 1993; Beguelini et al., 2011). O nucléolo das células de Sertoli apresentou-se granular, assim como o observado em outros mamíferos, como no morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Orsi et al., 1993).

A análise ultraestrutural permitiu visualizar ainda cromatinas lineares no espermatócito primário em leptóteno, que segundo Russell et al. (1990) são elementos desemparelhados que formarão o complexo sinaptonêmico a partir do espermatócito primário em zigóteno. Estes complexos são estruturas protéicas que conectam pares de cromossomos homólogos e são indispensáveis para a progressão da primeira divisão meiótica (Fraune et al., 2012; Xie et al., 2012). As características apresentadas pelo espermatócito primário em leptóteno foram semelhantes ao descrito por Russell et al. (1990) no rato e por Beguelini et al. (2011) no morcego *Platyrrhinus lineatus*.

A presença de uma geração de espermátides arredondadas é uma característica marcante do estágio 1 do CES. Embora a visualização pela microscopia de luz convencional não permita observar claramente a presença do acrossoma, a ultraestrutura mostrou que nesta fase do ciclo já existe um capuz acrossômico cobrindo parte da superfície nuclear destas espermátides.

#### 4.4. Rendimento da espermatogênese

São escassos os estudos acerca do número de gerações espermatogoniais presentes em morcegos. Saidapur e Patil (1992) descreveram 5 gerações de espermatogônias no megaquiróptero *Rousettus leschenaulti*, enquanto estudos em animais domésticos revelam a existência de seis gerações, sendo que a divisão da primeira geração de espermatogônias tronco originaria, ao final do processo de divisões celulares, 64 espermátocitos primários (Russell et al., 1990; França e Russell, 1998). O índice mitótico permite quantificar as perdas ou degenerações celulares ocorridas durante esta fase proliferativa ou espermatogonial, onde é constatada grande perda celular entre os mamíferos domésticos, variando de 60 a 90 % (França e Russell, 1998). Em *S. liliium*, este índice mostrou que 15,4 espermátocitos primários iniciais foram produzidos a partir de cada espermatogônia A. Pode-se estimar, portanto uma perda celular de 76 % nesta fase. Este valor encontra-se dentro da amplitude observada para a maioria dos animais domésticos e selvagens (Jones e Berndtson, 1986; França e Russell, 1998; Barros et al., 2007; Costa et al., 2007; Azevedo et al., 2010; Costa et al., 2011).

Geralmente, é na fase meiótica que ocorre, numericamente, a menor perda celular na maioria dos mamíferos estudados, sendo de 5 a 30 % (Roosen-Runge, 1973; França e Russell, 1998). Acredita-se que este fato esteja relacionado às apoptoses de espermátocitos, como parte do mecanismo de manutenção de um número apropriado de células germinativas e eliminação de células geneticamente anormais (Blanco-Rodriguez, 1998; Kimura et al., 2003). De maneira geral, nos mamíferos esta perda é de cerca de 25 %, ou seja, de cada quatro espermátides arredondadas esperadas, três são formadas (França e Russell, 1998). Em *S. liliium* foi observada perda de 26 % e o rendimento meiótico encontrado, de 2,9 células, também esteve dentro da faixa registrada previamente para outros mamíferos, que varia de 1,90 a 3,62 células (França e Russell, 1998; Guião-Leite e Paula, 2003; Bittencourt et al., 2004; Barros et al., 2007; Costa et al., 2007; Azevedo et al., 2010; Melo et al., 2010; Costa et al., 2011).

Como as perdas durante o processo espermiogênico são pequenas e consideradas não significativas, este índice, por basear-se na população de espermátides arredondadas, fornece grande confiabilidade para a avaliação da produção espermática (Amann, 1970; Berndtson, 1977; Russell e Peterson, 1984; França e Russell, 1998; Johnson et al., 2000). Assim, o número de espermátides arredondadas quantificadas no estágio 1 do CES é considerado como a população final de espermatozoides (Mascarenhas et al., 2006). Em *S. liliium*, cerca de 68 espermátides arredondadas são

produzidas durante o processo espermatogênico, valor este acima do observado em diversos mamíferos domésticos e selvagens (França e Russell, 1998; Assis-Neto et al., 2003; Costa et al., 2007; Azevedo et al., 2010; Costa et al., 2011), o que está relacionado à elevada reserva espermática encontrada neste estudo.

Em *S. liliium*, foram encontradas, em média, 7,0 células germinativas para cada célula de Sertoli, valor este abaixo do registrado para a maioria dos mamíferos já investigados, onde a média varia de 10 a 22 células (Zhengwei et al., 1997; França e Russell, 1998; Zhengwei et al., 1998; Costa et al., 2007; Costa et al., 2011), o que indica baixa capacidade de suporte desempenhada por estas células em *S. liliium*.

Assim como o número de células de Sertoli quantificadas no estágio 1, o número médio de células de Sertoli por grama de testículo ( $22,31 \times 10^{13}$  células) esteve muito acima do encontrado nos demais mamíferos, onde a média é de cerca de  $25 \times 10^6$  células (França e Russell, 1998; Melo et al., 2010; Costa et al., 2011). Este dado demonstra que um grande número de células é necessário para sustentar a espermatogênese, o que justifica a menor capacidade suporte observada em *S. liliium*.

#### 4.5. Reserva espermática testicular e produção espermática diária

O nascimento de filhotes de *S. liliium* se concentra no período chuvoso, quando diversos autores observaram grande número de fêmeas gestantes e/ou lactantes (Pacheco, 2001; Mello et al., 2009; Kaku-Oliveira et al., 2010; Bernardi, 2011). Coincidindo com estes achados, a maior frequência de fêmeas de *S. liliium* gestantes e/ou lactantes nas redes de captura também foi observada na estação chuvosa.

Sabe-se que os morcegos, assim como os mamíferos em geral, ajustam seu ciclo reprodutivo de acordo com as condições ambientais. Assim, com os nascimentos ocorrendo durante a estação chuvosa, que engloba os meses da primavera e verão, os filhotes encontrarão temperaturas mais favoráveis ao seu desenvolvimento e maior disponibilidade de alimentos (Happold e Happold, 1990; Pacheco, 2001; Mello et al., 2009; Kaku-Oliveira et al., 2010; Bernardi, 2011). A temperatura é um fator a ser levado em consideração para espécies como *S. liliium*, que segundo Audet e Thomas (1997), não apresentam uma capacidade de termorregulação tão eficiente como em outros grupos de morcegos. Segundo Mello et al. (2009), a temperatura é mais importante para o início do ciclo reprodutivo nesta espécie do que a própria disponibilidade de alimentos. Como seu período gestacional dura cerca de quatro meses (Taddei, 1976; Sánchez-Hernández et al., 1996), é coerente supor que os acasalamentos

ocorram com maior frequência durante a estação seca, de modo que os nascimentos se concentrem na estação seguinte.

O aumento na reserva espermática testicular e na produção espermática diária observado em *S. liliium*, no período chuvoso em relação à estação seca, pode indicar a ocorrência de uma recuperação do epitélio seminífero na estação chuvosa, logo após o período de acasalamentos, nos meses mais secos. A produção espermática diária por grama de testículo de *S. liliium* (média de  $209,6 \times 10^6$  células) representa um valor muito acima do encontrado em animais como a onça pintada ( $16,9 \times 10^6$ , Costa et al., 2008 a  $26,8 \times 10^6$ , Guião-Leite e Paula, 2003), a paca ( $39 \times 10^6$ , Costa et al., 2010) e a cutia ( $52 \times 10^6$ , Costa et al., 2010), o que também está de acordo com a afirmativa de Kenagy e Trombulak (1986), de maior investimento em produção espermática em animais de menor porte.

Pode-se concluir que *S. liliium* apresenta padrão reprodutivo contínuo ao longo das estações seca e chuvosa no sudeste do Brasil. A espécie apresenta um dos maiores comprimentos de túbulos seminíferos e produção espermática diária já registrados para mamíferos. O elevado rendimento geral da espermatogênese observado e o grande número de células de Sertoli encontrados indicam uma baixa capacidade suporte por parte destas células. O fato de cada célula de Sertoli ter suportado um número reduzido de células germinativas, quando comparado a outros mamíferos, pode caracterizar uma estratégia para minimizar as perdas celulares, já que o rendimento geral da espermatogênese foi elevado. Os maiores valores encontrados para a reserva espermática testicular e a produção espermática diária por grama de testículo na estação chuvosa indicam uma recuperação do epitélio seminífero após a estação seca.

## **Agradecimentos**

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida.

## **Referências Bibliográficas**

Abercrombie, M. 1946. Estimation of nuclear populations from microtome sections. Anat. Rec. 94:239-247.

