

MATEUS RODRIGUES BEGUELINI

**ESTUDO DA ESPERMATOGÊNESE E
NUCLEOLOGÊNESE DE MORCEGOS**

**Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre
em Genética.**

MATEUS RODRIGUES BEGUELINI

**ESTUDO DA ESPERMATOGÊNESE E
NUCLEOLOGÊNESE DE MORCEGOS**

Orientadora: Prof^a Dr^a. Eliana Morielle Versute

**Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre
em Genética.**

Beguelini, Mateus Rodrigues.

Estudo da espermatogênese e nucleogênese de morcegos / Mateus Rodrigues Beguelini. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2008.
141 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eliana Morielle-Versute

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Morcego - Reprodução. 2. Espermatogênese. 3. Nucleogênese.
4. FISH - Técnica. 6. Chiroptera. I. Morielle-Versute, Eliana. II.
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 599.4

MATEUS RODRIGUES BEGUELINI

**ESTUDO DA ESPERMATOGÊNESE E
NUCLEOLOGÊNESE DE MORCEGOS**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Prof^a Dr^a Eliana Morielle Versute

2^o Examinador: Prof^a Dr^a Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

3^o Examinador: Prof^a Dr^a Mary Massumi Itoyama

São José do Rio Preto, 26/ 02 / 2008.

Dedicatória

*Aos meus pais, Augusto Beguelini e Ercília Rodrigues Beguelini, por
todo o sacrifício, renúncia, amor e compreensão que me dispuseram ao
longo dessa longa jornada.*

Meu caráter e tudo que conquistei devo a vocês!

Agradecimento Especial

*À Professora Doutora Eliana Morielle Versute pela paciência,
compreensão e confiança em mim depositada, além de todo o
conhecimento a mim transmitido e, acima de tudo, pelo convívio e
amizade.*

Sincera Gratidão, Admiração e Respeito!

*"Na vida ,nem sempre
encontramos o caminho
certo, no entanto, sempre
existem pessoas iluminadas
que nos auxiliam a trilha-los
da melhor forma possível"*

*"Só sei, que nada sei
E que nunca saberei
Tudo que um dia
Quiseram-me fazer saber"*

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que me auxiliaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho, em especial:

A todos os meus familiares pela força e incentivo que sempre me deram, em especial meus tios Mário e Joana, meu primo Caíque, meu afilhado Gabriel e meus sobrinhos Vitória e Mikael, amo muito vocês;

Aos meus amigos e companheiros que tanto me auxiliaram nessa jornada;

A meus companheiros de laboratório, Bruno, Fábio, Karina, Paula, Maurício, Mário e Sandra, que muito me ajudaram durante esse trabalho;

A minha co-orientada Lidiani, a quem admiro pela determinação e força de vontade;

Aos funcionários dos Departamentos de Biologia e Zoologia e Botânica, em especial aos técnicos Jorge, Rosana e Luiz;

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, em especial a Rosemar;

A CAPES e a FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido;

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga e as Profa Dra Sonia Maria Oliani e Profa Dra Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira pela disponibilização de seus laboratórios e equipamentos

A todos, Muito obrigado!

"Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história.

PEDRAS NO CAMINHO? GUARDO TODAS, UM DIA VOU CONSTRUIR UM CASTELO..."

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO.....	9
	1. A Ordem Chiroptera.....	9
	2. Espermatogênese: Aspectos Gerais.....	14
	3. Nucleologênese.....	18
II.	OBJETIVOS.....	23
III.	ARTIGO 1: Testicular morphology and the seminiferous epithelium cycle in six species of Brazilian bats.....	25
	Resumo.....	26
	Abstract.....	27
	Introduction.....	28
	Materials and Methods.....	30
	Results.....	31
	Discussion.....	40
	Acknowledgements.....	47
	References.....	47
	Figure Legends.....	55
	Figures.....	59
	Tables.....	67
IV.	ARTIGO 2: Variação na morfologia, arranjo das estruturas e expressão nucleolar das células de Sertoli em espécies de morcegos.....	69
	Resumo.....	70
	Introdução.....	70
	Material e Métodos.....	73
	Resultados.....	74
	Discussão.....	77
	Referências Bibliográficas.....	82

	Legenda das Figuras.....	86
	Figuras.....	87
	Tabela.....	91
V.	ARTIGO 3: Comportamento do nucléolo e das regiões organizadoras nucleolares (RONs) durante a divisão meiótica em espécies de morcegos.	92
	Resumo.....	93
	Introdução.....	93
	Material e Métodos.....	96
	Resultados.....	97
	Discussão.....	102
	Referências Bibliográficas.....	108
	Legenda das Figuras.....	112
	Figuras.....	115
VI.	DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	124
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
VIII.	RESUMO.....	135
IX.	ABSTRACT	139

III. INTRODUÇÃO

1. A Ordem Chiroptera

A ordem Chiroptera constitui a segunda maior ordem de mamíferos, apresentando cerca de 199 gêneros e 1113 espécies amplamente distribuídas, ocorrendo em regiões tropicais e temperadas, com exceção de algumas ilhas oceânicas remotas e a Antártica (Reis et al., 2006). Está classicamente dividida em duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera. A primeira é encontrada exclusivamente no Velho Mundo e compreende uma única família (Pteropodidae) com 42 gêneros e 185 espécies, enquanto que a segunda está amplamente distribuída por todo o globo, envolvendo 17 famílias, 157 gêneros e 928 espécies (Simmons, 2005).

A subordem Megachiroptera apresenta as maiores formas de morcegos, conhecidas como “raposas voadoras”, com algumas espécies dos gêneros *Pteropus* e *Acerodon* apresentando envergadura de 1,7 metros. De forma geral, apresentam o segundo dedo provido de unha, olhos grandes e bem desenvolvidos, não possuem sistema de ecolocalização e são, na sua grande maioria, frugívoros (Nowak, 1999).

Os morcegos da subordem Microchiroptera são cosmopolitas, apresentam a extraordinária capacidade de ecolocalização, ampla variação de hábitos alimentares, sendo utilizados como alimentos insetos, outros artrópodes, frutos, sementes, folhas, flores, néctar, pequenos vertebrados e sangue e possuem o segundo dedo desprovido de unha (Reis et al., 2006).

No Brasil são encontrados cerca de 64 gêneros e 165 espécies de morcegos, pertencentes a nove famílias: Emballonuridae (7 gêneros e 15 espécies), Furipteridae (1 gênero e 1 espécie), Molossidae (7 gêneros e 24 espécies), Mormoopidae (1 gênero e 4

espécies), Natalidae (1 gênero e 1 espécie), Noctilionidae (1 gênero e 2 espécies), Phyllostomidae (40 gêneros e 92 espécies), Thyropteridae (1 gênero e 4 espécies) e Vespertilionidae (5 gêneros e 22 espécies). Dessas, Furipteridae, Mormoopidae, Natalidae, Noctilionidae, Phyllostomidae e Thyropteridae ocorrem exclusivamente nas Américas (Reis et al., 2006).

Os morcegos são os únicos mamíferos que apresentam voo ativo, devido à transformação dos seus membros superiores em asas e, em decorrência dessa capacidade e da grande variedade de hábitos alimentares, são importantes no controle populacional de insetos e na polinização e dispersão de sementes, sendo um dos principais agentes na regeneração de *habitats* fragmentados.

Embora os morcegos sejam extraordinariamente bem sucedidos, eles permanecem como um dos grupos menos conhecidos em relação a alguns aspectos, como os evolutivos e reprodutivos.

A ordem Chiroptera tem sido extensivamente questionada sobre sua origem e evolução. A hipótese monofilética pressupõe que Megachiroptera e Microchiroptera são subordens proximamente relacionadas (isto é, formam um clado), e que suas características compartilhadas, incluindo a habilidade de voar, estariam presentes em seu ancestral comum mais recente (Simmons, 1994, 1995). Dessa forma, haveria somente uma origem do voo ativo em mamíferos. Em contraste, a hipótese difilética indica que os megaquirópteros e os microquirópteros não formam um grupo monofilético, tendo evoluído independentemente de dois diferentes grupos de mamíferos não voadores. Sugeriu-se que Megachiroptera está mais proximamente relacionado a Dermoptera e a Primata do que a Microchiroptera (Smith & Madkour, 1980; Pettigrew & Jamieson, 1987; Pettigrew et al., 1989; Pettigrew, 1995). Neste caso, as características comuns a ambos os grupos teriam evoluído em consequência

de evolução convergente ou são simplesmente o resultado da retenção de características primitivas. Se os morcegos são difiléticos, a habilidade de voar deve ter evoluído independentemente em Megachiroptera e em Microchiroptera.

Devido a grande maioria dos dados disponíveis suportarem um relacionamento de grupos-irmãos entre Megachiroptera e Microchiroptera, a hipótese monofilética de Chiroptera é agora considerada como a hipótese mais fortemente suportada (Simmons & Conway, 2003).

Dentro de Microchiroptera encontramos um consenso na hipótese de que a maioria deles tenham se originado no Velho Mundo, a partir de onde radiaram-se adaptativamente para outras regiões do mundo, inclusive a América. Esta hipótese é suportada pela presença de representantes das famílias Emballonuridae, Rhinolophidae, Megadermatidae, Vespertilionidae e Molossidae em sítios arqueológicos da Europa datados do Terciário Médio (Smith, 1976).

Smith (1976) sugere que a maioria das famílias de Microchiroptera originou-se, aparentemente, da radiação adaptativa dos embalonurídeos, rinolofídeos e vespertilionídeos.

Sugere-se que os embalonurídeos teriam chegado primeiro aos trópicos do Novo Mundo, sendo um possível ancestral dos noctilionídeos, mormoopídeos e filostomídeos do Novo Mundo, sendo seguidos pelos vespertilionídeos, que seriam, aparentemente, o estoque de onde derivaram as famílias Natalidae, Thyropteridae e Furipteridae (Smith, 1976). No entanto, esse mesmo autor não descarta a hipótese de que os Chiroptera ancestrais, datados do Eoceno, foram à fonte a partir da qual várias linhagens de Microchiroptera radiaram-se adaptativamente.

Vespertilionidae é a maior família de Chiroptera, representando um terço das espécies atuais de morcegos (Koopman, 1993), é verdadeiramente cosmopolita, ocorrendo em todos os continentes, com algumas espécies atingindo regiões temperadas frias e ilhas oceânicas, tais como Bermudas, Galápagos e Hawai (Koopman, 1970).

Os vespertilionídeos possuem olhos pequenos, nenhum apêndice nasal (rudimentar em *Nyctophilus* e em *Pharotis*), suas caudas são relativamente longas e estão contidas em toda a extensão da membrana interfemural. Esta grande família inclui uma larga escala de tamanhos. Alguns morcegos pesam somente 4 gramas, visto que outros pesam até 50 gramas.

Cinco subfamílias são geralmente propostas para Vespertilionidae: Vespertilioninae, Myotinae, Miniopterinae, Murinae e Kerivoulinae (Volleth & Heller, 1994; Simmons, 1998; Simmons & Geisler, 1998). Dessas, as três últimas são claramente monofiléticas (Simmons, 1998).

A família Phyllostomidae é a mais diversificada da região neotropical, contando atualmente com cerca de 160 espécies divididas em 57 gêneros. Trata-se de um clado endêmico do Novo Mundo, com registros que estendem-se do sudoeste dos Estados Unidos da América até o norte da Argentina (Reis et al., 2006). É, dentre todas as famílias de mamíferos, a mais diversificada em termos de estratégias alimentares (insetívoros, onívoros, frugívoros, carnívoros, nectarívoros e hematófagos). A principal característica morfológica do grupo é o apêndice nasal em forma de folha, presente na maioria das espécies, mas modificado em forma de ferradura nas espécies hematófagas.

A origem monofilética dessa família é suportada pela congruência de dados morfológicos, citogenéticos, bioquímicos e moleculares (Baker et al., 1989; Simmons & Geisler, 1998; Jones et al., 2002). No entanto, as relações filogenéticas dentro do grupo

têm sido alvo de intenso debate, principalmente em relação ao reconhecimento de subfamílias e tribos. Jones e Carter (1976) reconheceram seis subfamílias: Desmodontinae, Phyllostominae, Glossophaginae, Carrollinae, Sternodermatinae e Phyllonycterinae. Já Wetterer e colaboradores (2000) analisando tanto dados morfológicos quanto sítios de restrição e cromossomos sexuais, subdividiram a família em sete subfamílias, reconhecendo mais uma subfamília, a Brachyphyllinae. Cabe destacar ainda que Baker e colaboradores (2003), com base em dados moleculares propuseram uma nova classificação com 11 subfamílias reconhecidas (Macrotinae, Micronycterinae, Desmodontinae, Lonchorhininae, Phyllostominae, Glossophaginae, Lonchophyllinae, Carrollinae, Glyphonycterinae, Rhinophyllinae e Sternodermatinae).

Aparentemente, a grande irradiação adaptativa dos filostomídeos foi uma resposta a exploração de diferentes tipos de alimentos e habitats presentes no Novo Mundo (Smith, 1976).

Por sua ampla distribuição geográfica, os morcegos sofrem considerável influência dos fatores abióticos sobre suas estratégias reprodutivas, incluindo processos de degeneração do epitélio seminífero e alterações anuais no ciclo do epitélio seminífero. Espécies que ocorrem em altas latitudes tendem a possuir um padrão monoéstrico de reprodução intimamente associado à temperatura, entretanto, em espécies tropicais, os ciclos reprodutivos estão fortemente associados com a estação chuvosa. Estes fatores climáticos (temperatura e pluviosidade) combinados com a viabilidade do suplemento alimentar influenciam diretamente nos ciclos reprodutivos dos quirópteros tropicais, proporcionando diferentes possibilidades de ciclos reprodutivos, desde padrões monoéstricos e poliéstricos bimodais, até espécies que se reproduzem ao longo de todo o ano (Fleming et al., 1972; Taddei, 1976). Isso demonstra que as estratégias reprodutivas,

em Chiroptera, são amplamente complexas e diversas, variando dependendo da latitude e do hábitat que os morcegos habitam, variando dentro da mesma família, gênero ou mesmo dentro de uma mesma espécie (Bradbury & Vehrencamp, 1977; Taddei, 1980).

A complexidade na taxonomia e em aspectos biológicos variados como alimentação, comportamento, fisiologia e reprodução fazem de Chiroptera um grupo alvo de muitas especulações. Os relacionamentos evolutivos de muitos táxons ainda não foram investigados em detalhe e com alta representatividade, assim como são poucos os estudos relacionados à reprodução. Isso demonstra que a análise em conjunto de diferentes aspectos (morfológicos, citogenéticos, ecológicos, moleculares e bioquímicos) possibilitaria a obtenção de respostas mais robustas para essas incongruências filogenéticas.

2. Espermatogênese: Aspectos Gerais

A espermatogênese é um processo ordenado e complexo de divisão celular e diferenciação pelo qual células-tronco se transformam em espermatozóides. Ocorre nos túbulos seminíferos dos testículos (Fig. 1) que em humanos produzem aproximadamente 120 milhões de espermatozóides diariamente. A manutenção dessa impressionante produção diária requer uma coordenação das divisões celulares mitóticas das espermatogônias, para repor as reservas de células-tronco e para sofrerem a diferenciação em espermatócitos, divisões meióticas dos espermatócitos para produzir espermatídes, que contém um número haplóide de cromossomos, e diferenciação das espermatídes em espermatozóides maduros (Matsumoto, 1996).