- Altringham, J.D. 1998. Bats: Biology and behavior. Oxford: University Press, 262 p.
- Almeida, F.F.L.; Leal, M.C.; França, L.R. 2006. Testis morphometry, duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa*). Biol Reprod. 75(5):792-799.
- Amann, R.P. 1970. Sperm production rates. In: Johnson, A.D.; Gomes, W.R.; Vandemark, N.L. (Eds.), The Testis. New York: Academic Press, pp. 433-482.
- Amann, R.P.; Almquist, J.O. 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. J Dairy Sci. 45:774-781.
- Amann, R.P.; Lambiase, J.T. 1969. The male rabbit III. Determination of daily sperm production by means of testicular homogenates. J Anim Sci. 28:369-374.
- Assis-Neto, A.C.; Melo, M.I.V.; Carvalho, M.C.A.; Miglino, M.A.; Oliveira, M.F.; Ambrósio, C.E.; Silva, S.M.M.S.; Blasquez, F.X.H.; Papa, P.C.; Júnior, J.R.K. 2003. Quantificação de células dos túbulos seminíferos e rendimento da espermatogênese em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros. Braz J Vet Res Anim Sci. 40(supl):175-179.
- Audet, D.; Thomas, D.W. 1997. Facultative hypothermia as a thermoregulatory strategy in the phyllostomid bats, *Carollia perspicillata* and *Sturnira lilium*. J Comp Physiol A. 167(2):146-152.
- Azevedo, M.H.F.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Fonseca, C.C.; Costa, E.P.; Costa, D.S.; Peixoto, J.V. 2010. Cell population indexes of spermatogenic yield and testicular sperm reserves in adult jaguars (*Panthera onca*). Anim Reprod Sci. 118(1):83-88.
- Balarini, M.K.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Peixoto, J.V.; Guião-Leite, F.L.; Rossi Júnior, J.L.; Czermak Júnior, A.C.; Walker, N.J. 2011. Stages and duration of the cycle of the seminiferous epithelium in oncilla (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775). Theriogenology. 77(5):873-880.
- Barros, J.B.G.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Fonseca, C.C.; Melo, F.R.; Benjamin, L.A. 2006. Morfometria testicular e dos túbulos seminíferos de leões-africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos, em cativeiro. Revista CERES 53(310):523-530.
- Barros, J.B.G.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Fonseca, C.C.; Guião-Leite, F.L.; Rossi, J.L.; Oliveira, P.C.; Costa, E.P. 2007. Sertoli cell index and spermatid reserves in adult captive African lions (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758). Anim Reprod Sci. 102(3-4):350-356.

- Baker, J.R. 1938. Evolution of breeding seasons. In: de Beer, G.R. (Ed.), *Evolution: Essays on Aspects of Evolutionary Biology*. Oxford: Clarendon Press, pp. 161-177.
- Beguelini, M.R.; Moreira, P.R.L.; Faria, K.C.; Marchesin, S.R.C.; Morielle-Versute, E. 2009. Morphological characterization of the testicular cells and seminiferous epithelium cycle in six species of neotropical bats. *J Morphol.* 270(8):943-953.
- Beguelini, M.R.; Puga, C.C.I.; Taboga, S.R.; Morielle-Versute, E. 2011. Ultrastructure of spermatogenesis in the white-lined broad-nosed bat, *Platyrrhinus lineatus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Micron* 42(6):586-599.
- Bernardi, I.P. 2011. Estrutura de comunidade, reprodução e distribuição temporal das capturas de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em relictos de Floresta Estacional Decidual no sul do Brasil. Curitiba: UFPR, 116 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação), Universidade Federal do Paraná.
- Berndtson, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J Anim Sci.* 44(5):818-883.
- 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. 2004. 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.* 28(2):108-113.
- Bittencourt, V.L.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Fonseca, C.C.; Costa, D.S.; Costa, E.P.; Benjamin, L.A. 2007. Biometria macro e microscópica dos componentes testiculares em lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) adulto. *Revista CERES* 54(313):329-340.
- Blanco-Rodriguez J. 1998. A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis. *Int J Androl.* 21(5):236-248.
- Bradbury, J.W.; Vehrencamp, S.L. 1977. Social organization and foraging in emballonurid bats. I. Field studies. *Behav Ecol Sociobiol.* 1:337-81.
- Bronson, F.H. 1985. Mammalian reproduction: an ecological perspective. *Biol Reprod.* 32: 1-26.
- Caldeira, B.C.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Balarini, M.K.; Campos, P.K.A. 2010. Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). *Revista CERES* 57(5):569-575.

- Costa, D.S.; Henry, M.; Paula, T.A.R. 2004. Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). Arq Bras Med Vet Zootec. 56(1):46-51.
- Costa, D.S.; Menezes, C.M.C.; Paula, T.A.R. 2007. Spermatogenesis in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*). Anim Reprod Sci. 98: 322-334.
- Costa, G.M.J.; Chiarini-Garcia H.; Morato, R.G.; Alvarenga, R.L.L.S.; França, L.R. 2008. Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar (*Panthera onca*). Theriogenology 70:136-1146.
- Costa, G.M.; Leal, M.C.; Ferreira, A.C.; Guimarães, D.A.; França, L.R. 2010. Duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in two large neotropical rodent species: the agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*). J Androl. 31(5):489-499.
- 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.L.M.C. 2011. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. Anim Reprod Sci. 127(3-4):202-212.
- Couto, D.C.; Talamoni, S.A., 2005. Reproductive condition of *Akodon montensis* Thomas and *Bolomys lasiurus* (Lund) (Rodentia, Muridae) based on histological and histometric analyses of testes and external characteristics of gonads. Acta Zool (Stockholm). 86:111-118.
- Crichton, E.G.; Krutzsch, P.H. 2000. Reproductive biology of bats. In: Racey, P.A., Entwistle, A.C. (Eds.), Life-history and Reproductive Strategies of Bats. London: Academic Press, pp. 364-367.
- Fabián, M.E.; Marques, R.V. 1989. Contribuição ao conhecimento da biologia reprodutiva de *Molossus molossus* (Pallas, 1766) (Chiroptera, Molossidae). Rev Bras Zool. 6(4):603-610.
- Fleming, T.H., Hooper, E.T., Wilson, D.E., 1972. Three Central American bat communities: structure, reproductive cycles and movement patterns. Ecology. 53(4):555-569.
- França, L.R.; Russell, L.D. 1998. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia, F., Regadera, J. (Eds.), Male reproduction: A Multidisciplinary Overview. Madrid: Churchill Livingstone, pp. 197-219.

- França, L.R.; Avelar, G.F.; Almeida, F.F.L. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 63(2):300-318.
- Fraune, J.; Schramm, S.; Alsheimer, M.; Benavente, R. 2012. The mammalian synaptonemal complex: Protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Exp Cell Res.* 318(12):1340-1346.
- Golfari, L. 1975. Zoneamento ecológico do Estado de Minas Gerais para reflorestamento. Belo Horizonte: PRODEPEF/PNUD/FAO/IBDF/Bra-45. Série técnica 3. 65 p.
- Guião-Leite, F.L.; Paula, T.A.R., 2003. Rendimento intrínseco da espermatogênese, o índice de células de Sertoli e a produção espermática diária da onça parda (*Puma concolor*). *Rev Bras Reprod Anim.* 27(1):21-26.
- Happold, D.C.D.; Happold, M., 1990. Reproductive strategies of bats in Africa. *J Zool.* 222(4):557-583.
- Heideman, P.D.; Utzurrum, R.C. 2003. Seasonality and synchrony of reproduction in three species of nectarivorous *Philippines bats*. *BMC Ecol.* 3:11.
- Johnson, L.; Varner, D.D.; Roberts, M.E.; Smith, T.L.; Keillor, G.E.; Scruchtfield, W.L. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci.* 60-61: 471-480.
- Jones, L.S.; Berndtson, W.E., 1986. A quantitative study of Sertoli cell and germ cell populations as related to sexual development and aging in the stallion. *Biol Reprod.* 35(1):138-148.
- Kaku-Oliveira, N.Y.; Munster, L.C.; Rubio, M.B.G.; Passos, F.C. 2010. Reprodução em cinco espécies de morcegos filostomídeos na Reserva Natural do Salto Morato, Guaraqueçaba, Paraná. *Chiroptera Neotropical Anais V EBEQ Suppl.* 16(1):22-24.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol.* 27:137.
- Kenagy, G.J.; Trombulak, S.C., 1986. Size and function of mammalian testis in relation to body size. *J Mamm.* 67(1):1-22.
- Kimura M, Itoh N, Takagi S, Sasao T, Takahashi A, Masumori N, Tsukamoto T. 2003. Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. *J Androl.* 24(2):185-91.

- Kunz, T.H.; Anthony, E.L.P. 1982. Age estimation and post-natal growth in the bat *Myotis lucifugus*. J Mammal. 63(1):23-32.
- Leal, M.C.; França, L.R. 2006. The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. Biol Reprod. 74:616-624.
- Mascarenhas, R.M.; Paula, T.A.R.; Júnior, M.C.; Ribeiro, E.C.S.; Borboleta, L.R.; Matta, S.L.P. 2006. Efeitos da biópsia incisional testicular sobre o rendimento intrínseco da espermatogênese e índices de células de Sertoli em cães. Revista CERES 53(305):107-112.
- Melo, F.C.S.A.; Matta, S.L.P.; Paula, T.A.R.; Gomes, M.L.M.; Oliveira, L.C. 2010. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. Biol Res. 43:445-450.
- Mello, M.A.R.; Kalko, E.K.V.; Silva, W.R. 2008. Diet and abundance of the bat *Sturnira lilium* (Chiroptera) in a Brazilian montane Atlantic forest. J Mammal. 89(2):485-492.
- Mello, M.A.R.; Kalko, E.K.V.; Silva, W.R. 2009. Ambient temperature is more important than food availability in explaining reproductive timing of the bat *Sturnira lilium* (Mammalia: Chiroptera) in a montane Atlantic forest. Can J Zool. 87:239-245.
- McGuckin, M.A.; Blackshaw, A.W., 1987. Cycle of the seminiferous epithelium in the grey-headed fruit bat, *Pteropus poliocephalus*. Aust J Biol Sci. 40:203-10.
- Miranda, D.C. 2012. Efeito dos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol sobre parâmetros testiculares do morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). Viçosa: UFV, 51 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Federal de Viçosa.
- Morais, D.B. 2008. Morfologia e morfometria testicular em morcego insetívoro (*Molossus molossus*, Pallas, 1776 Chiroptera: Molossidae). Viçosa: UFV, 74 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Federal de Viçosa.
- Neuweiler, G. 2000. The Biology of Bats. New York: Oxford University Press, 310 p.
- Nowak, R. M. 1994. Walker's Bats of the World. London: Johns Hopkins University Press, 287 p.