A regularidade do processo espermatogênico está ligada aos processos genéticos, transcricionais, traducionais e reguladores, onde o ciclo é mantido por uma grande rede de reações que vai desde a ativação e desativação gênica, até a produção de

proteínas que coordenam as divisões celulares. Nos adultos esse processo contínuo pode ser dividido em três fases distintas: a mitótica, a meiótica e a espermiogênese, cada uma caracterizada por mudanças morfológicas e bioquímicas do citoplasma e núcleo celular.

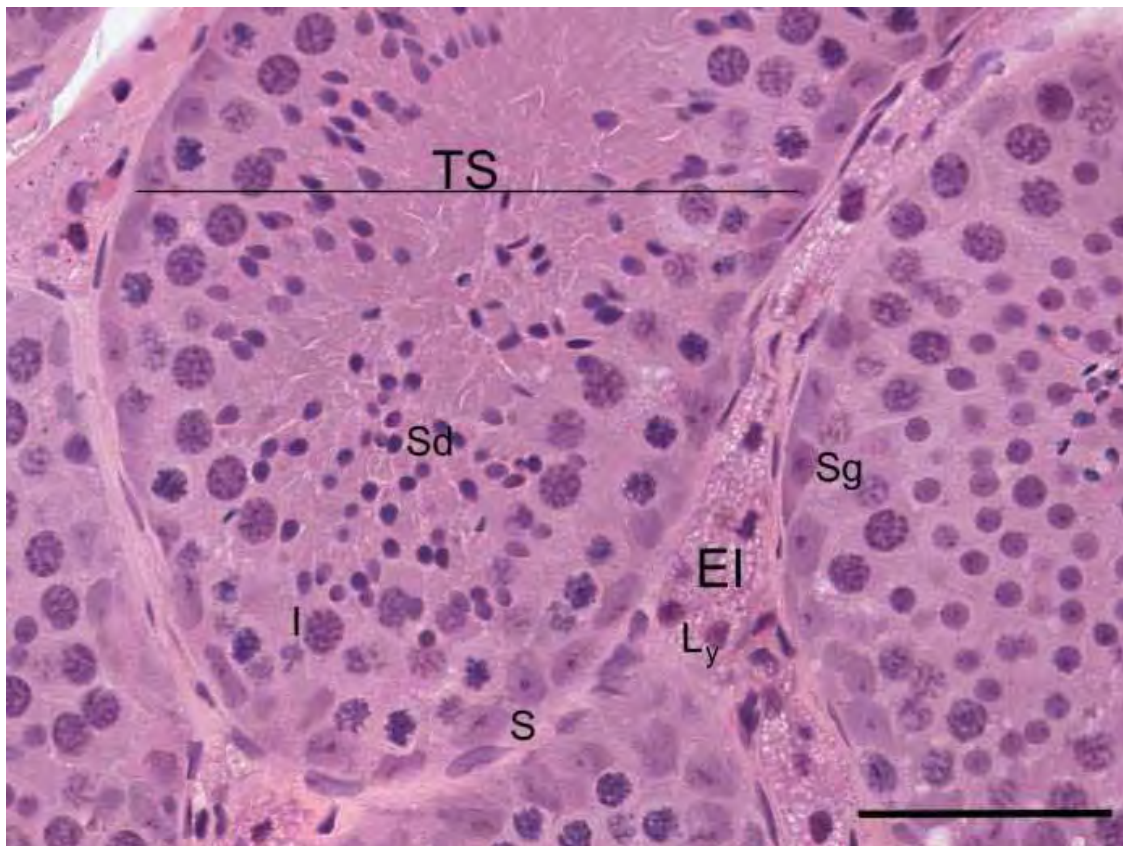


Fig. 1 Arranjo geral do epitélio testicular de morcegos (*Platyrrhinus lineatus*), coloração por Hematoxilina-Eosina. Túbulo seminífero (TS), espaço intersticial (EI), célula de Sertoli (S), espermatogônia (Sg), espermatócito primário (I), espermatídes (Sd) e células de Leydig (Ly). Barra = 50 µm.

A fase mitótica, também chamada de proliferativa ou espermatogonial, é caracterizada pelas divisões mitóticas das células-tronco (espermatogônias), que vão originar novas células, parte da qual irá servir para a renovação da população de células-tronco e outras que entrarão no processo de divisão e diferenciação. As espermatogônias

predestinadas a entrarem em meiose ainda sofrerão algumas divisões mitóticas formando outros tipos de espermatogônias que, ao final das mitoses, serão deslocadas para o compartimento adluminal e entrarão em uma prolongada fase de meiose como espermatócitos em pré-leptóteno. Todos os tipos celulares subsequentes ficarão no compartimento adluminal, passando entre junções celulares de células de Sertoli adjacentes e serão dependentes dessas células para terem acesso a nutrientes e hormônios necessários a sua diferenciação (Costa & Paula, 2003).

Na fase meiótica são observadas todas as reações preparatórias para a divisão celular, como a inibição da transcrição e a condensação do DNA, assim como a ocorrência das duas divisões meióticas para a formação das espermátides haplóides (Parvinen et al., 1991).

A espermiogênese é caracterizada por mudanças morfológicas progressivas das espermátides até espermatozóides. Estas modificações incluem: o desenvolvimento do acrossomo que, apesar de possuir características semelhantes entre os mamíferos, uma espécie difere das outras nos detalhes de sua formação e na sua forma final na região anterior do espermatozóide; a condensação e o alongamento do núcleo, onde as histonas associadas à cromatina nuclear são substituídas por protaminas, assim há uma remodelagem das fibras de cromatina que passam a ser mais compactas; e quase ao mesmo tempo, a formação do flagelo e acúmulo de mitocôndrias. Associado a esses eventos, ocorre uma redução progressiva do volume citoplasmático pela liberação de corpos residuais de citoplasma (Ward & Coffey, 1991; Costa & Paula, 2003). Após esses processos as espermátides são liberadas para o lúmen do túbulo seminífero, passando a serem chamadas de espermatozóides, fechando o ciclo da espermatogênese.

A espermatogênese é um processo que ocorre em contato contínuo com uma célula somática, a célula de Sertoli (Enders & Millette, 1988), essas localizam-se junto à lâmina basal dos túbulos seminíferos, e seu citoplasma envolve as células germinativas, estendendo-se até o lume tubular. Dentre as funções que desempenha, podem-se destacar: formação da barreira hematotesticular; suporte estrutural e nutricional das células germinativas; responsabilidade pela progressão das células germinativas, em diferenciação, em direção ao lume; liberação dos espermatozóides para o lume tubular, processo conhecido como espermição; fagocitose de células germinativas degeneradas e corpos residuais de citoplasma de espermátides maduras; secreção de fluidos e proteínas para banhar as células germinativas em desenvolvimento e conduzir os espermatozóides através dos túbulos em direção à *rete testis* (Russell & Griswold, 1993).

Essa célula tem um papel crucial no desenvolvimento das células germinativas e na regulação da espermatogênese, recebendo sinais endócrinos circulantes e fatores parácrinos das células de Leydig, peritubular e células germinativas, integrando esses sinais, e secretando produtos que controlam o desenvolvimento das células germinativas e modulam a função de outras células testiculares, incluindo sua própria função (Matsumoto, 1996).

Embora o processo de espermatogênese tenha sido objeto de estudo em muitos mamíferos, como *Camelus dromedarius* (Osman & Plöen, 1986), *Macaca mulatta* (de Rooij et al., 1986), *Cynomys ludovicianus* (Foreman, 1997), *Felis catus* (França & Godinho, 2003), *Puma concolor* (Leite et al., 2006) e *Chrysocyon brachyurus* (Bitencourt et al., 2007), pouca atenção tem sido dada a esse estudo em morcegos, apesar dessa ser uma grande e diversa classe de organismos, que apresentam diferentes estratégias reprodutivas

para ajustar esses animais às várias condições ecológicas e comportamentais as quais estão submetidos.

3. Nucleologênese

O nucléolo é a estrutura mais facilmente visível, mesmo sem coloração e *in vivo*, em microscopia de luz, o que é possível graças ao seu índice de refração mais elevado do que o dos outros elementos do núcleo e do citoplasma. Seu tamanho e forma depende do estado funcional celular, variando conforme a espécie e, dentro de uma espécie, de tecido para tecido e mesmo de célula para célula. Quanto mais forte a sobrecarga funcional celular, maior será o nucléolo (Mello, 2001).

A função principal do nucléolo é a biogênese dos ribossomos, fenômeno que envolve uma série de eventos como a transcrição de genes RNAr, o processamento dos pré-RNAs ribossômicos e a reunião de partículas pré-ribossomais (Scheer & Hock, 1999).

Presentemente o nucléolo é um dos mais surpreendentes e bem estudado sub-compartimento do núcleo. Quando observado em microscopia eletrônica, o nucléolo dos eucariotos superiores contém três componentes principais: o centro fibrilar (FC), o componente fibrilar denso (DFC) e o componente granular (GC). O centro fibrilar contém centenas de cópias de genes DNAr arranjados em um ou mais arranjos em tandem, em vários locos cromossômicos denominados regiões organizadoras nucleolares (RONs). Apesar dos vários genes, somente um subconjunto deles está normalmente ativo e este parece ter uma localização mais periférica, estendendo-se para o componente fibrilar denso, onde são observados os RNAs ribossômicos recém transcritos. No componente granular, o mais periférico, vão ocorrer os eventos finais do processamento dos transcritos de RNAr,

com a formação das partículas pré-ribossomais que serão translocadas para o citoplasma através dos poros nucleares (Carmo-Fonseca et al., 2000).

Durante o ciclo celular, podem ocorrer alterações na forma e tamanho dos nucléolos, em consequência do papel funcional dos vários domínios nucleolares, que desorganizam-se e reorganizam-se durante o ciclo, caracterizando o fenômeno denominado nucleologênese.

Quando a célula entra em mitose, ocorre no nucléolo a desorganização do CG e depois do CFD. As várias classes de compartimentos nucleolares distribuem-se então para diferentes regiões da célula. O aparelho ou maquinário transcricional permanece organizado durante a mitose, sendo que a RNA polimerase I e seus fatores de transcrição permanecem localizados nas regiões organizadoras dos nucléolos (Jordan et al., 1996; Roussel et al., 1996; Savino et al., 2001).

Contrariamente a esse, os componentes do processamento dos pré-RNAs ribossômicos são encontrados, no mínimo, em dois diferentes sítios: na região pericromossomal (PR) e no citoplasma. Eles se dispõem em volta dos cromossomos no início da prometáfase e permanecem até o início da telófase (Dundr et al., 1997) e, no citoplasma, aparecem constituindo numerosas partículas esféricas relativamente grandes. Elas aparecem na anáfase, diminuem em número na telófase e eventualmente desaparecem na fase G1 (Dundr et al., 1997; Dundr & Olson, 1998).

Os diferentes trabalhos voltados ao estudo da nucleologênese têm mostrado que a reorganização nucleolar inicia-se no final da anáfase ou início da telófase, quando a transcrição pela RNA pol I é reiniciada (Scheer et al., 1993; Fomproix et al., 1998). Ao mesmo tempo, componentes nucleolares específicos presentes nas regiões

pericromossômicas são liberados dos cromossomos descondensados e começam a associarem-se com os corpúsculos nucleolares no recém formado núcleo da célula filha.

Estudos envolvendo análises *in vivo* das células têm fornecido informações importantes para o entendimento da nucleologênese, mas ainda não conseguiram esclarecer todo o processo. Os resultados desses estudos têm mostrado que o material que migra para o citoplasma desaparece durante a telófase e que seus componentes dissociados aparentam entrar no núcleo. Ao mesmo tempo, certas seqüências de pré-RNAr são encontradas no núcleo telofásico, onde elas estão associadas inicialmente com os cromossomos em descondensação, e posteriormente com os corpúsculos nucleolares. Esses corpúsculos constituem-se na maior fonte de componentes relacionados à organização do nucléolo nos estágios tardios da mitose. Portanto, têm sido postulado que os nucléolos pós-mitóticos são construídos parcialmente de componentes derivados da célula materna (Dundr et al., 2000).

Se assumirmos o modelo de Dundr e colaboradores (2000) para a nucleologênese em células de mamíferos, estaremos aceitando que quando a transcrição é interrompida no início da fase M (mitose), os transcritos de pré-RNAr são liberados do componente fibrilar denso, associados com os componentes do processamento. Estes complexos então associam-se com as regiões periféricas de todos os cromossomos. Na anáfase, alguns desses componentes permanecem nos cromossomos enquanto outros empacotam-se formando partículas grandes que se deslocam para o citoplasma. Durante a telófase estes complexos de processamento ou seus subcomponentes entram nos núcleos por dois caminhos: o primeiro através de sua associação passiva com as regiões pericromossômicas, as quais automaticamente tornam-se parte do núcleo quando o envoltório nuclear é formado e, no segundo, eles podem ser transportados para o interior do núcleo como pequenas partículas dissociadas. Uma vez no núcleo, os componentes desses

complexos de processamento são eventualmente incorporados aos que estão na proximidade do núcleo, fornecendo material para o novo nucléolo pós-mitótico. A incorporação dos componentes de processamento no nucléolo recém formado é dependente da reativação da transcrição no nucléolo.

Evidentemente que muitos desses estudos envolveram análises sofisticadas como a de imunocitoquímica de ultraestrutura por microscopia eletrônica, análise das células por imunofluorescência em material fixado e células *in vivo* (*real time*), e de hibridações com sondas de pré-RNAr. Contudo, esses estudos ainda não foram suficientes para esclarecer como vimos, vários aspectos da nucleologênese, mesmo porque, apesar do fenômeno ser comum a todas as células eucariotas, alguns aspectos devem ser particulares a cada organismo ou espécie.

Apesar das diferentes abordagens sobre a nucleologênese, há ainda muito a ser entendido, principalmente na divisão meiótica. Deve ser considerado aqui, que nas células somáticas a transcrição é suspensa no início do ciclo de condensação cromossômica, mas nas células gaméticas os genes ribossomais são ativos durante a prófase I - leptóteno, zigóteno e início do paquíteno, nos espermátocitos, e até o diplóteno, nos oócitos (Wachtler & Sthal, 1993) o que propicia a análise mais prolongada dos eventos.

Como citado anteriormente, as RONS fazem parte do centro fibrilar, e portanto são indispensáveis à formação do nucléolo. Não só em mamíferos, mas em vários outros grupos de organismos, o número e a posição das RONS varia amplamente entre as espécies. Na maioria dos mamíferos as RONS são encontradas nos autossomos, mas em algumas espécies, elas ocorrem também nos cromossomos sexuais.

O número de RONS ativas corresponde ao número máximo de nucléolos que podem ser encontrados em células interfásicas, todavia, o número de RONS que são ativas

em cada célula pode variar. A ativação diferencial de RONS conduz a uma variação no número e tamanho dos nucléolos, porém não é a única responsável, uma vez que existem modificações cíclicas na morfologia dos nucléolos durante o ciclo celular, assim como fusão nucleolar, resultante de movimento, crescimento e aproximação dos nucléolos.

O número de RONS em espécies de morcegos é variável, assim como é variável o número de RONS ativas e de nucléolos. Também é característico em morcegos uma taxa elevada de fusão nucleolar (Volleth, 1987; Morielle & Varella-Garcia, 1988).

A variação no número de RONS é grande, podendo ser destacado a presença de um par em espécies de diferentes famílias como *Platyrrhinus lineatus*, *Molossus rufus* e *Lasiurus ega*, 3 e 5 pares nas espécies *Artibeus lituratus* e *Myotis nigricans* (Morielle-Versute et al, 1996; Marchesin, 2002). No entanto, essa variação não ocorre somente no número, mas também em seu posicionamento onde, devido a rearranjos, elas podem estar localizadas em diferentes loci cromossômicos, com o extremo de *Carollia perspicillata*, que apresenta as RONS no cromossomo X.

Em geral todas as observações sobre RONS e nucléolos em morcegos foram feitas a partir da análise de células somáticas. Em decorrência da escassez de informações e do interessante aspecto envolvendo a nucleologênese, uma análise de células meióticas, envolvendo a caracterização das RONS e nucléolos, é interessante.

IV. OBJETIVOS

Devido à escassez de informações referentes à espermatogênese e à nucleologênese em Chiroptera, e ao interessante e vasto campo de conhecimento que esses aspectos representam, o intuito do presente estudo foi:

- * Estudar a morfologia testicular: espaço intersticial e túbulos seminíferos, analisando o posicionamento e comportamento das células espermatogênicas ao longo do epitélio seminífero.

- * Caracterizar e comparar a espermatogênese de seis espécies de morcegos: *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Platyrrhinus lineatus*, *Sturnira lilium* (Phyllostomidae) e *Myotis nigricans* (Vespertilionidae).

- * Analisar o comportamento da cromatina e do DNA ao longo da divisão meiótica.

- * Estudar a variação na morfologia e comportamento do nucléolo das células de Sertoli das espécies de morcegos: *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Platyrrhinus lineatus*, *Phyllostomus discolor* (Phyllostomidae), *Cynomops planirostris*, *Molossus molossus*, *Molossus rufus* (Molossidae), *Histiotus velatus* e *Myotis nigricans* (Vespertilionidae).

- * Estudar o comportamento do nucléolo e das estruturas nucleolares durante a divisão meiótica e a espermiogênese, identificando possíveis diferenças na nucleologênese

de cinco espécies de morcegos que apresentam diferentes números de Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs): *Artibeus lituratus* e *Artibeus planirostris* (três pares), *Carollia perspicillata* (RON no cromossomo X: uma RON no macho e duas na fêmea), *Myotis nigricans* (cinco pares) e *Platyrrhinus lineatus* (um par).

* Determinar a localização dos sítios de DNAr nas cinco espécies acima por meio de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr.

III. ARTIGO 1

Testicular morphology and the seminiferous epithelium cycle in six species of Brazilian bats

Mateus Rodrigues Beguelini^a, Karina de Cassia Faria^b, Paula Renata Lopes Moreira^a,

Sandra Regina de Carvalho Marchesin^a, Eliana Morielle-Versute^{a,*}

^a*Laboratory of Chiroptera, Department of Zoology and Botany, UNESP - São Paulo*

State University, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil 15054-000;

^b*Mato Grosso State University – UNEMAT, Nova Xavantina, Mato Grosso, Brazil*

78690-000

*Corresponding author. Tel.: +55 17 32212369. FAX: + 55 17 32212374

E-mail address: morielle@ibilce.unesp.br (Eliana Morielle-Versute)

Resumo

Ao contrário de outros mamíferos, existe muito pouca informação relacionada ao processo de espermatogênese em morcegos, uma grande e diversificada classe de organismos que apresenta diferentes estratégias reprodutivas. No presente estudo, a espermatogênese em seis espécies de morcegos tropicais foi investigada por microscopia de luz. As espécies estudadas foram *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Myotis nigricans*, *Platyrrhinus lineatus* e *Sturnira lilium*. Baseado na condensação da cromatina, morfologia nuclear, posição em relação à membrana basal e formação do flagelo, três tipos de espermatogônias foram reconhecidos: o tipo A escuro (A_d), o tipo A claro (A_p) e tipo B; e a diferenciação das espermátides foi dividida em sete etapas. Com a exceção de *M. nigricans*, o ciclo do epitélio seminífero das outras cinco espécies estudadas foi semelhante ao de outros mamíferos, mostrando fases graduais pelo método da morfologia tubular. Uma assincronia foi observada no ciclo do epitélio seminífero de *M. nigricans*, evidenciada pela sobreposição de fases e ciclo indefinido. As frequências encontradas nas três fases do ciclo foram variáveis, com a maior frequência ocorrendo na fase pós-meiótica (mais de 50%) e a menor na fase meiótica (menos de 10%). Pouca correlação foi encontrada entre regiões heterocromáticas e concentração de DNA. As semelhanças observadas nas cinco espécies de Phyllostomidae podem estar relacionadas a sua proximidade filogenética e menor tempo de divergência, ao passo que as diferenças de *M. nigricans* podem ser devidas a sua maior distância filogenética, uma vez que a família Vespertilionidae divergiu anteriormente.

**Testicular morphology and the seminiferous epithelium cycle in six species of
Brazilian bats**

Mateus Rodrigues Beguelini^a, Karina de Cassia Faria^b, Paula Renata Lopes Moreira^a,

Sandra Regina de Carvalho Marchesin^a, Eliana Morielle-Versute^{a,*}

^a*Laboratory of Chiroptera, Department of Zoology and Botany, São Paulo State
University – UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil 15054-000*

^b*Mato Grosso State University – UNEMAT, Nova Xavantina, Mato Grosso, Brazil
78690-000*

*Corresponding author. Tel.: +55 17 32212369. FAX: + 55 17 32212374

E-mail address: morielle@ibilce.unesp.br (Eliana Morielle-Versute)

Abstract

Unlike other mammals, there is very little information regarding the process of spermatogenesis in bats, a great and diverse class of organisms that presents different reproductive strategies. In the present study, spermatogenesis in six species of tropical bats was investigated by light microscopy. The species studied were *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Myotis nigricans*, *Platyrrhinus lineatus* and *Sturnira lilium*. Based on chromatin condensation, nuclear morphology, position in relation to the basal membrane and formation of the flagellum, three types of spermatogonia were recognized: the dark type A (A_d), the pale type A (A_p) and type B; and developing spermatids were divided into seven steps. With the exception of *M. nigricans*, the seminiferous epithelium cycle of the other five species studied was similar to that of other mammals, showing gradual stages by the tubular morphology method. An asynchrony was observed in the seminiferous epithelium cycle of *M.*

nigricans, evidenced by overlapping of stages and undefined cycles. The frequencies found in the three phases of the cycle were variable, with the largest frequency occurring in the post-meiotic phase (more than 50%) and the least in the meiotic phase (less than 10%). Little correlation was found between heterochromatic regions and DNA concentration. The similarities observed in the five species of Phyllostomidae can be related to their phylogenetic proximity and shorter time of divergence, while the differences in *M. nigricans* can be related to its greater phylogenetic distance, since the Vespertilionidae family diverged earliest.

Keywords: Spermatogenesis, Spermiogenesis, Seminiferous Epithelium Cycle, Chiroptera.

Introduction

Spermatogenesis is a complex, highly ordered process of cell division and differentiation by which spermatogonial stem cells give rise to mature spermatozoa. Maintenance of this process requires coordination of the mitotic cellular divisions of spermatogonia, both to replenish stem cell reserves and to undergo further differentiation into spermatocytes, meiotic divisions of spermatocytes to produce spermatids containing a haploid number of chromosomes, and differentiation of spermatids into mature spermatozoa (Matsumoto, 1996).

The spermatogenic cells are arranged in the seminiferous tubules in an organized and fixed form, constituting cellular associations that characterize the seminiferous epithelium cycle (Leblond and Clermont, 1952).

The stages are artificial demarcations established by researchers based upon histological features of the seminiferous epithelium. The criteria used for stage

identification correspond from the overall seminiferous epithelium composition to the morphological characteristics of spermatids (Russell et al., 1990). With the use of different forms of analysis, the number of stages and the features used for the classification scheme vary between species, and there are even divergences between researchers concerning the same species. However, the tubular morphology method yields eight stages of the cycle for all species, being a less arbitrary and simpler methodology to characterize the stages of the cycle (Berndtson, 1977; Paula et al., 1999).

Although the process of spermatogenesis has been the subject of investigation in several species of mammals, such as *Camelus dromedarius* (Osman and Plöen, 1986), *Macaca mulatta* (de Rooij et al., 1986), *Cynomys ludovicianus* (Foreman, 1997), *Felis catus* (França and Godinho, 2003), *Puma concolor* (Leite et al., 2006) and *Chrysocyon brachyurus* (Bitencourt et al., 2007), less attention has been given to its study in bats, a great and diverse class of organisms that presents different reproductive strategies to enable these animals to adjust to the multiple ecological and behavior conditions to which they are submitted.

Due to their wide geographic distribution, the reproductive strategies of bats suffer considerable influence from abiotic factors. Species that occur in high latitudes tend to present a conspicuous monoestrous pattern, with their reproductive cycles closely associated with temperature. However, in tropical species, reproductive cycles are strongly associated with the rainy season. These climatic factors (temperature and rainfall) combined with the viability of the alimentary supplement, have a direct influence on the reproductive cycles of tropical bats, resulting in cycles ranging from a seasonal monoestric pattern and bimodal seasonal polyestry, to species that reproduce throughout the year (Fleming et al., 1972; Taddei, 1976). This shows that reproductive

strategies in Chiroptera are quite complex and diverse, and, depending on the latitude and type of habitat that bats inhabit, vary within the same family, genus, and even within a species (Bradbury and Vehrencamp, 1977; Taddei, 1980).

The literature relating to the reproductive parameters for species of Chiroptera is scarce. Except for reports concerning seasonal breeding cycles (Miller, 1939; Krutzsch, 1975; Krutzsch et al., 1976; Krutzsch and Crichton, 1987; Van der Merwe and Rautenbach, 1987, 1990; Happold and Happold, 1989; Heideman et al., 1992) and a few studies concerning to spermatogenesis in Megachiroptera (Saidapur and Patil, 1992; Morigaki et al., 2001), there is little data about the process of spermatogenesis in bats, especially related to Microchiroptera.

Due to the scarcity of information and to the vast and fascinating field of knowledge that these aspects represent, the objective of the present study was to analyze different aspects of spermatogenesis and to determine the arrangement and kinetics of the seminiferous epithelium cycle in six species of tropical bats, *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Platyrrhinus lineatus* and *Sturnira lilium* of Phyllostomidae and *Myotis nigricans* of Vespertilionidae.

Materials and Methods

Animals

For the sake of wild life conservation only two sexually mature specimens of each species (*Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Platyrrhinus lineatus*, *Sturnira lilium* and *Myotis nigricans*) were used in the present study. These animals were collected with mist nets in the urban region of São José do Rio Preto (São Paulo, Brazil). After removing both testes, the specimens were

catalogued and deposited in the Scientific Collection of the Laboratory of Chiroptera, IBILCE-UNESP.

Histology

Testes were fixed in Karnovsky fixative solution or in Bouin fixative solution (for at least 24 hours), dehydrated in ethanol at increasing concentrations, embedded in glycol methacrylate (Historesin, Leica Instruments), and sectioned (1 μm) using a Leica RM 2155 microtome. Tissue sections were submitted to conventional cytological and cytochemical procedures such as Hematoxylin–Eosin (Ribeiro and Lima, 2000), Toluidine Blue (Mello and Vidal, 1980) and Feulgen reaction (Mello and Vidal, 1980).

Stages of the Seminiferous Epithelium Cycle

Stages of the cycle in bats were characterized based on the shape and location of spermatid nuclei, presence of meiotic divisions, and overall seminiferous epithelium composition (Berndtson, 1977; França and Godinho, 2003). This method provides eight stages of the seminiferous epithelium cycle. The relative stage frequencies were determined from the analysis of approximately 200 seminiferous tubule cross sections per animal at 400x magnification. Both testes were analyzed for each animal.

The sections were evaluated in a Zeiss photomicroscope and documented by an Axiovision 3.1 for Windows computer software for image analysis.

Results

Testicular Morphology

Hematoxylin-Eosin stain was used for the general analysis of the seminiferous tubules and for the characterization of the stages of the seminiferous epithelium cycle.

Like other mammals, the testicular tissue of the bats is composed of two histologically distinct compartments: the seminiferous tubules, in which spermatogenesis occurs, and the interstitium, which is nestled between the seminiferous tubules. The seminiferous epithelium varied in thickness in the different species, however, all the analyzed species presented an active reproductive pattern, no situations of reproductive latency being observed.

Apart from a few minor differences the pattern of the characteristics of the seminiferous tubules was similar in each of the six species. *P. lineatus* was therefore chosen to illustrate the general characteristics of all six.

Sertoli cells were observed in the seminiferous tubules, extending from the basal portions to the lumen of the tubule. These involve the germ cells in development, providing them with a structural framework. Spermatogonia are present within the basal compartment, and both spermatocytes in meiotic division and maturing spermatids reside in the adluminal compartment, more closely related to the lumen. After spermatogenesis, mature spermatozoa are released into the lumen of the seminiferous tubule. The interstitium contains Leydig cells, a large quantity of extracellular matrix and peritubular myoid cells, surrounding the seminiferous tubules (Fig. 1).

Leydig cells are characterized by round nuclei and numerous lipid droplets, typical of steroid secreting cells (Fig. 1A). Sertoli cells are characterized by oval or elongated nuclei, containing a large nucleolus (Fig. 1B).

Three types of spermatogonia were recognized, based on their chromatin distribution, nuclear morphology and position within the seminiferous epithelium: the dark type A (A_d), the pale type A (A_p) and type B. The A_d spermatogonia is the rarest type, observed closely apposed to the basal lamina and is characterized by possessing an oval and highly stained nucleus, with partially condensed chromatin, and one few

perceptive nucleolus (Fig. 1C). Type A_p has a large round-to-oval nucleus, containing dispersed chromatin and from 0 (Fig. 1D) to 2 nucleoli. Type B spermatogonia have a round-to-oval nucleus, somewhat darker than A_p spermatogonia but lighter and larger than A_d spermatogonia, possessing one or two nucleoli (Fig. 1D). Unlike type A_d spermatogonia, types A_p and B were not exclusively associated with the basal lamina. The spermatogonia were observed in self-renewal mitosis (Fig. 1E) and in differentiation meiosis.

The meiotic steps were characterized based on chromatin condensation and position within the seminiferous epithelium. Primary spermatocytes in the leptotene and zygotene stages occupy the base of the seminiferous epithelium and the first layer (Fig. 1E), and have a highly stained and largely uncondensed nucleus. In the pachytene stage, they present more condensed chromatin and are contained in the second and third layers. Diplotene nuclei possess condensed chromatin and are contained in the top layers (Fig. 1E). Secondary spermatocytes are rarely observed.