- Oliveira, R.L.; Oliveira, A.G.; Mahecha, G.A.B.; Nogueira, J.C.; Oliveira, C.A. 2009. Distribution of estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and androgen receptor in the testis of big fruit-eating bat *Artibeus lituratus* is cell- and stage-specific and increases during gonadal regression. *Gen Comp Endocrinol.* 161:283-292.
- Orsi, A.M.; Vicentini, C.A.; Dias, S.M.; Vicentini, I.B.F.; Moreno, M.H. 1993. Características ultraestruturais das células de Sertoli do morcego hematófago (*Desmodus rotundus rotundus*, Geoffrey, 1810). *Rev Bras Biol.* 53(4):583-590.
- Pacheco, S.M. 2001. *Biologia Reprodutiva, Desenvolvimento Pré e Pós-Natal e Maturidade Sexual de Morcegos da Região Sul, Brasil (Chiroptera, Phyllostomidae, Vespertilionidae, Molossidae)*. Curitiba: UFPR, 115p. Tese (Doutorado em Zoologia), Universidade Federal do Paraná.
- Paula, T.A.R.; França, L.R.; Garcia, H.C. 1999. Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Tissue Cell.* 31(3):327-334.
- Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Costa, D.S., 2002. Avaliação histológica e quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. *Biosci J.* 18(1):121-136.
- Racey, P.A. 1982. Ecology of bat reproduction. In: Kunz, T.H. (Ed.), *Ecology of Bats*. New York: Plenum Press, pp. 57-104.
- Reis, N.R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A.; Lima, I.P. 2007. Morcegos do Brasil. In: Zortéa, M. (Ed.), *Subfamília Sternodermatinae*. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina, pp. 121-122.
- Roosen-Runge, E.C. 1973. Germinal cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *J Reprod Fertil.* 35(2):339-348.
- Russell, L. D.; Griswold, M. D. 1993. *The Sertoli Cell*. Clearwater: Cache River Press, 801 p.
- Russell, L.D.; Peterson, R.N. 1984. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J Reprod Fertil* 70(2):635-641.
- Russell, L.D.; Ettlín, R.A.; Sinha Hikim, A.P.; Clegg, E.D. 1990. Mammalian spermatogenesis. In: Russell, L.D., Ettlín, R. A., Sinha Hikim, A. P., Clegg, E. D. (Eds), *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater: Cache River Press, pp. 1-40.
- Saidapur, S.K.; Patil, S.B. 1992. Kinetics of spermatogenesis in megachiropteran bat, *Rousettus leschenaulti* (Desmarset): seminiferous epithelial cycle, frequency of stages,

- spermatogonial renewal and germ cell degeneration. *Indian J Exp Biol.* 30(11):1037-1044.
- Sánchez-Hernández, C.; Castrejón-Osorio, M.T.; Chávez-Tapia, C.B. 1986. Patron reproductivo de *Sturnira lilium parvidens* (Chiroptera: Phyllostomidae) en la Costa Central del Pacífico de México. *Southwest Nat.* 31(3):331-340.
- Sazima, M.; Buzato, S.; Sazima, I. 2003. *Dyssochroma viridiflorum* (Solanaceae): a reproductively bat-dependent epiphyte from the Atlantic rainforest in Brazil. *Ann Bot.* 92(5):725-730.
- Sharpe, R.M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E.; Neill, J. D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, pp.1363-1434.
- Singwi, M.S.; Lall, S.B., 1983. Spermatogenesis in the non-scrotal bat *Rhinopoma kinneari* Wroughton (Microchiroptera: Mammalia). *Acta Anat.* 116(2):136-145.
- Taddei, V.A. 1976. The reproduction of some Phyllostomidae (Chiroptera) from the Northwestern region of the state of São Paulo. *Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo* 1:313-330.
- Wilson, D.E. 1979. Reproductive patterns. In: Baker, R. J., Jones, J. R., Carter, D. C. (Eds.), *Biology of Bats of the New World: Family Phyllostomidae. Part III. Special Publication of the Museum Texas Tech University.* 16:317-318.
- Xie, W.J.; Shi, D.Y.; Cai, Z.X.; Chen, X.Y.; Jin, W.W. 2012. Organization, function and genetic controlling of synaptonemal complex. *Yi Chuan.* 34(2):167-176.
- Zhengwei, Y.; McLachlan, R.I.; Bremmer, W.J.; Wreford, N.G. 1997. Quantitative (stereological) study of the normal spermatogenesis in the adult monkey (*Macaca fascicularis*). *J Androl.* 18(6):681-687.
- Zhengwei, Y.; Wreford, N.G.; Royce, P.; de Kretser, D.M.; McLachlan, R.I. 1998. Stereological evaluation of human spermatogenesis after suppression by testosterone treatment: heterogenous pattern of spermatogenic impairment. *J Clin Endocrinol Metab.* 83(4):1284-1291.
- Zortéa, M. 2002. Diversidade e Organização de uma Taxocenose de Morcegos do Cerrado Brasileiro. São Carlos: UFSCAR, 129p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos.

### Artigo 3

#### Caracterização histomorfométrica do compartimento intertubular dos testículos do morcego *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae)

##### Resumo

Objetivou-se neste estudo a caracterização e quantificação dos elementos que compõem o compartimento intertubular dos testículos do morcego *Sturnira lilium*, uma vez que são escassas estas informações em morcegos. As coletas foram realizadas nas diferentes estações climáticas anuais, sendo os animais divididos entre as estações seca e chuvosa. Após eutanásia, fragmentos testiculares foram fixados em Karnovsky e processados histologicamente para análises morfométrica, sob microscopia de luz e ultraestrutural, sob microscopia eletrônica de transmissão. Amostras de sangue de cada animal foram coletadas para dosagem de testosterona. As células de Leydig foram os principais componentes do intertúbulo (83,2 %), seguidas pelos vasos sanguíneos (8,5 %), tecido conjuntivo (6 %) e espaço linfático (2,3 %). A análise ultraestrutural permitiu evidenciar gotículas lipídicas abundantes no citoplasma das células de Leydig, além de fibras colágenas no tecido conjuntivo e espaços linfáticos de paredes delgadas, circundando os túbulos seminíferos. Assim como seus percentuais, o volume de cada componente do intertúbulo no parênquima testicular não variou significativamente entre as estações seca e chuvosa. As células de Leydig apresentaram diâmetro nuclear maior na estação chuvosa em relação à estação seca, assim como o volume nuclear, citoplasmático e volume celular total. A dosagem plasmática de testosterona não apresentou variações significativas ao longo do ano (21 ng/mL), assim como o número de células de Leydig total ( $50 \times 10^5$ ) ou por grama de testículo ( $11 \times 10^7$ ) e o índice Leydigossomático (0,03 %). Conclui-se que *S. lilium* apresenta grande investimento em tecido intertubular, sobretudo em células de Leydig. Grande parte dos componentes intertubulares, bem como os níveis de testosterona se mantiveram constantes ao longo do ano, contribuindo deste modo, para a proposição de um ciclo reprodutivo e androgênico contínuo para esta espécie, no sudeste do Brasil.

**Palavras-Chave:** Reprodução de morcegos, Célula de Leydig, Vasos sanguíneos, Espaço linfático, Tecido conjuntivo.

## 1. Introdução

Os morcegos desempenham papel de extrema importância na regulação dos ecossistemas tropicais. Com seus diversificados hábitos alimentares, atuam no controle de pragas, na polinização e dispersão de sementes, o que por sua vez tem papel crucial para a manutenção e recuperação florestal, incluindo o estabelecimento de espécies pioneiras (Cole e Wilson, 1996; Mikich, 2002; Mikich, et al., 2005; Mello et al., 2008). A espécie *Sturnira lilium*, que possui hábito alimentar predominantemente frugívoro (Reis et al., 2007), é uma importante polinizadora de algumas espécies de plantas (Vieira e Carvalho-Okano, 1996). Sua forte preferência alimentar pelos frutos da família Solanaceae representa particular importância para a reprodução de algumas espécies, que dependem dos morcegos para a polinização e dispersão de suas sementes (Marinho-Filho e Vasconcellos-Neto, 1994; Sazima et al., 2003). Portanto, torna-se fundamental que se conheça como esta espécie de morcego se reproduz, bem como se há influência de fatores ambientais sobre seu ciclo reprodutivo.