Based on chromatin distribution, nuclear morphology and position within the seminiferous epithelium, spermiogenesis was divided into seven steps. In step 1 (Sd₁) spermatids, the nuclei are round with largely uncondensed chromatin and only one nucleolus. They are usually located in the top layers of the seminiferous epithelium adjacent to the lumen (Fig. 1F). In step 2 (Sd₂), there is a decrease in the size of the nucleus, which began the compacting of the chromatin, the stain became stronger and the nucleolus could no longer be distinguished (Fig. 1G). In step 3 (Sd₃), the tail filament is visible, as a small invagination in the distal region, and the nuclei are beginning their proximal nuclear elongation (Fig. 1H). In step 4 (Sd₄) there is a larger proximal nuclear elongation, a flagellum elongation and a position orientation, whereby all the spermatids are arranged with the proximal region turned towards the base of the

seminiferous epithelium and the flagellum towards the lumen (Fig. 1I). In step 5 (Sd₅) there is a central and distal condensation of the nucleus, which becomes longer and cylindrical (Fig. 1J). In step 6 (Sd₆) the spermatids become longer and form laterally placed groups that ascend towards the lumen of the seminiferous tubule, only the proximal region being embedded in Sertoli cell cytoplasm (Fig. 1K). In the region subsequent to the nucleus there is a greater portion of the flagellum, possibly the beginning of the formation of the intermediate piece. In step 7 (Sd₇) the nuclei are very slim and highly condensed. The spermatids are distributed next to the lumen, ready to be released. Residual bodies are present (Fig. 1L).

Unlike *P. lineatus*, in the *A. lituratus* and *A. planirostris* species the spermatogonia and Leydig cells had from one to six nucleoli and the spermatids one to three (Fig. 2A). In *C. perspicillata* all the cellular types, Leydig cells, spermatogonia and spermatids had only one nucleolus (Fig. 2B). In *S. lilium*, the spermatid elongation in step 2-3 is not easily distinguished and the spermatids are asymmetrical (Fig. 2C). In *M. nigricans* the Sertoli cells had a more elongated nucleus than the other species (Fig. 2D), the Leydig cells and spermatogonia had several stained points, step 1 spermatids with one to five nucleoli and step 2 spermatids were differently shaped, with an elongated distal region and a large and distinct nucleolus (Fig. 2E). Step 7 spermatids were more elongated than the other species (Fig. 2F).

Seminiferous Epithelium Cycle

The characteristics of the seminiferous epithelium cycle of the *A. lituratus*, *A. planirostris*, *P. lineatus* and *S. lilium* species were very similar. The seminiferous epithelium cycle was distinctly grouped into eight stages in accordance with the tubular

morphology method (Figs. 3 and 4), and, for all species, in one seminiferous tubule section only one single stage was observed.

Stage 1 is characterized by the presence of pre-leptotene spermatocytes, near the basal lamina; one or two layers of pachytene spermatocytes; and several layers of step 1 spermatids (Fig. 3, Stage 1). Stage 2 is composed of leptotene and pachytene spermatocytes and step 2 or 3 spermatids (Fig. 3, Stage 2). Stage 3 has zygotene and diplotene spermatocytes and step 4 spermatids (Fig. 3, Stage 3). Stage 4 is characterized by the occurrence of the two meiotic divisions, where the primary spermatocytes undergo the first meiotic division, producing the secondary spermatocytes that are quickly divided, producing step 1 spermatids. Zygotene spermatocytes, step 1 and step 5 spermatids are also observed (Fig. 3, Stage 4).

Stage 5 is characterized by spermatocytes undergoing transition from zygotene to pachytene, step 1 spermatids, and spermatids undergoing transition from step 5 to step 6 (Fig. 3, Stage 5). Stage 6 has B spermatogonia, pachytene spermatocytes, step 1 spermatids and step 6 spermatids (Fig. 3, Stage 6). Stage 7 is characterized by the presence of B spermatogonia, pachytene spermatocytes, step 1 spermatids and spermatids undergoing transition from step 6 to step 7 (Fig. 3, Stage 7). Stage 8 is composed of B spermatogonia, a few pre-leptotene spermatocytes, pachytene spermatocytes, step 1 spermatids, step 7 spermatids, ready to be released, and residual bodies (Fig. 3, Stage 8).

Type A_d and A_p spermatogonia are observed in all stages of the cycle, however, type B was found only from stages 6 to 8. Spermatogonia undergoing mitotic divisions were observed from stages 5 to 1.

A total of approximately 4.5 cycles of the seminiferous epithelium is necessary for the complementation of the spermatogenic process in phyllostomid bats, that is,

spermatogonia must pass through 4.5 cycles to differentiate spermatozoon, and to be released from the seminiferous tubule (Fig. 4).

The *C. perspicillata* species also presented the same pattern as that observed in the other species, however an advance was observed in the cycle, whereby step 7 spermatids are released from the seminiferous tubule in stage 7, and stage 8 is formed only by type A and B spermatogonia, pachytene spermatocytes and step 1 spermatids.

Unlike the phyllostomid species, an asynchrony was observed in the seminiferous epithelium cycle of *M. nigricans*, whereby the fixed cell association observed in the other species was not observed. This species presented more than one stage with the production of pre-leptotene spermatocytes, which occurred not only in stage 1 (Fig. 5A), but also in stages 6, 7 and 8 (Figs. 5B and 5C). This over-production caused an overlapping of stages and a combination of random cells, ranging from two spermatocyte generations associated with two or three spermatid generations (Figs. 5D and 5E) to stages with only pre-leptotene spermatocytes and two spermatid generations (Figs. 5F and Fig. 6).

The relative frequencies of each stage of the seminiferous epithelium cycle in the analyzed species are represented in Table 1. In Table 2, the frequencies were grouped into pre-meiotic (stages 1-3), meiotic (stage 4) and post-meiotic (stages 5-8) phases. There was a similar pattern for all species, with stage 4 presenting the lowest frequency and stage 5 the highest. In all species, the post-meiotic phase corresponded to more than 50% of the frequency and the meiotic phase to less than 10%. The relative frequencies of *M. nigricans* could not be exactly determined due to the overlapping of stages.

Arrangement of Chromatin and DNA Condensation

Toluidine Blue stain enabled us to analyze chromatin condensation through the spermatogenic cycle. Despite some small variations, the general characteristics observed were similar in all six species.

In *P. lineatus* Leydig cells were observed with one or two large heterochromatic regions accompanied by small points (Fig. 7A). The Sertoli cells had a euchromatic nucleus with only one large heterochromatic region, generally centrally located (Fig. 7B). Type A_d spermatogonia had a highly stained nucleus, indicative of condensed chromatin (Fig. 7C).

Two types of A_p spermatogonia were observed: one with an euchromatic nucleus and another presenting one or two large heterochromatic regions (Fig. 7D). Type B spermatogonia presented nuclei darker than type A_p, but clearer and larger than type A_d (Fig. 7E). Mitotic spermatogonia and meiotic cells were highly stained due to chromatin condensation for the cellular divisions.

In the other species the only differences observed were in the amount of heterochromatin in some cellular types. The Leydig cells of *S. lilium* and *M. nigricans* presented the smallest amount of heterochromatin, with only one small heterochromatic region in *S. lilium* and two to five small points arranged next to the nuclear membrane in *M. nigricans*. *C. perspicillata* presented only one heterochromatic region, larger than that in *S. lilium*, and *A. lituratus* and *A. planirostris* presented two or three heterochromatic regions accompanied by small points throughout the nucleus.

Type A_p spermatogonia presented similar characteristics to *P. lineatus*, with a predominance of euchromatic over heterochromatic regions. A single large heterochromatic region, or an absence of large regions is observed in *P. lineatus* and *C.*

perspicillata, absence or one to three regions in *S. lilium*, one to three in *A. lituratus* and *A. planirostris* and multiple regions in *M. nigricans*.

As in the case of HE stain, seven steps were found in spermiogenesis of all analyzed species. In step 1 spermatids there was a prevalence of euchromatin, with a single distinctive heterochromatic region and some small points observed in *P. lineatus*, *S. lilium* and *C. perspicillata* (Fig. 7F), one to three heterochromatic regions in *A. lituratus* and *A. planirostris*, while in *M. nigricans* step 1 spermatids with one or two large regions and several minor regions were observed which, in step 2 spermatids became a single and large heterochromatic region. In step 2 due to the beginning of chromatin condensation, the nuclei became darker and it was no longer possible to distinguish any stained region (Fig. 7G). In step 3 there was the onset of proximal nuclear elongation, and the spermatids were highly stained (Fig. 7H). In step 4 the proximal nuclear elongation became more accentuated and paler than the distal region (Fig. 7I). In step 5 a central and distal condensation of the nuclei was observed, leaving the posterior region more stained (Fig. 7J). In step 6, the nuclei became longer and more darkly stained (Fig. 7K). In step 7, the spermatids were intensely metachromatic and positioned next to the lumen of the epithelium ready to be released, where it was possible to observe the presence of residual bodies (Fig. 7L).

No significant difference was observed in the heterochromatic amount of the spermatogonia and Sertoli cells, throughout the eight stages of the seminiferous epithelium cycle. However, in stages 7 and 8 an increase in spermatids metachromasy was observed.

The Feulgen reaction in preparations of *P. lineatus* showed Leydig and Sertoli cells with uniformly pale nuclei, or with no more than a few small darker points in the Leydig cells (Fig. 8A-B). A more intense staining was observed in type A_d

spermatogonia than in A_p type (Fig. 8C). Two shapes of type A_p spermatogonia were found, one with an uniformly pale nucleus (Fig. 8D) and another with partially compacted DNA, with darker points (Fig. 8E). Type B spermatogonia possess darker nuclei than type A_p, although they are clearer and greater than those of type A_d (Fig. 8F).

Mitotic spermatogonia and meiotic cells presented intense staining due to chromatin condensation for the cellular divisions. Due to the chromosomal condensation, primary spermatocytes in transition from pre-leptotene/leptotene presented a highly stained nucleus, paler than in zygotene spermatocytes. Pachytene spermatocytes presented areas without coloration and more highly stained points on chromosomic filaments and, in diplotene cells, the chromosomic filaments were more distinct. The two meiotic divisions presented intense coloration, due to the assembly and movement of the chromosomes to the polar regions of the cell.

In step 1 of spermiogenesis a pale nucleus of the spermatids was observed, with only one darker point (Fig. 8G). In step 2 spermatids, with the beginning of the chromatin condensation, the coloration became higher and the distinction of darker regions could no longer be made (Fig. 8H). The other steps of spermiogenesis (Figs. 8I to 9M) occurred as described for HE stain.

The characteristics described above for *P. lineatus* were also observed in the other species. The only significant difference found was related to step 1 spermatids, which, in *C. perspicillata*, presented only one highly stained region, larger than in the case of *P. lineatus*. In *S. lilium* a middle stained region accompanied by some small points was observed. In *A. lituratus* and *A. planirostris* from one to three highly stained regions were found and, in *M. nigricans*, the step 1 spermatids contained from one to

three middle regions accompanied by some small points, which, in step 2 spermatids merged to form a single, large region.

Discussion

Different methods have been proposed for the identification and classification of the cellular types present in the seminiferous epithelium. In several of them different types of spermatogonia have been recognized in accordance with the topographical arrangement in relation to the basal membrane (Van Haaster and de Rooij, 1993; de Rooij, 2001; Chiarini-Garcia et al., 2001, 2003; Chiarini-Garcia and Russell, 2002). The most complex classification recognizes a series of chains with from 4 to 32 spermatogonia, which, after 9 to 11 mitotic divisions, produce the spermatocytes (de Rooij, 2001). Spermatogonial stem cells are represented by isolated cells denominated A-single (A_s), which, by mitotic divisions, can replenish the stem cell populations and produce two new spermatogonia, which remain connected by intercellular bridges, the A-paried (A_{pr}) spermatogonia, which divide into chains of 4 to 32 A-aligned (A_{al}) spermatogonia, which form the spermatocytes.

Other studies in species of primates and birds based on the chromatin distribution and nuclear morphology, have resulted in different classifications recognizing from three to seven types of spermatogonia, where three types are generally present: the dark spermatogonia, type A_d , the probable spermatogonial stem cell; the pale spermatogonia, type A_p , which represent intermediate stages, and type B spermatogonia, which precede the formation of primary spermatocytes. The other four types represent different generations of the principal types, A_p and B (B_1 , B_2 , B_3 and B_4) (Cavicchia and Dym, 1978; Lin and Jones, 1992; Smithwick et al., 1996; Ehmke et al., 2005; Bakst et al., 2007).

The few studies related to spermatogenesis in species of Chiroptera have been based on PAS-hematoxylin reaction or hematoxylin-eosin stain. In a non-scrotal microchiropteran, *Rhinopoma kinneari*, three types of spermatogonia were observed: a single type A, the intermediate type (In) and type B (Singwi and Lall, 1983). McGuckin and Blackshaw (1987) also observed these three types of spermatogonia in the megachiropteran bat *Pteropus poliocephalus*, and Saidapur and Patil (1992) described five types of spermatogonia in *Rousettus leschenaulti*, also a megachiropteran bat. In this study, three types of A spermatogonia were recognized (A_1 , A_2 , and A_3), in addition to In and B types. The analyses of ultrastructural characteristics in *Myotis macrodactylus* enabled Lee (2003) to recognize two distinct types of A spermatogonia, the dark and the pale types, as well as type B spermatogonia.

In the present study, three main types of spermatogonia were recognized for the six species, types A_d , A_p and B, which, despite differences in numbers, correspond to the types described by several of the authors above.

Although the two types of A_p spermatogonia distinguished in our study were identified based primarily on chromatin condensation, the characteristics observed in two specific reactions, Toluidine Blue stain and the Feulgen reaction, were sufficient to differentiate them. Type A_{p1} spermatogonia are characterized by having fully euchromatic nuclei with small, isolated heterochromatic regions, without the compaction of DNA; while A_{p2} spermatogonia, have DNA compacted in some regions and one or two large heterochromatic regions. It is reasonable to argue that these two types represent two differentiated physiological states of the same cell, or that they are two different cellular types, possibly the A_{p1} and A_{p2} types identified by Lin and Jones (1992) in birds cells, or possibly two of the three types of A spermatogonia observed by

Saidapur and Patil (1992) in the megachiropteran bat, or even two of the seven types of intermediate spermatogonia identified by de Rooij (2001) in rodent species.

Based on the data obtained, we agree with the above authors, who agreed that the maturation of germinative cells began when the spermatogonial stem cells (A_d) underwent mitotic division, producing not only more A_d spermatogonia, but also A_p spermatogonia. In their turn, these divided and differentiated into B spermatogonia, which are the cells destined to suffer meiosis and differentiate into spermatozoa.

Another interesting feature of the seminiferous epithelium refers to spermiogenesis, which has been the subject of special attention, due to the fact that it represents an excellent model of cellular differentiation (Clermont and Leblond, 1955; Gardner, 1966; Foreman, 1997; Lin et al., 1997; Lin and Jones, 2000).

Due to differences in the information resulting from the application of different techniques, several classifications of spermiogenesis have been proposed, which recognize from 6 to 16 steps (Cavazos and Melampy, 1954; Gunawardana, 1977; Singwi and Lall, 1983; Lin and Jones, 1993; Góes and Dolder, 2002).

In the present study, the classification established, based on nuclear morphology, chromatin condensation and cell position within the seminiferous epithelium, enabled us to distinguish only seven steps in the spermiogenesis of the analyzed species. However, it was observed that the distinctive characteristics used in the delimitation of each step were also used by other authors who analyzed bat and other vertebrate species (Singwi and Lall, 1983; Saidapur and Patil, 1992; Lin and Jones, 1993, 2000). It is important to emphasize that the pronounced curvature of the nuclei of spermatids observed in two steps recognized by Gunawardana (1977) (steps 9 and 10) and the formation of the nuclear helix in the final steps observed by Lin and Jones (2000) (steps 13 to 16) have not been observed in bats.

The pattern of arrangement of the cells in seminiferous tubules exhibit differentiated cellular associations, classified as stages of the seminiferous epithelium cycle (Leblond and Clermont, 1952; Costa and Paula, 2003). As spermatogenesis is a synchronous and continuous process, the separation into stages is artificial, and the number of stages varies depending on the criteria used by each author and on species analyzed.

The most frequently used criteria are those of the tubular morphology method, based on overall seminiferous epithelium composition, alterations in the nuclei of the spermatogenic cells, occurrence of meiotic divisions and morphological characteristics of spermatids. Although this method generally provides eight stages of the cycle for most species (Berndtson, 1977; Garcia-Gil et al., 2002; França and Godinho, 2003; Leal and França, 2006), variations between different species have been detected, when other methods are utilized. Thus, six stages are referred to in *Pan troglodytes* (Smithwick et al., 1996), nine stages in *Lagostomus maximus maximus* (Muñoz et al., 1998), ten stages in *Cynomys ludovicianus* (Foreman, 1997), eleven stages in *Otolemur garnetti* (Ojoo et al., 2005), and twelve stages in *Phodopus sungorus sungorus* (Van Haaster and de Rooij, 1993) and *Macaca mullata* (Ehmcke et al., 2005), among others. The more extensive is the criteria used, the more specific and detailed are the stages that can be identified (Paula et al., 1999).

In the species of bats analyzed eight stages were identified and only one stage was found in a section of the seminiferous tubule, as observed in the majority of the mammals, with the exception of hominids (Russel et al., 1990). In primate-hominids, two or more stages are present in the same section of the seminiferous tubule, in a helical spiral arrangement (Wistuba et al., 2003; Leal and França, 2006).

The seminiferous epithelium cycle is very similar in *A. lituratus*, *A. planirostris*, *C. perspicillata*, *P. lineatus* and *S. lilium*. It is also very similar to the cycle of other mammals, such as the puma (Leite et al., 2006), wolf (Bitencourt et al., 2007), mules and donkeys (Neves et al., 2002) and other bats (Saidapur and Patil, 1992; Morigaki et al., 2001). In all these species, disregarding the number of stages which each species presents, it was found that spermiation is followed by the initiation of the elongation of the spermatids and the entry of type B spermatogonia into the meiotic prophase. These features demonstrate that these are possibly common and basal characteristics (plesiomorphic), which have been conserved in the different mammalian groups. The helical spiral arrangement observed in primate-hominids is therefore probably an apomorphic character.

The occurrence of variations in the composition and function of the seminiferous epithelium with regard to the annual breeding cycle in bats has been described specifically for hibernating bats. A process of degeneration of spermatogenic cells in the seminiferous tubules occurs prior to hibernation, after which, the spermatogenic process is re-started by elevated levels of testicular and plasma testosterone that induces an over-production of new spermatogenic cells (Racey, 1974; Lee, 2003; Lee and Mori, 2004; Sharifi et al., 2004). In tropical bats, the reproductive cycles are closely associated with the rainy season and, although the greatest stimulus (peak of testosterone hormone) is generally linked to the breeding phase, slight variations in testicular size have been observed throughout the year (Zortéa, 2003).

All the species analyzed in the present study are polyestrous (Goodwin and Greenhall, 1961; Tamsitt and Valdivieso, 1965; Carter, 1970) and some of them copulated twice in the year, but no significant differences were observed in the composition of the seminiferous epithelium.

Myotis nigricans, unlike the other *Myotis* species, such as *M. macrodactylus*, which hibernates and suffers a degeneration of the spermatogenic cells (Lee, 2003), presents active testes through the year (Wilson and Findley, 1971), and exhibits asynchrony in spermatogenesis. This asynchrony observed in the seminiferous epithelium cycle of *M. nigricans* can be interpreted as being due to over-hormonal stimulation, in which the seminiferous tubules are stimulated to develop more than one generation of spermatogenic cells at the same time. The stimuli may be a consequence of the short period of phylogenetic divergence between the species of *Myotis* and the development of new sites for the beginning of the meiotic prophase is an adaptation to tropical habitats, since there is no hibernation phase.

The frequencies of the stages and phases of the cycle presented a similar pattern for all the species analyzed. Stage 5 had the highest frequency and stage 4 the lowest; the most extensive was the post-meiotic phase (more than 50%) and the least was the meiotic phase (less than 10%).

The frequency of the stages is directly correlated with the time of differentiation of the predominant germ cell, and is a characteristic which, in mammals, must be phylogenetically determined within the members of a single family (França and Cardoso, 1998; França and Russell, 1998; França et al., 1999; Paula et al., 1999; Neves et al., 2002; França and Godinho, 2003; Leal and França, 2006). In the megachiropteran bats, *Pteropus poliocephalus* and *Rousettus leschenaulti*, an equilibrium between the pre-meiotic and post-meiotic phases has been observed (McGuckin and Blackshaw, 1987; Saidapur and Patil, 1992). On the other hand, in the *Rhinopoma kinneari* species (Singwi and Lall, 1983) and in the species analyzed in the present study, both microchiropterans, a higher frequency was observed in the post-meiotic phase, with

more than 50% of the frequency, and a lower meiotic frequency, below 10%. These results are in accordance with the literature.

Little correlation was found between heterochromatic regions and DNA concentration. Only in step 1 spermatids (Sd₁) the heterochromatic regions also correspond to regions of DNA concentration. In type A_p and B spermatogonia and Sertoli cells, heterochromatic regions were not related to DNA concentration, possibly being able to be formed solely by the large protein concentration that inactivates the genes present.

The comparisons of the characteristics observed in the six species of bats analyzed revealed the great similarity between *A. lituratus* and *A. planirostris* and between these and *P. lineatus*, *C. perspicillata* and *S. lilium*. The great similarity between the species of *Artibeus* may possibly be due to their phylogenetic proximity and shorter period of divergence, when compared with other species of the family, such as *P. lineatus*, *C. perspicillata* and *S. lilium*, which share a common ancestral with the *Artibeus* species (Wetterer et al., 2000).

M. nigricans was the most differentiated species, presenting a unique characteristic in relation to its morphology and also to its seminiferous epithelium cycle. The differences found in *M. nigricans* may be due to its larger phylogenetic distance. It belongs to another family (Vespertilionidae), and has diverged for a longer period than the phyllostomid species.

With this study, we may observe that the reproductive characteristics of the bats are quite complex and diverse, differing among species that have longer period of phylogenetic divergence. Thus, due to the multi-factors that affect the biology of bats, the reproductive analysis is interesting, both to obtain data for phylogenetic analysis and

to discover new reproductive patterns, how the *M. nigricans* observed in the present study.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Sonia Maria Oliani and Dr Sebastião Roberto Taboga for the use of their laboratories and equipment, and to Luiz Roberto Falleiros Junior for the technical assistance. The scholarship awarded to Mateus Rodrigues Beguelini by the Brazilian Research Foundation (CAPES) is also gratefully acknowledged. Financial support from the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) and the Brazilian Research Foundation (CAPES) is gratefully acknowledged.

References

- Bakst, M.R., Akuffo, V., Trefil, P., Brillard, J.P., 2007. Morphological and histochemical characterization of the seminiferous epithelial and Leydig cells of the turkey. *Anim. Reprod. Sci.* 97, 303-313.
- Berndtson, W.E., 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J. Anim. Sci.* 44, 818-883.
- Bitencourt, 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 spermatogenic production in the adult maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811). *Micron* 38, 584-589.
- Bradbury, J., Vehrencamp, S., 1977. Social organization and foraging in emballonurid bats. III. Mating systems. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 2, 1-17.
- Carter, D.C., 1970. Chiropteran Reproduction. In: Slaughter, B.H., Walton, D.W. (Eds.), *About Bats: A chiropteran biology symposium*. Southern Methodist University Press, Dallas, pp. 233-246.

- Cavazos, L.F., Melampy, R.M., 1954. A comparative study of periodic acid reactive carbohydrates in vertebrates. *Am. J. Anat.* 95, 467-497.
- Cavicchia, J.C., Dym, M., 1978. Ultrastructural Characteristics of Monkey Spermatogonia and Preleptotene Spermatocytes. *Biol. Reprod.* 18, 219-228.
- Chiarini-Garcia, H., Russell, L.D., 2002. Characterization of mouse spermatogonia by transmission electron microscopy. *Reproduction* 123, 567-577.
- Chiarini-Garcia, H., Raymer, A.M., Russell, L.D., 2003. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction* 126, 669-680.
- Chiarini-Garcia, H., Hornick, J.R., Griswold, M.D., Russell, L.D., 2001. Distribution of Type A Spermatogonia in the Mouse Is Not Random. *Biol. Reprod.* 65, 1179-1185.
- Clermont, Y., Leblond, C.P., 1955. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the 'periodic acid-Schiff' technique. *Am. J. Anat.* 96, 229-253.
- Costa, D.S., Paula, T.A.R., 2003. Espermatogênese em mamíferos. *Scientia Vila Velha* 4, 53-72.
- de Rooij, D.G., 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121, 347-354.
- de Rooij, D.G., Van Alphen, M.M.A., Van de Kant, H.J.G., 1986. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and its stages in the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Biol. Reprod.* 35, 587-591.
- Ehmcke, J., Luetjens, C.M., Schlatt, S., 2005. Clonal organization of proliferating spermatogonial stem cells in adult males of two species of non-human primates, *Macaca mulatta* and *Callithrix jacchus*. *Biol. Reprod.* 72, 293-300.

- Fleming, T.H., Hooper, E.T., Wilson, D.E., 1972. Three Central American bat communities: structure, reproductive cycles and movement patterns. *Ecology*. 53, 555-569.
- Foreman, D., 1997. Seminiferous tubule stages in the prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) during the annual breeding cycle. *Anat. Rec.* 247, 355-367.
- França, L.R., Cardoso, F.M., 1998. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boars. *Tissue Cell* 30, 573–582.
- 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, 1554-1561.
- França, L.R., Russell, L.D., 1998. The testis of domestic mammals. In: Regadera, J., Martinez-Garcia, F. (Eds.), *Male Reproduction. A Multidisciplinary Overview*. Churchill Livingstone, Madrid, pp. 197–219.
- França, L.R., Becker-Silva, S.C., Chiarini-Garcia, H., 1999. The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). *Tissue Cell* 31, 274–280.
- Garcia-Gil, N., Pinart, E., Sancho, S., Badia, E., Bassols, J., Kádár, E., Briz, M., Bonet, S., 2002. The cycle of the seminiferous epithelium in Landrace boars. *Anim. Reprod. Sci.* 73, 211-225.
- Gardner, P.J., 1966. Fine structure of the seminiferous tubule of the Swiss mouse. 2. The spermatid. *Anat. Rec.* 155, 235-249.
- Góes, R.M., Dolder, H., 2002. Cytological steps during spermiogenesis in the house sparrow (*Passer domesticus*, Linnaeus). *Tissue Cell*. 34, 273-282.
- Goodwin, G.G., Greenhall, A.M., 1961. A review of the bats of Trinidad and Tobago. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 122, 187-302.

- Gunawardana, V.K., 1977. Stages of spermatids in the domestic fowl: A light microscope study using Araldite sections. *J. Anat.* 123, 351-360.
- Happold, D.C., Happold, M., 1989. Reproduction of Angola free-tailed bats (*Tadarida condylura*) and little free-tailed bats (*Tadarida pumila*) in Malawi (Central Africa) and elsewhere in Africa. *J. Reprod. Fertil.* 85, 133-149.
- 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, 765-773.
- Krutzsch, P.H., 1975. Reproduction of the canyon bat, *Pipistrellus hesperus*, in Southwestern United States. *Amer. J. Anat.* 143, 163-200.
- Krutzsch, P.H., Crichton, E.G., 1987. Reproductive biology of the male little mastiff bat, *Mormopterus planiceps* (Chiroptera: Molossidae), in Southeast Australia. *Amer. J. Anat.* 178, 352-368.
- Krutzsch, P.H., Watson, R.H., Lox, C. D., 1976. Reproductive biology of the male leaf-nosed bat, *Macrotus waterhousii* in Southwestern United States. *Anat. Rec.* 184, 611-635.
- 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. N.Y. Acad. Sci.* 55, 548-584.
- Lee, J. H., 2003. Cell differentiation and ultrastructure of the seminiferous epithelium in *Myotis macrodactylus*. *Kor. J. Elec. Mic.* 33(1), 25-39.
- Lee, J.H., Mori, T., 2004. Annual cycle of the seminiferous epithelium of *Myotis macrodactylus*. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 49(2), 355-365.

- Leite, F.L.G., 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, 307-316.
- Lin, M., Jones, R.C., 1992. Renewal and proliferation of spermatogonia during spermatogenesis in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. Cell Tissue Res. 267, 591-601.
- Lin, M., Jones, R.C., 1993. Spermiogenesis and spermiation in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). J. Anat. 183, 525-535.
- Lin, M., Jones, R.C., 2000. Spermiogenesis and spermiation in a monotreme mammal, the platypus, *Ornithorhynchus anatinus*. J. Anat. 196, 217-232.
- Lin, M., Harman, A., Rodger, J.C., 1997. Spermiogenesis and spermiation in a marsupial, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). J. Anat. 190, 377-395.
- Matsumoto, A.M., 1996. Spermatogenesis. Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 17, 359-384.
- McGuckin, M.A., Blackshaw, A.W., 1987. Cycle of the seminiferous epithelium in the grey-headed fruit bat, *Pteropus poliocephalus*. Aus. J. Biol. Sci. 40, 203-210.
- Mello, M.L.S., Vidal, B.C., 1980. Práticas de Biologia Celular. FUNCAMP. Editora Edgard Blücher LTDA, Campinas – SP, 71p.
- Miller, R.E., 1939. The reproductive cycle in male bats of the species *Myotis lucifugus lucifugus* and *Myotis grisescens*. J. Morphol. 64, 267-295.
- Morigaki, T., Kurohmaru, M., Kanai, Y., Mukohyama, M., Hondo, E., Yamada, J., Agungpriyono, S., Hayashi, Y., 2001. Cycle of the seminiferous epithelium in the Java Fruit Bat (*Pteropus vampyrus*) and the Japanese Lesser Horseshoe Bat (*Rhinolophus cornutus*). J. Vet. Med. Sci. 63(7): 773-779.