Os quirópteros apresentam um diversificado conjunto de estratégias reprodutivas, sendo sua reprodução mais variada do que na maioria das outras ordens de mamíferos (Crichton e Krutzsch, 2000). São citadas variações regionais quanto ao período em que se inicia o seu ciclo reprodutivo, sendo este diretamente influenciado por fatores como a temperatura e a disponibilidade alimentar (Bronson, 1985; Mello et al., 2009). É relatado para fêmeas de *S. lilium* uma poliestria bimodal território brasileiro, com duas estações reprodutivas ao ano (Wilson, 1979; Kaku-Oliveira et al., 2010; Bernardi, 2011). Por outro lado, em machos foi citada espermatogênese anual contínua por Taddei (1976) no Brasil, e poliestria contínua foi observada por Sanchez-Hernandez et al. (1986) no México e por Pulchério-Leite (2008) no Brasil.

O conhecimento da função reprodutiva de uma espécie pode ser obtido a partir da quantificação histológica das gônadas, sendo este um requisito básico para estudos que envolvam parâmetros reprodutivos (Paula et al., 2002). Assim, a aplicação da morfometria testicular, com a compartimentalização dos testículos em seus componentes básicos, túbulo e intertúbulo, permite avaliar a atividade das células e sua relação com a reprodução do animal (Russell, et al. 1990; Azevedo et al., 2010).

Enquanto no compartimento tubular estão localizadas as células da linhagem espermatogênica, no compartimento intertubular há predominância das células de Leydig, que têm importante função androgênica (Fawcett et al., 1973; Payne et al., 1996). Deste modo, a quantificação destas últimas permite inferir sobre a dinâmica

gonadal e até mesmo sobre a libido do animal, já que é a testosterona, seu principal produto de secreção, o hormônio responsável por desencadear, dentre outros fatores, o comportamento reprodutivo do animal (Payne et al., 1996; Ye et al., 2011). Mudanças na histologia das células de Leydig foram descritas no morcego *Myotis lucifugus lucifugus*, no nordeste dos Estados Unidos e correlacionadas às variações sazonais nas concentrações plasmáticas de testosterona (Gustafson, 1987). Integram ainda o compartimento intertubular os vasos sanguíneos, linfáticos e uma população celular variável no tecido conjuntivo, constituída principalmente de fibroblastos e macrófagos (Russell et al., 1990; Setchell, 1991). Estes componentes usualmente não apresentam alterações numéricas significantes (Fawcett et al., 1973) dentro da mesma espécie.

Objetivou-se, portanto, realizar a caracterização morfológica e morfométrica do compartimento intertubular dos testículos de *S. lilium*, bem como dosagem hormonal de testosterona. As avaliações foram realizadas ao longo de um ano, a fim de acompanhar a atividade reprodutiva destes animais frente às diferentes estações climáticas anuais, com o propósito de verificar se há influência sazonal no ciclo reprodutivo de machos dessa espécie.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Área de estudo*

Os animais foram capturados no município de Viçosa, região da Zona da Mata, sudeste do estado de Minas Gerais (Licença: ICMBio/IBAMA - nº 214887-1), no Campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O município de Viçosa está localizado a 20°45'14"S e 42°52'53"W, a uma altitude média de 650 m. Esta região é caracteristicamente montanhosa, inserida no bioma da Mata Atlântica, cujo clima é do tipo Cwa (mesotérmico, úmido com verões chuvosos e invernos secos), segundo a classificação de Köppen. Apresenta déficit hídrico no período de maio a setembro e excedente de precipitação entre dezembro e março (Golfari, 1975). As médias anuais registradas no período de coletas para precipitação pluviométrica, temperatura e umidade relativa do ar foram, respectivamente, 0,91 mm, 18 °C e 78 % na estação seca (abril a setembro) e 7,20 mm, 23 °C e 79 % na estação chuvosa (outubro a março) (Fonte: Estação Meteorológica do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa).

Foram capturados 14 morcegos da espécie *Sturnira lilium*, machos adultos, utilizando-se redes de neblina armadas próximo aos seus abrigos. As capturas foram realizadas ao longo das diferentes estações climáticas dos anos de 2009 e 2010, sendo os animais agrupados nas estações seca (n=7) e chuvosa (n=7). A identificação de animais adultos foi feita baseando-se na observação da fusão da cartilagem epifisária do quarto dedo, na junção metacarpo-falangeal, segundo Kunz e Anthony (1982).

Os animais foram abrigados em gaiolas e receberam frutas (mamão ou banana) e água *ad libitum*, desde a captura até a eutanásia, que foi realizada na manhã seguinte à noite da captura. A eutanásia foi feita por injeção de Pentobarbital Sódico (Nembutal), na concentração de 40 mg/Kg via intraperitoneal, seguida por injeção de solução saturada de Cloreto de Potássio (Autorização: CEUA/UFV – nº 93/11). No momento da eutanásia o sangue de cada animal foi coletado e armazenado em tubos heparinizados, os quais foram posteriormente centrifugados para separação do plasma (2000 rpm/ 15 min), que foi congelado a -20 °C até o momento da dosagem de testosterona. Os animais foram pesados e seus testículos removidos.

## 2.2. *Processamento histológico*

Para análises morfológicas e morfométricas sob microscopia de luz, os testículos foram fixados por imersão em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 h e transferidos para etanol 70 %. Os testículos foram pesados e a albugínea de um deles foi removida e pesada, sendo seu peso descontado do peso gonadal para cálculo do volume do parênquima testicular (peso líquido testicular). Como a densidade do testículo é em torno de 1, o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume (Johnson et al., 1981; Costa et al., 2011). Fragmentos testiculares foram desidratados em série etanólica crescente, procedendo-se a inclusão em glicol-metacrilato (Historesin, Leica®). Foram obtidas secções semisseriadas de 3 µm de espessura em micrótomo rotativo (Leica RM2255), respeitando-se um intervalo de 40 µm entre os cortes analisados. As preparações foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1 % e as análises morfométricas foram feitas a partir de imagens capturadas em fotomicroscópio Olympus BX-40 utilizando-se o software Image-Pro Plus®.

Para análise ultraestrutural, fragmentos testiculares foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 1 h e depois transferidos para solução de glutaraldeído 2,5 % por 23 h. Após lavagem em tampão fosfato, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1 % no mesmo tampão por 2 h. A desidratação foi

realizada em etanol e acetona, seguindo-se a inclusão em resina Epon 812. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

### 2.3. *Biometria e morfometria testicular*

As proporções volumétricas entre túbulos seminíferos e intertúbulo foram estimadas contando-se 3.520 pontos projetados sobre 10 imagens para cada animal. O volume destes componentes foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume do parênquima testicular.

Foram projetados 1.000 pontos sobre o compartimento intertubular, sendo registrados os pontos coincidentes sobre núcleo e citoplasma de células de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático e tecido conjuntivo. Foram calculados os percentuais de cada componente no intertúbulo ( $n^{\circ}$  de pontos contados sobre o elemento  $\times 100 / 1000$ ) e nos testículos ( $\% \text{ intertúbulo} \times \% \text{ do elemento no intertúbulo} / 100$ ). O volume que cada elemento ocupa no parênquima testicular foi obtido multiplicando-se o percentual deste elemento no testículo pelo peso líquido testicular, dividindo-se este valor por 100.

Para cada animal, 30 núcleos de células de Leydig foram medidos em seu diâmetro escolhendo-se os núcleos que apresentaram contorno circular, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes.

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

Para cálculo do número total de células de Leydig (TCL) dividiu-se o volume total dessas células por parênquima testicular ( $\mu\text{m}^3$ ) pelo volume de cada célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ ). Para a estimativa do número destas células por grama de testículo dividiu-se TCL pelo peso gonadal total.

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

fórmula:  $ILS = \text{volume total de célula de Leydig por parênquima testicular} / PC \times 100$ , onde PC = peso corporal.

#### 2.4. Dosagem de testosterona

A concentração plasmática de testosterona foi obtida pelo método de quimiluminescência, utilizando-se kit Access<sup>®</sup> Testosterone (Beckman, USA) sendo as leituras realizadas em Beckman Coulter – Access 2<sup>®</sup> (Beckman, USA). Os resultados foram expressos em ng/dL.

#### 2.5. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva, e as médias obtidas para a morfometria testicular entre as estações seca e chuvosa foram comparadas pelo Teste *t* de Student para amostras independentes (STATISTICA). Os resultados foram expressos em média ± desvio-padrão (DP).

### 3. Resultados

A Tabela 1 contém as médias para cada estação, referentes ao peso corporal e percentuais de túbulos seminíferos e intertúbulo, bem como quanto às proporções volumétricas dos componentes do intertúbulo, nos testículos de *Sturnira lilium*. Neste estudo, seu parênquima testicular apresentou-se composto por 85 % de túbulos seminíferos e 15 % de intertúbulo, considerando-se todas as estações do ano. O compartimento intertubular de *S. lilium* apresentou-se composto por células de Leydig, vasos sanguíneos, vasos ou espaços linfáticos e tecido conjuntivo (Fig. 1).