- Muñoz, E.M., Fogal, T., Dominguez, S., Scardapane, L., Guzmán, J., Cavicchia, J.C., Piezzi, R.S., 1998. Stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the Viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Anat. Rec.* 252, 8-16.
- Neves, E.S., Chiarini-Garcia, H., França, L.R., 2002. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. *Biol. Reprod.* 67, 247-255.
- Ojoo, R.O., Otiang'a-Owiti, G.E., Oduor-Okelo, D., Onyango, D.W., 2005. Frequency of stages of the seminiferous cycle in the thick-tailed bush baby (*Otolemur garnetti*), a prosimian primate: possible phylogenetic implications? *Anat. Embryol.* 209, 381-389.
- Osman, D.I., Plöen, L., 1986. Spermatogenesis in the camel (*Camelus dromedarius*). *Anim. Reprod. Sci.* 10, 23-36.
- Paula, T.A.R., 1999. Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). In: Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, 84 pp.
- Racey, P.A., 1974. The reproductive cycle in male noctule bats, *Nyctalus noctula*. *J. Reprod. Fertil.* 41, 169-182.
- Ribeiro, M.G., Lima, S.R., 2000. Iniciação às técnicas de preparação de material para o estudo e pesquisa em morfologia. SEGRAC – Editora e Gráfica Limitada, Belo Horizonte – MG, 106p.
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha-Hikim, A.P., Clegg, E.D., 1990. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Cache River Press, Clearwater, FL.
- 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, 1037-1044.
- Sharifi, M., Ghorbani, R., Akmal, V., 2004. Reproductive cycle in *Pipistrellus kuhlii* (Chiroptera, Vespertilionidae) in western Iran. Mammalia. 68(4), 323-327.
- Singwi, M.S., Lall, S.B., 1983. Spermatogenesis in the non-scrotal bat – *Rhinopoma kinneari* Wroughton (Microchiroptera: Mammalia). Acta Anat. 116, 136-145.
- Smithwick, E.B., Young, L.G., Gould, K.G., 1996. Duration of spermatogenesis and relative frequency of each stage in the seminiferous epithelial cycle of the chimpanzee. Tissue Cell. 28, 357-366.
- Taddei, V.A., 1976. The reproduction of some Phyllostomidae (Chiroptera) from the northwestern region of the State of São Paulo. Biol. Zool. Univ. São Paulo. 1, 313-330.
- Taddei, V.A., 1980. Biologia reprodutiva de Chiroptera: perspectivas e problemas. Inter-Facies, Escr. Doc. 6, 1-18.
- Tamsitt, J.R., Valdivieso, D., 1965. The male reproductive cycle of the bat *Artibeus lituratus*. Amer. Midland Nat. 73, 150-160.
- Van der Merwe, M., Rautenbach, I.L., 1987. Reproduction in Schlieffen's bat, *Nycticeius schlieffenii*, in the eastern Transvaal lowveld, South Africa. J. Reprod. Fertil. 81, 41-50.
- Van der Merwe, M., Rautenbach, I.L., 1990. Reproduction in the rusty bat, *Pipistrellus rusticus*, in the northern Transvaal bushveld, South Africa. J. Reprod. Fertil. 89, 537-542.
- Van Haaster, L.H., de Rooij, D.G., 1993. Cycle of the seminiferous epithelium in the Djungarian Hamster (*Phodopus sungorus sungorus*). Biol. Reprod. 48, 515-521.

- Wetterer, A.L., Rockman, M.V., Simmons, N.B., 2000. Phylogeny of Phyllostomid bats (Mammalian: Chiroptera): Data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 248, 200 pp.
- Wilson, D.E., Findley, J.S., 1971. Spermatogenesis in some Neotropical species of *Myotis*. *J. Mamm.* 52(2), 420-426.
- Wistuba, J., Schrod, A., Greve, B., Hodges, J.K., Aslam, H., Weinbauer, G.F., Luetjens, C.M., 2003. Organization of Seminiferous Epithelium in Primates: Relationship to Spermatogenic Efficiency, Phylogeny, and Mating System. *Biol. Reprod.* 69, 582-591.
- Zortéa, M., 2003. Reproductive patterns and feeding habits of three nectarivorous bats (Phyllostomidae: Glossophaginae) from the Brazilian cerrado. *Braz. J. Biol.* 63(1), 159-168.

Fig. 1 General arrangement of the testicular epithelium of *Platyrrhinus lineatus*, Hematoxylin-Eosin stained. **A.** Interstitium compartment with Leydig cells (L_y) with numerous lipid droplets. **B.** Sertoli cells (S) with asymmetrical nucleus and a single nucleolus. **C.** Type A_d spermatogonia closely apposed to the basal lamina with deeply stained nucleus and chromatin partially condensed. **D.** Type A_p spermatogonia with pale and oval nucleus, B spermatogonia with round and dark nucleus and Sertoli cell (S). **E.** Mitosis cell (M), spermatocytes undergoing transition from leptotene/zygotene (L/Z) and diplotene (D). **F.** Step 1 spermatids (Sd_1) with round nuclei and only one nucleolus. **G.** Step 2 spermatids (Sd_2) beginning the chromatin condensation. **H.** Step 3 spermatids (Sd_3) beginning the nuclear elongation and the flagellum formation (arrow). **I.** Step 4 spermatids (Sd_4) with larger proximal nuclear elongation. **J.** Step 5 spermatids (Sd_5) with a central and distal condensation of the nucleus. **K.** Step 6 (Sd_6) spermatids with elongated nuclei and a greater portion of the flagellum (arrow). **L.** Step 7 spermatids ready to be released and residual bodies (arrows). Bars = 10 μm .

Fig. 2 General arrangement of the testicular epithelium of *Artibeus lituratus* (A), *Carollia perspicillata* (B), *Sturnira lilium* (C) and *Myotis nigricans* (D-F), Hematoxylin-Eosin stained. **A.** Type A_p spermatogonia with a single great nucleolus, type B spermatogonia, step 1 spermatids (Sd_1) with one to three nucleoli and step 7 spermatids (Sd_7). **B.** A_p spermatogonia and step 1 spermatids (Sd_1) with a single nucleolus. **C.** Step 3 spermatids (Sd_3) with asymmetrical shapes **D.** More elongated Sertoli cells (S). **E.** Step 2 spermatids (Sd_2) with distal nuclear elongation and step 1 spermatids (Sd_1). **F.** Step 7 spermatids (Sd_7) more elongated than the other species. Bars = 10 μm .

Fig. 3 Photographic mounting showing the eight stages of the seminiferous epithelium cycle in *Platyrrhinus lineatus*, Hematoxylin-Eosin stained. Type A_d spermatogonia (A_d); Type A_p spermatogonia (A_p); Type B spermatogonia (B); Pre-leptotene spermatocyte (Pl); Spermatocyte undergoing transition from leptotene/zygotene (L/Z); Zygotene spermatocyte (Z); Pachytene spermatocyte (P); Diplotene spermatocyte (D); Metaphasic figure (M); Step 1 spermatids (Sd₁); Step 3 spermatids (Sd₃); Step 4 spermatids (Sd₄); Step 5 spermatids (Sd₅); Spermatids undergoing transition from step 5 to step 6 (Sd₅₋₆); Step 6 spermatids (Sd₆); Spermatids undergoing transition from step 6 to step 7 (Sd₆₋₇); Step 7 spermatids (Sd₇). Bars = 10 µm.

Fig. 4 Diagram showing the composition of the seminiferous epithelium and the frequency (%) of each stage of the seminiferous epithelium cycle of *Platyrrhinus lineatus*. The Roman numbers indicated the spermatogenic cycle. The space given to each stage is proportional to its frequency. Type A spermatogonia; type B spermatogonia; pre-leptotene spermatocyte (Pl); leptotene spermatocyte (L); zygotene spermatocyte (Z); pachytene spermatocyte (P); diplotene spermatocyte (D); secondary spermatocyte (II); step 1 spermatid (Sd₁); step 2 or 3 spermatid (Sd₂₋₃); step 4 spermatid (Sd₄); step 5 spermatid (Sd₅); step 5 or 6 spermatid (Sd₅₋₆); step 6 spermatid (Sd₆); step 6 or 7 spermatid (Sd₆₋₇); step 7 spermatid (Sd₇).

Fig. 5 Seminiferous epithelium cycle in *Myotis nigricans*, Hematoxylin-Eosin stained. **A.** Stage 1 containing pre-leptotene spermatocytes (Pl), pachytene spermatocytes (P) and step 1 spermatids (Sd₁). **B.** Stage 6 with pachytene spermatocytes (P), step 1 spermatids (Sd₁), step 6 spermatids and presenting the production of pre-leptotene spermatocytes (Pl). **C.** Stage 7 with pachytene spermatocytes (P), step 1 spermatids

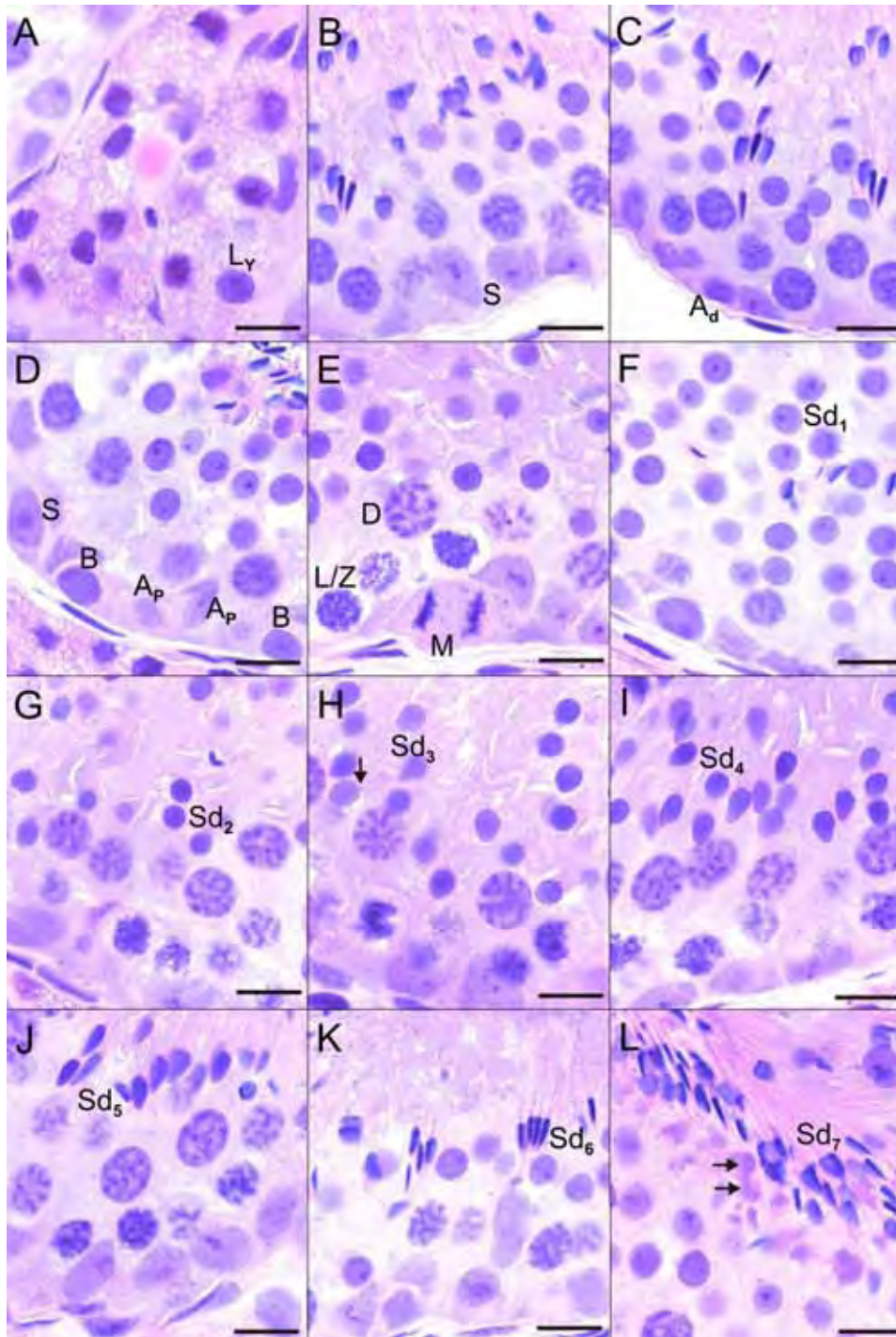
(Sd₁), spermatids undergoing transition from 6-7 steps and presenting the production of pre-leptotene spermatocytes (Pl). **D.** Overlapping of stages with two spermatocyte generations (pre-leptotene (Pl) and pachytene (P) spermatocytes) associated with two spermatid generations (step 1 (Sd₁) and step 6-7 spermatids (Sd₆₋₇)). **E.** Overlapping of stages with two spermatocyte generations (pre-leptotene (Pl) and pachytene (P) spermatocytes) associated with three spermatid generations (step 1 (Sd₁), step 2 (Sd₂) and step 6-7 spermatids (Sd₆₋₇)). **F.** Stage with only pre-leptotene spermatocytes (Pl) and two spermatid generations (step 1 (Sd₁) and step 6 spermatids (Sd₆)). Bars = 20 µm.

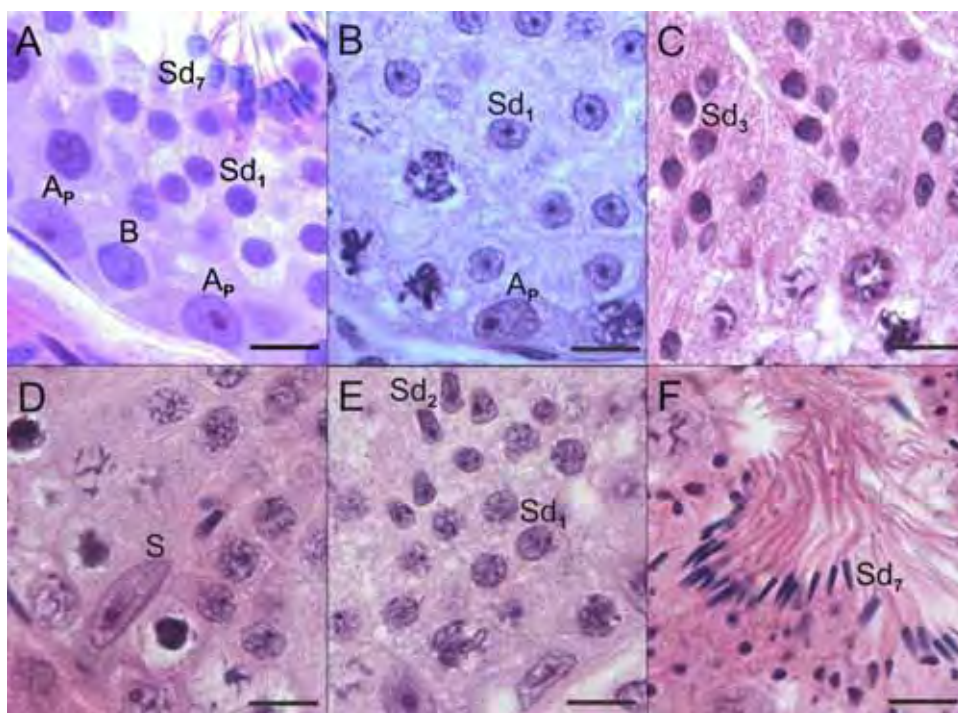
Fig. 6 Diagram showing the composition of the seminiferous epithelium of *Myotis nigricans*. The Roman numbers indicated the spermatogenic cycle. Type A spermatogonia; type B spermatogonia; pre-leptotene spermatocyte (Pl); leptotene spermatocyte (L); zygotene spermatocyte (Z); pachytene spermatocyte (P); diplotene spermatocyte (D); secondary spermatocyte (II); step 1 spermatid (Sd₁); step 2 or 3 spermatid (Sd₂₋₃); step 4 spermatid (Sd₄); step 5 spermatid (Sd₅); step 5 or 6 spermatid (Sd₅₋₆); step 6 spermatid (Sd₆); step 6 or 7 spermatid (Sd₆₋₇); step 7 spermatid (Sd₇).

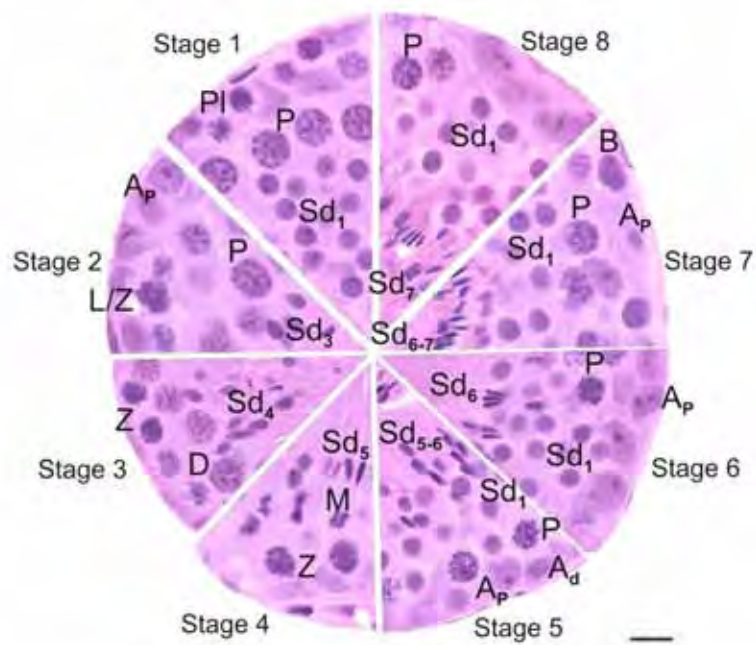
Fig. 7 General arrangement of the testicular epithelium of *Platyrrhinus lineatus* submitted to Toluidine Blue stain. **A.** Leydig cells (L_y) with one or two large heterochromatic regions and some small points. **B.** Sertoli cells (S) presenting euchromatic nuclei with only one large heterochromatic region. **C.** Type A_d spermatogonia with highly stained nucleus. **D.** Two shapes of type A_p spermatogonia, one with euchromatic nucleus and another presenting one or two large heterochromatic regions. **E.** Type B spermatogonia with a highly stained nucleus. **F.** Step 1 spermatid (Sd₁) with prevalence of euchromatin, with a single distinctive heterochromatic region.

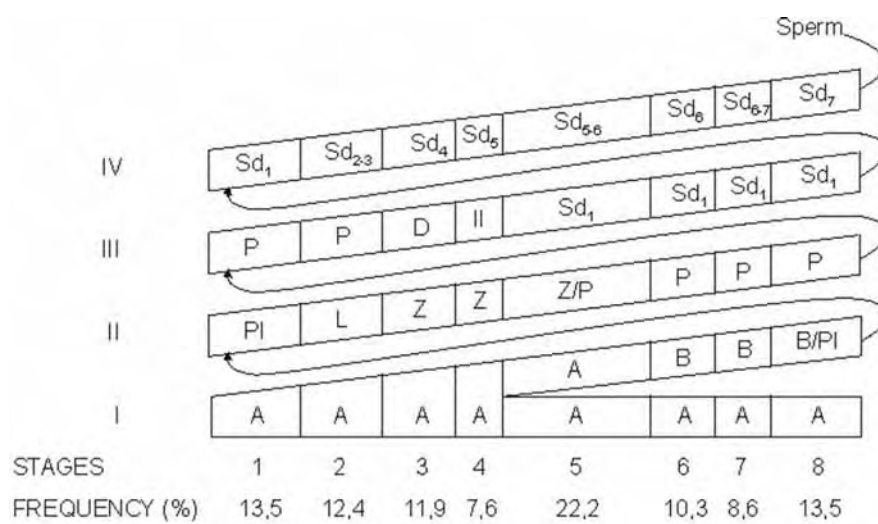
G. Step 2 spermatid (Sd₂) highly stained. **H.** Step 3 spermatid (Sd₃). **I.** Step 4 spermatid (Sd₄) with a proximal region paler than the distal region. **J.** Step 5 spermatid (Sd₅). **K.** Step 6 spermatid (Sd₆) with longer and darker stained nuclei. **L.** Step 7 spermatid (Sd₇) with strong metachromasy, and the presence of residual bodies (arrows). Bars = 10 µm.

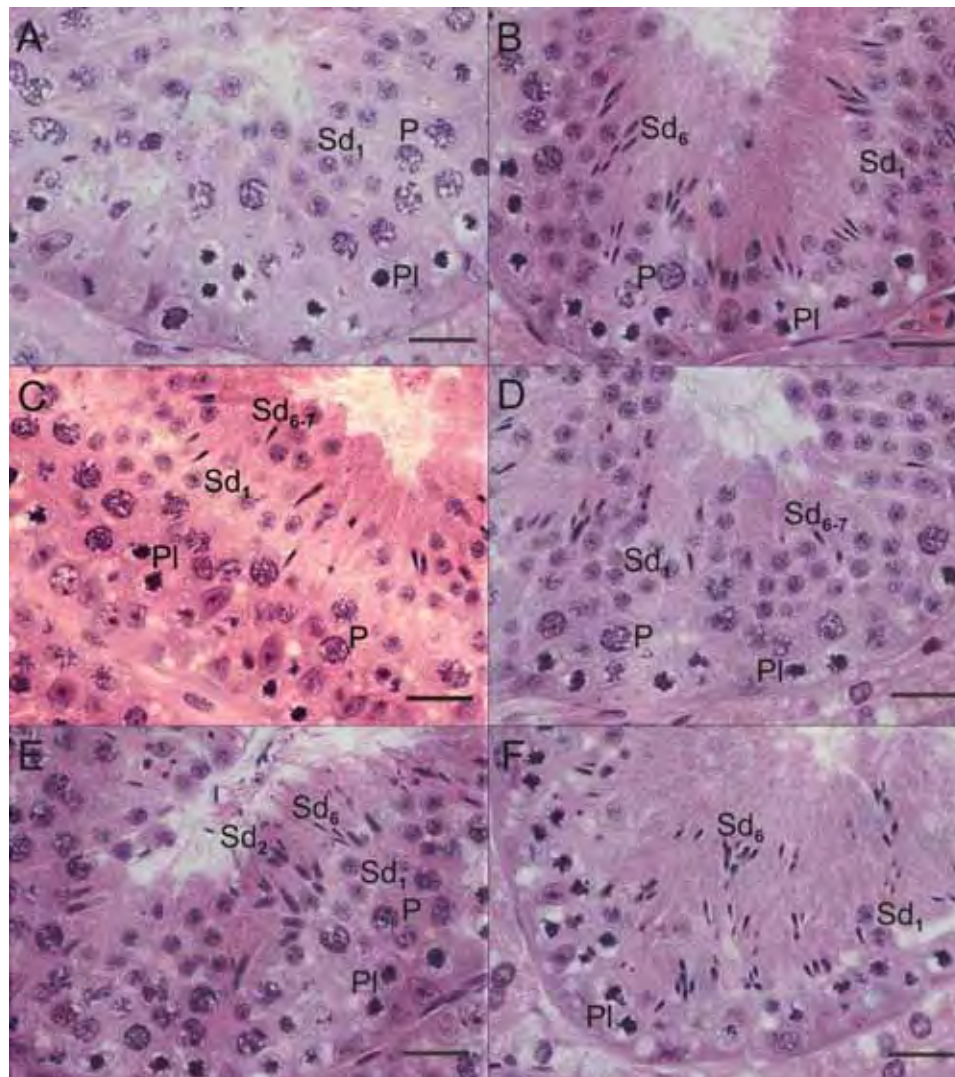
Fig. 8 General arrangement of the testicular epithelium of *Platyrrhinus lineatus* submitted to Feulgen reaction. **A.** Leydig cells (L_y) with uniformly pale nuclei, only with some small darker points. **B.** Sertoli cells (S) with uniformly pale nuclei. **C.** Type A_d spermatogonia with highly stained nucleus. **D.** Type A_p spermatogonia with uniformly stained nuclei. **E.** Type A_p spermatogonia presenting DNA partially compacted, with darker points. **F.** Type B spermatogonia. **G.** Step 1 spermatids (Sd₁) presented pale nuclei, with only one darker point. **H.** Step 2 spermatids (Sd₂) with stronger coloration. **I.** Step 3 spermatids (Sd₃). **J.** Step 4 spermatids (Sd₄) with a proximal nuclear coloration clearer than the distal region. **K.** Step 5 spermatids (Sd₅) with the distal nuclear region highly stained. **L.** Step 6 spermatids (Sd₆) with elongated nuclei. **M.** Step 7 spermatids (Sd₇) highly stained and ready to be released. Bars = 10 µm.

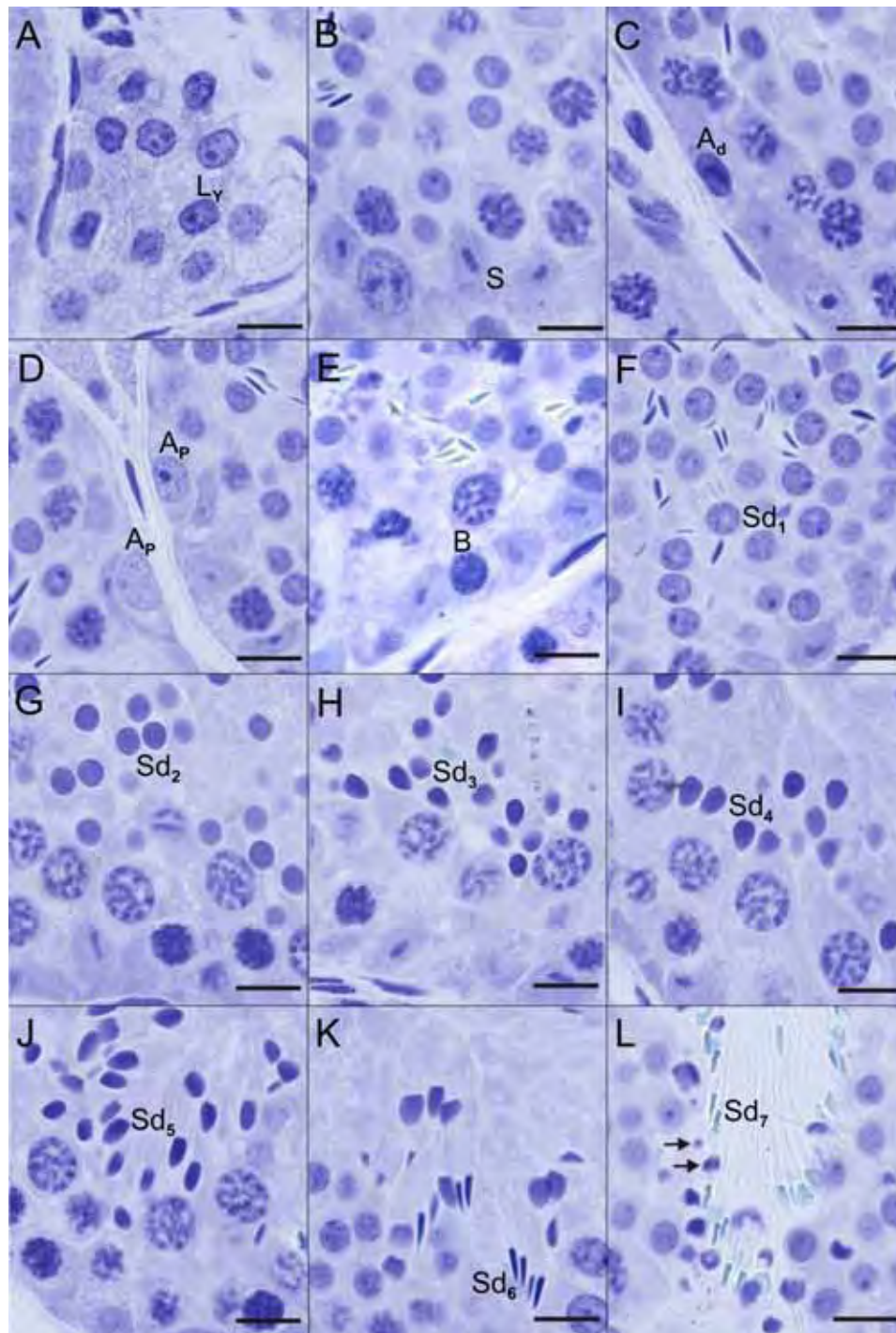












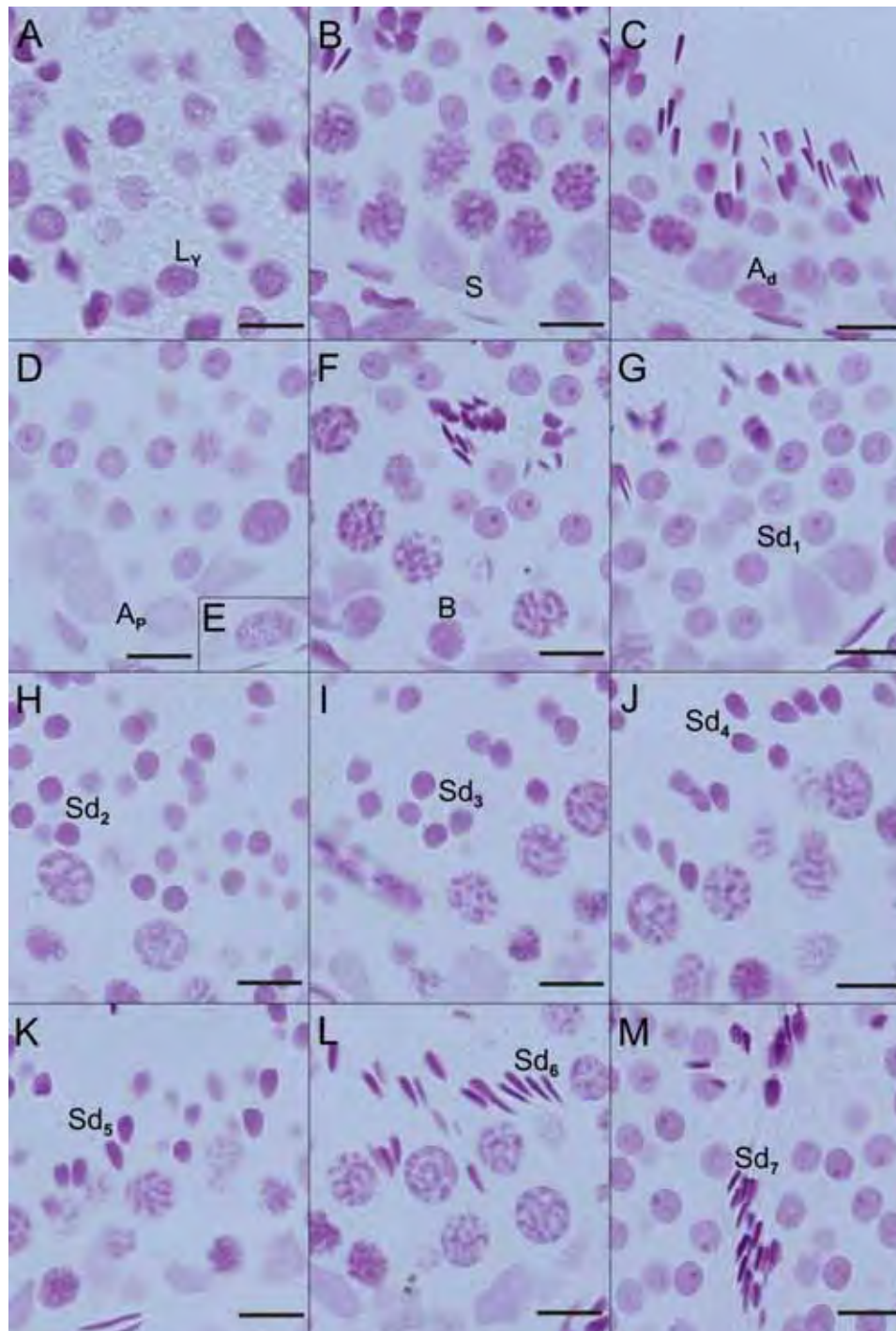


Table 1 Relative frequencies (%) of the eight stages of the seminiferous epithelium cycle in the five species of phyllostomid bats: *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Platyrrhinus lineatus* and *Sturnira lilium*.