O intertúbulo de *S. lilium* assemelha-se àquele do Tipo III da classificação de Fawcett (Fig. 1). As células de Leydig, que predominaram no intertúbulo, apresentaram núcleo com formato usualmente arredondado e grande quantidade de gotículas lipídicas em seu citoplasma (Fig. 1c e Fig. 2b-d). Vasos sanguíneos foram o segundo elemento mais abundante, sendo o restante do intertúbulo representado por escassos espaços linfáticos e tecido conjuntivo, os quais, em conjunto, foram responsáveis por cerca de 8 % do intertúbulo (Fig. 1 e Fig. 2). Em algumas secções intertubulares observou-se tecido conjuntivo com aspecto edemaciado, com estreitos vasos linfáticos formando uma malha frouxa entre as células de Leydig ou próximo à túnica própria que delimita o

compartimento tubular. Esses vasos possuem paredes delgadas, além de apresentarem usualmente uma coloração mais escura sob microscopia de luz, o que os diferencia dos vasos sanguíneos (Fig. 1a-b e Fig. 2a-b). Adicionalmente, pode ser observada a presença de hemácias em alguns vasos sanguíneos. Fibroblastos também foram visualizados, bem como fibras colágenas próximas a eles (Fig. 1c e Fig. 2c). Assim como seus percentuais, o volume de cada compartimento testicular e o volume total de cada componente do intertúbulo no parênquima testicular não apresentaram variações significativas entre as estações seca e chuvosa (Tabela 1).

Tabela 1. Peso corporal, percentuais dos componentes do parênquima testicular e percentuais de células de Leydig, vasos sanguíneos, espaços linfáticos e tecido conjuntivo no intertúbulo, no testículo e seus volumes por parênquima testicular em *Sturnira lilium*. Média±DP.

Parâmetros	Estações do ano		
	Estação seca	Estação chuvosa	Média
Peso corporal (g)	22,58±1,22 <sup>a</sup>	24,08±1,93 <sup>a</sup>	23,33±1,74
Túbulos seminíferos (%)	85,38±5,4 <sup>a</sup>	84,64±9,75 <sup>a</sup>	85,01±7,60
Intertúbulo (%)	14,62±5,45 <sup>a</sup>	15,37±9,73 <sup>a</sup>	14,99±7,59
Volume dos túbulos seminíferos (mL)	0,04±0,01 <sup>a</sup>	0,06±0,04 <sup>a</sup>	0,05±0,03
Volume do intertúbulo (mL)	0,006±0,002 <sup>a</sup>	0,007±0,001 <sup>a</sup>	0,007±0,002
Percentual no intertúbulo (%)			
Célula de Leydig	84,17±6,37 <sup>a</sup>	82,21±9,37 <sup>a</sup>	83,19±7,76
Vaso sanguíneo	9,09±2,90 <sup>a</sup>	7,96±2,99 <sup>a</sup>	8,52±2,89
Espaço linfático	1,26±1,57 <sup>a</sup>	3,36±5,16 <sup>a</sup>	2,31±3,82
Tecido conjuntivo	5,49±2,90 <sup>a</sup>	6,47±3,65 <sup>a</sup>	5,98±3,21
Percentual no parênquima testicular (%)			
Célula de Leydig	12,56±5,23 <sup>a</sup>	13,28±9,04 <sup>a</sup>	12,92±7,11
Vaso sanguíneo	1,21±0,26 <sup>a</sup>	1,09±0,70 <sup>a</sup>	1,15±0,51
Espaço linfático	0,11±0,10 <sup>a</sup>	0,32±0,29 <sup>a</sup>	0,22±0,24
Tecido conjuntivo	0,73±0,33 <sup>a</sup>	0,80±0,46 <sup>a</sup>	0,76±0,39
Volume total por parênquima testicular (µL)			
Célula de Leydig	5,89±2,46 <sup>a</sup>	9,01±6,14 <sup>a</sup>	7,45±4,78
Vaso sanguíneo	0,57±0,12 <sup>a</sup>	0,74±0,48 <sup>a</sup>	0,65±0,35
Espaço linfático	0,05±0,05 <sup>a</sup>	0,21±0,20 <sup>a</sup>	0,13±0,16
Tecido conjuntivo	0,34±0,16 <sup>a</sup>	0,54±0,31 <sup>a</sup>	0,44±0,26

Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

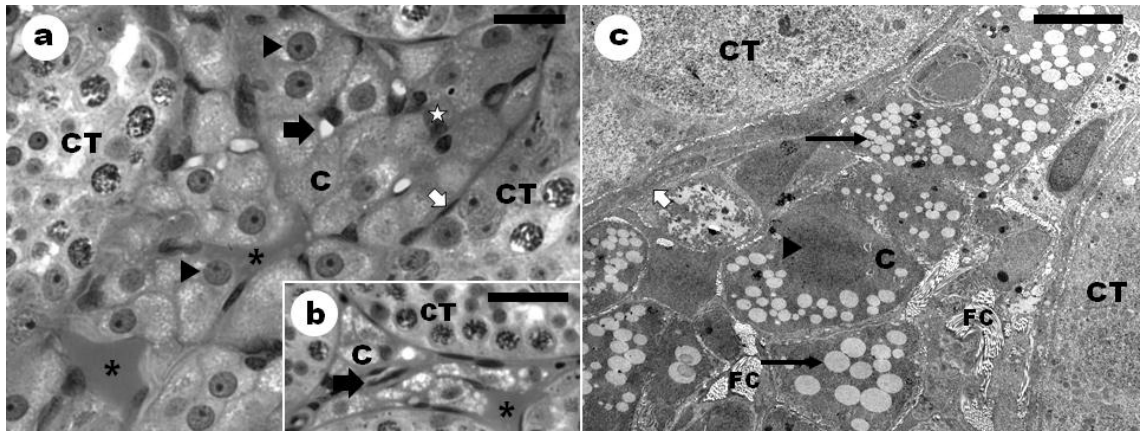


Figura 1: Compartimento intertubular do morcego *Sturnira lilium*. **a)** ►: Núcleo de célula de Leydig; C: Citoplasma de célula de Leydig; ►: Vaso sanguíneo; \*: Espaço linfático; ☆: Tecido conjuntivo; ⇨: Célula mióide na túnica própria; CT: Compartimento tubular. Microscopia de luz, barra 20  $\mu\text{m}$ . **b)** \*: Espaço linfático peritubular; ►: Vaso sanguíneo; C: Citoplasma de célula de Leydig; CT: Compartimento tubular. Microscopia de luz, barra 30  $\mu\text{m}$ . **c)** ►: Núcleo da célula de Leydig; C: Citoplasma da célula de Leydig; →: Gotículas lipídicas no citoplasma da célula de Leydig; FC: Fibras colágenas no tecido conjuntivo; ⇨: Célula mióide na túnica própria; CT: Compartimento tubular. Microscopia eletrônica de transmissão, barra 7  $\mu\text{m}$ .

As células de Leydig apresentaram variações no diâmetro nuclear (Tabela 2), sendo os valores encontrados na estação chuvosa maiores que aqueles observados na estação seca ( $p < 0,05$ ). Não houve variação significativa quanto aos percentuais de núcleo e citoplasma dessas células, porém os volumes nucleares e citoplasmáticos seguiram o encontrado para o diâmetro nuclear, com suas médias significativamente maiores na estação chuvosa em relação à estação seca. Conseqüentemente, o volume individual da célula de Leydig também se mostrou maior na estação chuvosa em relação à seca, embora seu volume total por parênquima testicular não tenha sofrido alterações, conforme apresentado anteriormente na Tabela 1. Do mesmo modo, o número total de células de Leydig, tanto por testículo quanto por grama de testículo, não apresentou variação entre as estações do ano. Assim, encontrou-se em média  $49,9 \times 10^5$  células de Leydig por testículo e  $11,30 \times 10^7$  células de Leydig por grama de testículo de *S. lilium*. O índice Leydigossomático médio foi de 0,03 %, sem variações significativas entre as estações.

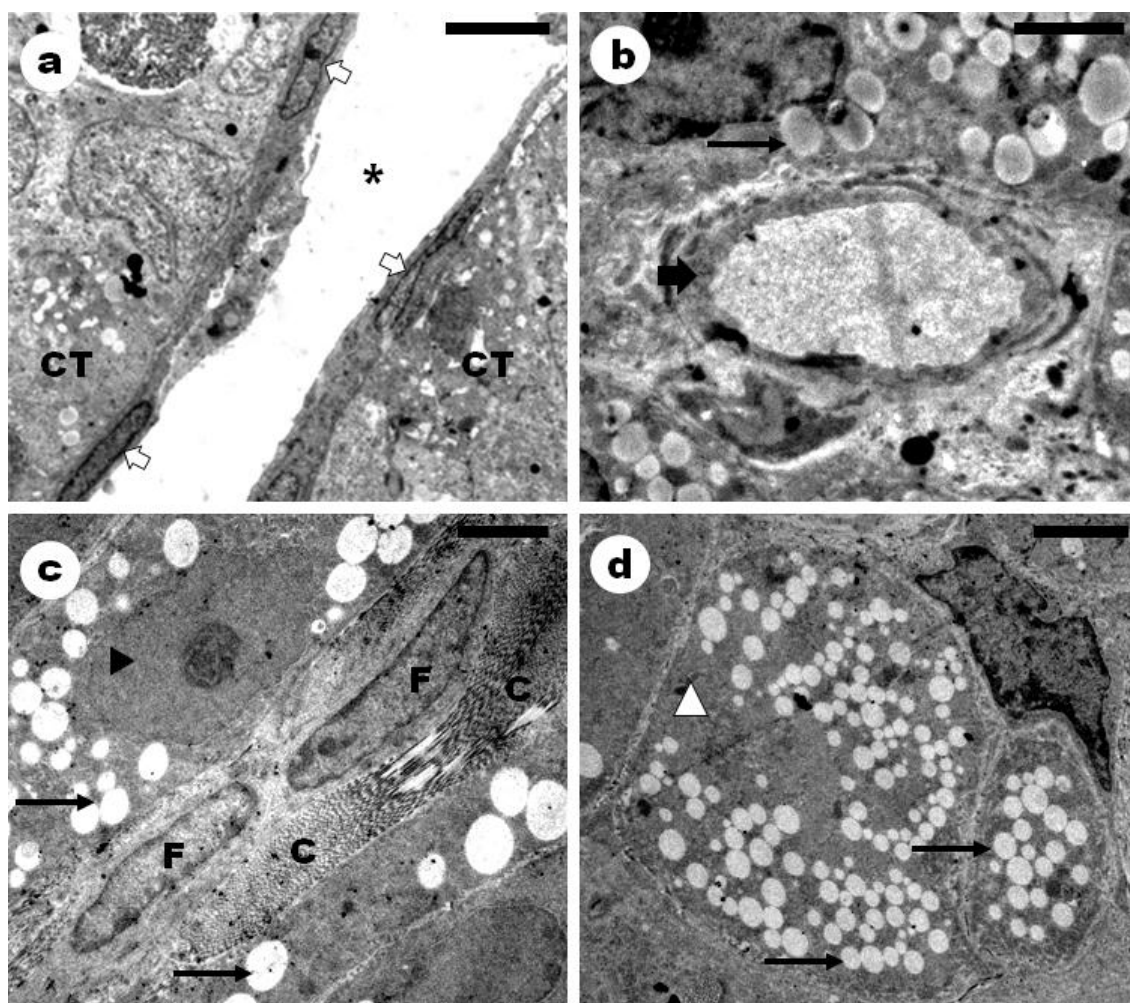


Figura 2: Ultraestrutura dos componentes do compartimento intertubular do morcego *Sturnira lilium*. **a)** \*: Espaço linfático; ⇨: Célula mióide na túnica própria; CT: compartimento tubular. Barra: 5  $\mu\text{m}$ . **b)** ➡: Vaso sanguíneo; →: Gotículas lipídicas no citoplasma da célula de Leydig. Barra: 2,5  $\mu\text{m}$ . **c)** ▶: Núcleo de célula de Leydig; →: Gotículas lipídicas no citoplasma da célula de Leydig; F: Núcleo de fibroblasto; C: Fibras colágenas no tecido conjuntivo intertubular. Barra: 2,5  $\mu\text{m}$ . **d)** Δ: Citoplasma de célula de Leydig; →: Gotículas lipídicas no citoplasma da célula de Leydig. Barra: 3  $\mu\text{m}$ .

A dosagem plasmática de testosterona não apresentou variações significativas ao longo do ano, variando de 7 a 62 ng/dL na estação seca e de 8 a 26 ng/dL na estação chuvosa (Tabela 2).

Tabela 2. Morfometria das células de Leydig, índice Leydigossomático e níveis de testosterona em *Sturnira lilium*. Média  $\pm$  DP.

Parâmetros	Estações do ano		
	Seca	Chuvosa	Média
Diâmetro nuclear ( $\mu\text{m}$ )	6,81 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>	7,62 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>	7,21 $\pm$ 0,62
Percentual do núcleo (%)	15,34 $\pm$ 3,77 <sup>a</sup>	13,30 $\pm$ 1,81 <sup>a</sup>	14,32 $\pm$ 3,03
Volume do núcleo ( $\mu\text{m}^3$ )	167,80 $\pm$ 36,55 <sup>b</sup>	233,44 $\pm$ 40,22 <sup>a</sup>	200,62 $\pm$ 50,23
Percentual do citoplasma (%)	84,66 $\pm$ 3,77 <sup>a</sup>	86,70 $\pm$ 1,81 <sup>a</sup>	85,68 $\pm$ 3,03
Volume do citoplasma ( $\mu\text{m}^3$ )	1004,44 $\pm$ 380,16 <sup>b</sup>	1549,03 $\pm$ 346,58 <sup>a</sup>	1276,73 $\pm$ 449,43
Volume individual da célula ( $\mu\text{m}^3$ )	1172,24 $\pm$ 413,03 <sup>b</sup>	1782,47 $\pm$ 375,30 <sup>a</sup>	1477,35 $\pm$ 493,96
Nº total de células de Leydig ( $\times 10^5$ )	53,29 $\pm$ 22,28 <sup>a</sup>	46,55 $\pm$ 25,02 <sup>a</sup>	49,92 $\pm$ 23,03
Nº de células de Leydig / g / testículo ( $\times 10^7$ )	11,99 $\pm$ 6,98 <sup>a</sup>	10,62 $\pm$ 9,04 <sup>a</sup>	11,30 $\pm$ 7,79
Índice Leydigossomático (%)	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,03 $\pm$ 0,02
Testosterona plasmática (ng/mL)	26,44 $\pm$ 21,18 <sup>a</sup>	15,33 $\pm$ 7,54 <sup>a</sup>	20,89 $\pm$ 7,85

Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

#### 4. Discussão

São escassos os trabalhos acerca da organização e quantificação dos componentes testiculares em morcegos, sobretudo acompanhando-se suas variações ao longo do ano. Esta quantificação, através da obtenção dos percentuais e da volumetria dos componentes testiculares, é fundamental para o conhecimento da atividade reprodutiva da espécie.

Funcionalmente, o testículo dos mamíferos é dividido em dois compartimentos: o tubular, responsável pela função espermatogênica e o intertubular, responsável pela função androgênica. O percentual representado pelo intertúbulo dentro do parênquima testicular apresenta variações entre espécies. O valor encontrado em *S. lilium* (média de 15 %) foi próximo ao encontrado em morcegos *Molossus molossus* (11 %, Morais, 2008) e *Artibeus lituratus* (10 %, Miranda, 2012) e também no cachorro do mato (12 %, Caldeira et al., 2010), estando porém bem abaixo dos 47 % reportados para a capivara (Paula et al., 2002).

O compartimento intertubular de *S. lilium* apresentou-se morfologicamente semelhante ao descrito para outros mamíferos, sendo constituído por células de Leydig, vasos sanguíneos, vasos ou espaços linfáticos e tecido conjuntivo. Segundo Fawcett et al. (1973), há três padrões gerais de organização do compartimento intertubular, baseado na abundância e disposição de seus elementos. A organização dos elementos do intertúbulo observada em *S. lilium*, com predomínio de células de Leydig em aspecto

epitelióide, escasso tecido conjuntivo, espaços linfáticos e vasos sanguíneos, se assemelha à categoria III de Fawcett, onde as células de Leydig representam de 20 a 60 % do intertúbulo, sendo este padrão encontrado em animais como o porco doméstico, gambá e rato-toupeira-pelado, dentre outros (Fawcett et al., 1973). Na espécie em estudo, essas células ocuparam mais de 80 % do intertúbulo, semelhante ao observado nos morcegos *M. molossus* (87 %, Morais, 2008) e *A. lituratus* (83 %, Miranda, 2012) e muito acima do observado no gato e na capivara, cujo percentual no intertúbulo variou de 6 a 30 % (França e Godinho, 2003; Costa et al., 2006).

O percentual dos demais componentes do intertúbulo, assim como seus volumes por parênquima testicular foram semelhantes ao observado em *M. molossus* (Morais, 2008), o qual também se assemelha à terceira categoria de classificação do compartimento intertubular descrita por Fawcett et al. (1973). Estes percentuais diferem do encontrado em felinos como a jaguatirica, que se enquadra na categoria II, onde o componente intertubular predominante é o tecido conjuntivo (Sarti et al., 2011), e na capivara, pertencente à categoria I, onde o componente intertubular predominante é o espaço linfático (Costa et al., 2006).

Quanto aos percentuais que os componentes intertubulares representam dentro do parênquima testicular, observou-se que as células de Leydig (13 %) e os espaços linfáticos (0,2 %) encontram-se dentro da média observada para animais como o gato doméstico, o javali e a capivara, além de outras espécies de morcegos. As variações registradas para o percentual de células de Leydig nestes animais foram de 6,0 a 31,1 %, e para o espaço linfático, de 0,2 a 2,5 % (França e Godinho, 2003; Almeida et al., 2006; Costa et al., 2006; Morais, 2008; Miranda, 2012). O percentual de vasos sanguíneos em *S. liliium* (1,1 %) foi semelhante ao encontrado em *A. lituratus* (1,0 %, Miranda, 2012), enquanto o percentual de tecido conjuntivo (0,7 %) esteve mais próximo ao observado em *M. molossus* (0,4 %, Morais, 2008) e bem abaixo do encontrado em outras ordens de mamíferos, onde a média registrada para o tecido conjuntivo varia de 3 a 7 % (França e Godinho, 2003; Almeida et al., 2006; Costa et al., 2006).

A presença de gotículas lipídicas dispersas pelo citoplasma das células de Leydig foi também observada na onça e em outras espécies de morcegos (Ohata, 1979; Morais, 2008; Azevedo et al., 2008) e constitui fonte de precursores para a biossíntese de andrógenos (Russell, 1996), já que estas células são responsáveis pela função endócrina testicular (Ye et al., 2011). Sabe-se que as células de Leydig podem apresentar características diferenciadas em morcegos hibernantes, sofrendo hipertrofia, acumulando gotículas lipídicas e aumentando as membranas do retículo endoplasmático

em seu citoplasma durante a estação de acasalamento, contrastando com a regressão destas células, com diminuição das estruturas citoplasmáticas e aumento de grânulos de lipofucsina no período de hibernação (Loh e Gemmell, 1980; Gustafson, 1987).

A grande variação observada quanto ao percentual de células de Leydig no intertúbulo e nos testículos de diferentes espécies de mamíferos, assim como quanto ao percentual do compartimento intertubular, pode estar relacionado, dentre outros fatores, ao sistema de acasalamento apresentado pelo animal (Kenagy e Trombulak, 1986). Assim, é coerente que animais de comportamento poligínico, como a capivara e o morcego (Paula et al., 2002; Morais, 2008), apresentem maior investimento androgênico quando comparados a espécies monogâmicas, como o cachorro do mato e o veado-catingueiro (Caldeira et al., 2010; Costa et al., 2011). Esta característica reflete na formação de pares ou de haréns, estes observados em morcegos e capivara, que apresentam uma organização com hierarquia social composta por um macho dominante que poderá copular com várias fêmeas. Assim, esses animais necessitam de alta concentração de testosterona para manutenção da libido e assegurar a defesa do harém (Paula et al., 2002).

Foi demonstrado em coelhos que os níveis plasmáticos de testosterona estiveram altamente correlacionados com o percentual e volume nuclear de células de Leydig, bem como quanto ao seu número por testículo e por grama de testículo (Castro et al., 2002). Em capivaras, os níveis de testosterona apresentaram alta correlação com o volume individual dessas células (Costa e Paula, 2006). Assim, os maiores valores observados para o diâmetro nuclear e para os volumes nuclear e citoplasmático, bem como para o volume individual da célula de Leydig na estação chuvosa em relação à estação seca, poderiam estar relacionados ao maior investimento androgênico nos meses chuvosos. No entanto, a dosagem de testosterona em *S. liliium* não revelou diferenças significativas entre as estações, observando-se o mesmo para o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo. De fato, segundo Ewing et al. (1979), as variações na secreção de testosterona resultam mais da capacidade individual das células de Leydig em secretar testosterona do que de diferenças do volume total das mesmas no testículo. Esta capacidade, por sua vez, está altamente associada com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente no citoplasma da célula de Leydig (Zirkin et al., 1980).

Observou-se no morcego *Pteropus poliocephalus* que a concentração de testosterona foi significativamente maior dentro da estação de acasalamento em relação ao período de recrudescência testicular. Seus níveis, porém não variaram à medida que

o ciclo reprodutivo progrediu (McGuckin e Blackshaw, 1991). Como *S. liliium* não apresenta um período de regressão testicular, como ocorre em outras espécies (Loh e Gemmell, 1980; Gustafson, 1987; McGuckin e Blackshaw, 1991), é coerente que a concentração plasmática de testosterona permaneça constante ao longo do ano.

O grande desvio padrão observado nos níveis plasmáticos de testosterona pode estar relacionado à secreção pulsátil desse hormônio (Moreira et al., 1981). Adicionalmente, esta característica poderia ser normal entre animais que vivem em sistemas de haréns, como é o caso de *S. liliium*. Isto possivelmente ocorre porque existem machos dominantes, que têm preferência à cópula em relação aos machos subordinados, conforme descrito por McCracken e Wilkinson (2000). Portanto, diferentes níveis de produção de testosterona podem ser esperados entre estes animais, que ocupam diferentes posições na hierarquia do grupo.

Uma vez que o número de células de Leydig por testículo pode apresentar grandes variações interespecíficas, devido às diferenças encontradas para o tamanho testicular, é calculado o número destas células por grama de testículo, o que permite comparações entre diferentes espécies. O número de células de Leydig por grama de testículo encontrado em *S. liliium* (média de  $11 \times 10^7$  células) esteve acima da média observada para outros animais, como o cavalo (França e Russell, 1998), javali (Almeida et al., 2006) e morcego (Morais, 2008), onde a média varia de  $18 \times 10^6$  a  $157 \times 10^6$  células. Em *S. liliium*, o volume dessas células, cuja média foi de  $1.477 \mu\text{m}^3$ , permaneceu dentro da ampla faixa de  $356$  a  $2.578 \mu\text{m}^3$ , previamente registrada para outros animais (França e Russell, 1998; França e Godinho, 2003; Barros, 2005; Costa e Paula, 2006; Azevedo et al., 2008; Morais, 2008; Sarti et al., 2011).

O índice Leydigossomático é calculado para quantificar o investimento em células de Leydig com relação à sua massa corporal (Costa et al., 2006). Em *S. liliium* este índice (média de 0,03%) foi semelhante ao observado em outras espécies de morcego (0,04 % em *M. molossus*, Morais, 2008 e 0,03 % em *A. lituratus*, Miranda, 2012) e na capivara (0,03 %, Costa et al., 2006). Por outro lado, em animais solitários como a jaguatirica, onde machos e fêmeas unem-se apenas na época reprodutiva (Emmons e Ferr, 1990), este índice é usualmente mais baixo (0,003 %, Sarti et al., 2011).

Os valores relativos à morfometria do compartimento intertubular e à concentração plasmática de testosterona em *S. liliium* indicam que esta espécie apresenta padrão reprodutivo contínuo, na referida área de estudo. Este padrão foi também reportado para a mesma espécie por Pulchério-Leite (2008), com base em observações de características externas dos animais, como a presença de testículos escrotados,

fêmeas gestantes e/ou lactantes, estros recorrentes, ocorrência de filhotes em diferentes períodos do ano além de histologia das gônadas e epidídimo, sugerindo poliestria contínua para essa espécie. De modo semelhante, Barros (2011) não detectou grandes flutuações nas reservas energéticas desta espécie ao longo do ano, o que indicaria a ocorrência de eventos reprodutivos durante todo o ano, já que a disponibilidade de alimentos e a existência de reservas energéticas estão entre os fatores mais importantes para desencadeamento do ciclo reprodutivo nos animais (Kunz et al., 1998; Srivastava e Krishna, 2008).

Conclui-se que *S. lilium* apresenta grande investimento em tecido intertubular, sobretudo em células de Leydig, não apresentando variações histomorfométricas sazonais na maioria dos componentes do intertúbulo. A testosterona se manteve constante em todo o período contribuindo, deste modo, para um ciclo reprodutivo e androgênico contínuo em animais capturados no sudeste do Brasil.

### **Agradecimentos**

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida.

### **Referências Bibliográficas**

Almeida, F.F.L.; Leal, M.C.; França, L.R. 2006. Testis morphometry, duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa*). Biol Reprod. 75(5):792-799.

Azevedo, M.H.F.; Paula, T.A.R.; Balarini, M.K.; Matta, S.L.P.; Peixoto, J.V.; Guião-Leite, F.L.; Rossi Jr, J.; Costa, E.P. 2008. Organization and quantification of the elements in the intertubular space in the adult jaguar testis (*Panthera onca*). Micron. 39(8):1166-1170.

Azevedo, M.H.; Paula, T.A.; Matta, S.L.; Fonseca, C.C.; Costa, E.P.; Costa, D.S.; Peixoto, J.V. 2010. Cell population indexes of spermatogenic yield and testicular sperm reserves in adult jaguars (*Panthera onca*). Anim Reprod Sci. 118(1):83-88.

Barros, J.B.G. 2005. Análise morfofuncional do testículo e da espermatogênese de leões africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos. Viçosa: UFV, 77 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa.

- Barros, M.S. 2011. Efeitos da sazonalidade sobre o metabolismo energético do morcego frugívoro *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae) em fragmento de Mata Atlântica. Viçosa: UFV, 70 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade Federal de Viçosa.
- Bernardi, I.P. 2011. Estrutura de comunidade, reprodução e distribuição temporal das capturas de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em relictos de Floresta Estacional Decidual no sul do Brasil. Curitiba: UFPR, 116 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação), Universidade Federal do Paraná.
- Bronson, F.H. 1985. Mammalian reproduction: an ecological perspective. *Biol Reprod.* 32(1):1-26.
- Caldeira, B.C.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Balarini, M.K.; Campos, P.K.A. 2010. Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766) adulto. *Revista CERES* 57(5):569-575.
- Castro, A.C.S.; Berndtson, W.E.; Cardoso, F.M. 2002. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency in rabbits. *Braz J Med Biol Res.* 35(4):493-498.
- Cole, F.R.; Wilson, D.E. 2006. Mammalian diversity and natural history. In: Wilson, D.E.; Cole, F.R.; Nichols, J.D.; Rudran, R.; Foster, M.S. (Eds.), *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Mammals*. Washington: Smithsonian Institution Press, pp. 9-39.
- Costa, D.S.; Paula, T.A.R. 2006. Testosterone level, nasal gland volume and Leydig cell morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Arq Bras Med Vet Zootec.* 58(6):1086-1091.
- Costa, D.S.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P. 2006. The intertubular compartment morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. *Anim Reprod Sci.* 91(1-2):173-179.
- 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.L.M.C. 2011. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Anim Reprod Sci.* 127(3-4):202-212.

- Crichton, E.G.; Krutzsch, P.H. 2000. Reproductive biology of bats. In: Racey, P.A.; Entwistle, A.C. (Eds.), Life-history and reproductive strategies of bats. London: Academic Press, pp. 364-367.
- Emmons, L.L.; Ferr, F. 1990. Neotropical rainforest mammals. A field guide. Chicago: The University of Chicago Press, pp. 151-152.
- Ewing, L.L.; Zirkin, B.R.; Cochran, R.C.; Kromann, N.; Peters, C.; Ruiz-Bravo, N. 1979. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro, correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology*. 105(5):1135-1142.
- Fawcett, D.W.; Neaves, W.B.; Flores, M.N. 1973. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod*. 9(5):500-532.
- França, L.R.; Godinho, C.L. 2003. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod*. 68(5):1554-1561.
- França, L.R.; Russell, L.D. 1998. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia, F.; Regadera, J. (Eds.), *Male Reproduction: A Multidisciplinary Overview*. Madrid: Churchill Livingstone, pp.197-219.
- Golfari, L. 1975. Zoneamento ecológico do Estado de Minas Gerais para reflorestamento. Belo Horizonte: PRODEPEF/PNUD/FAO/IBDF/Bra-45. Série técnica 3. 65 p.
- Gustafson, A.W. 1987. Changes in Leydig cell activity during the annual testicular cycle of the bat *Myotis lucifugus lucifugus*: histology and lipid histochemistry. *Am J Anat*. 178(4):312-325.
- Johnson, L.; Petty, C.S.; Neves, W.B. 1981. A new approach to qualification of spermatogenesis and its applications to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biol Reprod*. 25(1):217-226.
- Kaku-Oliveira, N.Y.; Munster, L.C.; Rubio, M.B.G.; Passos, F.C. 2010. Reprodução em cinco espécies de morcegos filostomídeos na Reserva Natural do Salto Morato, Guaraqueçaba, Paraná. *Chiroptera Neotropical Anais V EBEQ Suppl*.16(1):22-24.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol*. 27:137.

- Kenagy, G.J.; Trombulak, S.C. 1986. Size and function of mammalian testis in relation to body size. *J Mammal.* 67(1):1-22.
- Kunz, T.H.; Anthony, E.L.P. 1982. Age estimation and post-natal growth in the bat *Myotis lucifugus*. *J Mammal.* 63(1):23-32.
- Kunz, T.H.; Wrazen, J.A.; Burnett, C.D. 1998. Alterações na massa corporal e nas reservas de gordura na pré-hibernação do pequeno morcego marrom (*Myotis lucifugus*). *Ecoscience.* 5(1):8-17.
- Loh, H.S.F.; Gemmell, R.T. 1980. Changes in the fine structure of the testicular Leydic cells of the seasonally-breeding bat, *Myotis adversus*. *Cell Tissue Res.* 210(2):339-347.
- Marinho-Filho, J.; Vasconcellos-Neto, J. 1994. Dispersão de sementes de *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers. (Guttiferae) por morcegos na região de Manaus, Amazonas. *Acta Bot Bras.* 8(1):87-96.
- McCracken, G.F.; Wilkinson, G.S. 2000. Bat Mating Systems. In: Crichton, E.G.; Krutzsch, P.H. (Eds.), *Reproductive biology of bats*. London: Academic Press, pp. 321-362.
- McGuckin, M.A.; Blackshaw, A.W. 1991. Mating-associated peak in plasma testosterone concentration in wild male grey-headed flying foxes (*Pteropus poliocephalus*). *J Reprod Fertil.* 92(2):347-52.
- Mello, M.A.R.; Kalko, E.K.V.; Silva, W.R. 2008. Movements of the bat *Sturnira lilium* and its role as a seed disperser of Solanacea in the Brazilian Atlantic forest. *J Trop Ecol.* 24:225-228.
- Mello, M.A.R.; Kalko, E.K.V.; Silva, W.R. 2009. Ambient temperature is more important than food availability in explaining reproductive timing of the bat *Sturnira lilium* (Mammalia: Chiroptera) in a montane atlantic forest. *Can J Zool.* 87:239-245.
- Mikich, S. B. 2002. A dieta dos morcegos frugívoros (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae) de um pequeno remanescente de Floresta Estacional Semidecidual do Sul do Brasil. *Rev Bras Zool.* 19(1):239-249.
- Mikich, S.B.; Bianconi, G.V. 2005. Potencializando o papel dos morcegos frugívoros na recuperação de áreas degradadas. *Boletim de Pesquisa Fl., Colombo.* 51:155-164.
- Miranda, D.C. 2012. Efeito dos fungicidas Mancozeb e Tebuconazol sobre parâmetros testiculares do morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). Viçosa: UFV, 51 p.

Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Federal de Viçosa.

Morais, D.B. 2008. Morfologia e morfometria testicular em morcego insetívoro (*Molossus molossus*, Pallas, 1776 Chiroptera: Molossidae). Viçosa: UFV, 74 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Federal de Viçosa.

Moreira, A.C; Antunes Rodrigues, J; Foss, M.C; Yazigi, N; Verissimo, J.M. 1981. Título: Secreção basal pulsátil de hormônio luteinizante e de testosterona no homem adulto normal. Arq Bras Endocrinol Metab. 25(1):1-7.

Ohata, M. 1979. Electron microscope study on the bat testicular interstitial cell with special reference to the cytoplasmic crystalloid. Arch Histol Jpn. 42(2):103-118.

Paula, T.A.R.; Costa, D.S.; Matta, S.L.P. 2002. Avaliação histológica quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. Biosci J. 18(1):121-136.

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

Reis, N.R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A.; Lima, I.P. 2007. Morcegos do Brasil. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina, 256 p.

Pulchério-Leite, A. 2008. Uso do espaço por *Artibeus lituratus* e *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae) em fragmentos florestais urbanos de Curitiba, Paraná. Curitiba: UFPR, 113 p. Tese (Doutorado em Zoologia), Universidade Federal do Paraná.

Russell, L.D. 1996. Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A.H.; Hardy, M.P.; Russell, L.D. (Eds), The Leydig cell. Vienna: Cache River, pp.218-222.

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

Sánchez-Hernández, C.; Osorio, M.T.C.; Tapia, C.B.C. 1986. Patron reproductivo de *Sturnira lilium parvidens* (Chiroptera: Phyllostomidae) en la costa central del pacifico de México. Southwest Nat. 31(3):331-340.

- Sarti, P.; Paula, T.A.R.; Polli, G.O.; Deco Souza, T.; Araujo, G.R. 2011. Morfofisiologia do tecido intertubular e das células de Leydig de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) adulta. Arq Bras Med Vet Zootec. 63(5):1060-1065.
- Sazima, M.; Buzato, S.; Sazima, I. 2003. *Dyssochroma viridiflorum* (Solanaceae): a reproductively bat-dependent epiphyte from the Atlantic rainforest in Brazil. Ann Bot. 92(5):725-730.
- Setchell, B.P. 1991. Male reproductive organs and semen. In: Cupps, P.T. (Ed.), Reproduction in domestic animals. New York: Academic Press, pp. 221-249.
- Srivastava R.K.; Krishna, A. 2008. Seasonal adiposity, correlative changes in metabolic factors and unique reproductive activity in a vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. J Exp Zool A Ecol Genet Physiol. 309(2): 94-110.
- Taddei, V.A. 1976. The reproduction of some Phyllostomidae (Chiroptera) from the northwestern region of the state of São Paulo. Bol Zool Univ São Paulo. 1:313-330.
- Vieira, M.F.; Carvalho-Okano, R.M. 1996. Pollination biology of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) in Southeastern Brazil. Biotropica. 28(1):61-68.
- Wilson, D.E. 1979. Reproductive patterns. In: Baker, R. J.; Jones, J. R.; Carter, D.C. (Eds.), Biology of bats of the new world: Family Phyllostomidae. Part III. Special Publication of the Museum Texas Tech University, pp. 317-318.
- Ye, L.; Su, Z.J.; Ge, R.S. 2011. Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes. Molecules. 16(12):9983-10001.
- Zirkin, B.R.; Ewing, L.L.; Kromann, N. 1980. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. Endocrinology. 107(6):1867-1874.

## Conclusões Gerais

Conclui-se que o morcego *Sturnira lilium* apresenta:

- Organização geral do parênquima testicular semelhante ao descrito para os demais mamíferos não-primatas;
- Um dos maiores comprimentos de túbulos seminíferos e produção espermática diária já registrados;
- Maiores valores para a reserva espermática testicular e produção espermática diária durante a estação chuvosa;
- Elevado rendimento geral da espermatogênese e grande número de células de Sertoli, com baixa capacidade suporte por parte destas células;
- Estádios que compõem o ciclo do epitélio seminífero semelhante ao descrito para os demais mamíferos, segundo o método da morfologia tubular;
- Ciclo espermatogênico de menor duração entre os mamíferos;
- Grande investimento androgênico com maior percentual do intertúbulo ocupado pelas células de Leydig, estando coerente com o sistema de haréns, comum nesta espécie;
- Dosagem hormonal de testosterona constante ao longo do ano;
- Padrão reprodutivo contínuo ao longo das estações seca e chuvosa no sudeste do Brasil.