Stages	<i>A. lituratus</i>	<i>A. planirostris</i>	<i>C. perspicillata</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>S. lilium</i>
1	8.1	8.5	16.5	13.5	14
2	15.6	19	8.5	12.4	13.5
3	12.6	9.5	8.5	11.9	9.1
4	9.5	4.5	5.5	7.6	6.4
5	24.2	26	25.5	22.2	21.8
6	9.5	17.5	12	10.3	20.5
7	9.5	6.5	17.5	8.6	7
8	11	8.5	6	13.5	7.7

Table 2 Relative frequencies (%) of the pre-meiotic, meiotic and post-meiotic phases of the seminiferous epithelium cycle in the five species of Phyllostomidae: *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Platyrrhinus lineatus* and *Sturnira lilium*.

Stages	<i>A. lituratus</i>	<i>A. planirostris</i>	<i>C. perspicillata</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>S. lilium</i>
PM	36.3	37	33.5	37.8	36.6
M	9.5	4.5	5.5	7.6	6.4
PtM	54.2	58.5	61	54.6	57

PM - Pre-meiotic phase; M - Meiotic phase; PtM - Post-meiotic phase.

IV. ARTIGO 2

Variação na morfologia, arranjo das estruturas e expressão nucleolar das células de Sertoli em espécies de morcegos

Mateus Rodrigues Beguelini^a, Karina de Cássia Faria^b, Paula Renata Lopes Moreira^a,

Sandra Regina de Carvalho Marchesin^a, Eliana Morielle Versute^a

^a*Laboratório de Chiroptera, Departamento de Zoologia e Botânica, UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil 15054-000*

^b*Universidade do Estado do Mato Grosso – UNEMAT, Nova Xavantina, Mato Grosso, Brasil 78690-0001.*

Corresponding author. Tel.: +55 17 32212369. FAX: + 55 17 32212374

E-mail address: morielle@ibilce.unesp.br (Eliana Morielle-Versute)

Resumo

A célula de Sertoli desempenha uma função auxiliar crucial na espermatogênese. Devido à sua importância funcional e aos vários mecanismos que regula, é esperado que diferenças morfo-fisiológicas sejam pequenas ou inexistentes e que espécies proximamente relacionadas apresentem células de Sertoli com características similares. Baseado nisso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a forma e o comportamento dos nucléolos das células de Sertoli de 10 espécies de morcegos de três famílias, por meio das técnicas de impregnação por nitrato de prata (Ag-NOR) e alaranjado de acridina. O nucléolo das células de Sertoli das espécies de Phyllostomidae apresentaram um único e bem distinto nucléolo formado pela interação das RONS em um único ponto. O padrão de expressão é periférico e a relação de área nucleolar/área nuclear varia de acordo com o número de RONS que cada espécie apresenta. As espécies de Molossidae, *Cynomops planirostris* e *Molossus rufus*, tem padrão semelhante ao de Phyllostomidae, mas *Molossus molossus* se diferencia dos demais, tanto qualitativa quanto quantitativamente. Essa diferenciação, possivelmente, se deve a uma regulação fisiológica exclusiva de *M. molossus*. Os vespertilionídeos apresentam características morfológicas únicas e também uma maior relação de área nucleolar/área nuclear. O padrão nucleolar das células de Sertoli variou entre as diferentes famílias de morcegos e, dentro de uma mesma família. O padrão de variação é influenciado pelo número de RONS que as espécies apresentam, assim como pelo momento fisiológico da célula e do ciclo espermatogênico.

Palavras-chave: célula de Sertoli, Nucléolo, RON, FISH, Chiroptera.

Introdução

O relacionamento evolutivo dos diferentes táxons de Chiroptera tem sido avaliado utilizando-se diferentes conjuntos de caracteres que envolvem especialmente a análise de

aspectos morfológicos, moleculares, citogenéticos, entre outros (Pettigrew 1986; Simmons 1994, 1995; Nikkaido et al. 2000; Van Den Bussche et al. 2004).

Apesar de que uma avaliação conjunta das informações possa melhorar as interpretações, nem sempre é isso que se verifica, pois alguns caracteres são tão variados e diferentes a ponto de complicar as análises quando utilizados juntos ou, por outro lado, podem variar muito pouco, não fornecendo qualquer informação que auxilie nas interpretações evolutivas e na determinação do relacionamento existente entre os diferentes táxons.

Um interessante exemplo desta última situação é observado no gênero *Myotis* de Chiroptera, gênero com a maior representação em Chiroptera, onde nas análises morfológicas e citogenéticas das cerca de 90 espécies do gênero, evidenciou-se que, além de apresentarem grande semelhança morfológica, apresentam também intenso conservacionismo cariotípico, evidenciado não só no número e morfologia dos cromossomos ($2n = 44$ e $NF = 50$ ou 52), mas também no padrão de bandas G, número e posição das regiões organizadoras nucleolares (RON) e localização da heterocromatina constitutiva (Bickham et al. 1986; Andrade et al. 1995; Marchesin 2002).

Em situações como essa é interessante e necessário a caracterização de outros aspectos que poderiam ser associados aos já descritos (morfológico, genético, citogenético, molecular e ecológico) podendo assim, auxiliar na identificação e diferenciação das espécies e substanciar hipóteses de relacionamento evolutivo mais robustas.

Do ponto de vista citogenético, uma característica pouco estudada em Chiroptera é a relativa à espermatogênese, que é um processo cíclico e altamente coordenado no qual espermatogônias diplóides se diferenciam em espermatozóides haplóides (França et al. 1999). Esse processo de proliferação e diferenciação das células germinativas masculinas ocorre em contato contínuo com uma célula somática, a célula de Sertoli (Enders e Millette 1988).

A célula de Sertoli apresenta um papel central no desenvolvimento de um testículo funcional e também na expressão do fenótipo masculino. Elas são as primeiras células a se diferenciarem na gônada fetal indiferenciada, um evento que promove a formação do cordão seminífero, previne a entrada das células germinativas em meiose e diferenciação e também estimula a regressão dos ductos Mullerianos via secreção de hormônio anti-Mulleriano (Mackay 2000; Josso et al. 2001). Durante a puberdade, suas funções mudam e essas células passam a ser a principal fonte reguladora da espermatogênese, recebendo sinais endócrinos circulantes e fatores parácrinos das células de Leydig, peritubular e germinativas, integrando esses sinais, e secretando produtos que controlam o desenvolvimento das células germinativas e modulam a função de outras células testiculares, incluindo sua própria função (Matsumoto 1996).

Devido à importância funcional que as células de Sertoli apresentam e aos vários mecanismos que regula, é esperado que diferenças morfo-fisiológicas sejam pequenas ou inexistentes e que espécies proximamente relacionadas apresentem células de Sertoli com características similares. A análise de estruturas com características como as das células de Sertoli, ou seja conservacionismo, é interessante pois, quando forem observadas diferenças, essas poderão ser utilizadas como mais uma ferramenta de análise, caracterização e diferenciação de táxons.

Baseado nisso, o objetivo do presente estudo foi caracterizar as células de Sertoli de 10 espécies de morcegos pertencentes a três grandes famílias, Phyllostomidae, Molossidae e Vespertilionidae, quanto a aspectos morfológicos e de expressão do nucléolo e avaliar, através da impregnação por nitrato de prata (Ag-NOR) e a coloração com o alaranjado de acridina, o comportamento nucleolar durante a espermatogênese.

Materiais e Métodos

Animais

Foram avaliados dois espécimes, sexualmente maduros, das espécies *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Phyllostomus discolor* e *Platyrrhinus lineatus* (Phyllostomidae), *Molossus molossus* e *Molossus rufus* (Molossidae) e *Myotis nigricans* (Vespertilionidae), e um espécime das espécies *Cynomops planirostris* (Molossidae) e *Histiotus velatus* (Vespertilionidae). Os animais foram capturados com o uso de redes de espera na região urbana de São José do Rio Preto (São Paulo, Brasil). A fim de preservar os espécimes testemunhos, esses foram fixados, catalogados e depositados na coleção científica do laboratório de Chiroptera, IBILCE-UNESP.

Suspensão Meiótica

Após a morte do animal, que seguiu o método proposto por Oliveira-Filho (1999), os testículos foram removidos e macerados em placas de Petri contendo solução hipotônica de KCl (0,075 M) e colquicina (0,1%), onde permaneceram por 40 minutos a temperatura ambiente. A suspensão celular foi então centrifugada a 1000 rpm por 6 minutos, o sobrenadante descartado e de 7 a 9 ml de solução fixadora, metanol: ácido acético (3:1) foi adicionada por 15 minutos. A suspensão foi centrifugada e a solução fixadora trocada mais duas vezes. A suspensão final foi pingada sobre lâminas de vidro limpas e as células submetidas aos procedimentos de impregnação por nitrato de prata (Kavalco e Pazza 2004) ou coloração pelo alaranjado de acridina (Abrams et al. 1993).

Análise Qualitativa

Para a obtenção das características morfológicas (formato e composição) e de expressão nucleolares foram avaliadas para cada espécime 50 células de Sertoli. Nas espécies com um único espécime, 100 células foram analisadas. As células foram

analisadas em microscópio Zeiss com analisador de imagens Axiovision 3.1 para Windows acoplado.

Análise Quantitativa

As análises quantitativas foram realizadas com o intuito de investigar a capacidade nucleolar transcricional nas diferentes espécies analisadas, através da avaliação da relação de área nucleolar/área nuclear e da obtenção do índice densitométrico. Essas análises foram realizadas em fotomicroscópio Zeiss com analisador de imagens Axiovision 3.1 para Windows acoplado. Esse software foi utilizado na medição das áreas nuclear e nucleolar e também na análise densitométrica do nucléolo.

As medidas foram obtidas a partir das mesmas 50 células de Sertoli utilizadas na avaliação qualitativa, as quais foram submetidas à impregnação por nitrato de prata. Em espécies com um único espécime, 100 células de Sertoli foram analisadas.

A análise densitométrica corresponde a uma escala arbitrária (0 a 255) na qual 0 corresponde a pouco denso (branco) e 255 corresponde a muito denso (preto).

Resultados

As células de Sertoli de morcegos, assim como da maioria dos mamíferos, são células facilmente distinguíveis, sendo células grandes e disformes que apresentam núcleos bem maiores que os das células germinativas, com formato oval ou alongado e, na maioria das espécies, com um típico e grande nucléolo (Fig. 1).

Impregnação por íons prata

Em 100% das células de Sertoli das espécies *A. lituratus*, *A. planirostris*, *C. perspicillata*, *C. planirostris*, *M. rufus*, *P. discolor* e *P. lineatus* foi observado apenas um nucléolo, geralmente disforme e ocupando a área central (Fig. 2A - 2G). Nas células de *A.*

lituratus e *A. planirostris* de 4 a 6 subcomponentes menores e facilmente observáveis formam esse nucléolo único (Fig. 2A e B). A frequência no número de subcomponentes foi variável nas células, sendo em *A. lituratus* de 30% para 4 subcomponentes, 35% para 5 e 35% para 6 e de 25% para 4, 35% para 5 e 40% para 6 em *A. planirostris*. Nas células das espécies *C. perspicillata*, *C. planirostris* e *M. rufus* o nucléolo apresentou um formato mais bem definido, com aspecto circular e bem delimitado (Figs. 2C – 2E). Nas células de *P. discolor* e *P. lineatus* o nucléolo apresentou formato irregular e constituído de dois subcomponentes em 79% das células de *P. lineatus* (Fig. 2F) e em 56% das células de *P. discolor* (Fig. 2G).

Nas preparações de *M. molossus* foram observadas três situações para as células de Sertoli, onde 62% delas apresentaram duas marcações distintas e individualizadas na forma de dois nucléolos (Fig. 2H), em 32% das células um único nucléolo disforme e ocupando a área central e em 6% uma marcação difusa (Fig. 2I).

Em *H. velatus* o nucléolo das células de Sertoli apresentou formato irregular, com uma textura filamentar e ocupando boa área do núcleo (Fig. 2J).

Em *M. nigricans* quatro situações foram observadas, onde em 40% das células o nucléolo apresentou um formato irregular, espalhado e com uma textura filamentar (Fig. 2K), assim como o observado em *H. velatus*; em 36% das células foi observado um único nucléolo disforme ocupando boa parte da área central do núcleo; em 18% das células dois nucléolos (Fig. 2L) e em 6% das células uma marcação difusa.

Alaranjado de Acridina

As células de Sertoli coradas pelo alaranjado de acridina foram facilmente observadas apresentando-se claramente diferenciadas dos outros tipos celulares do epitélio seminífero, por possuírem núcleos grandes e disformes, coradas na sua maior parte em

vermelho (indicativo de concentração de DNA) e com marcações menores em amarelo, indicativas de regiões de acúmulo de RNAs (Fig. 3).

Nas espécies *A. lituratus*, *A. planirostris*, *C. perspicillata*, *C. planirostris*, *M. rufus* e *P. lineatus* 100% das células apresentaram uma única marcação fluorescente central localizada, possivelmente, sobre a área nucleolar (Figs. 4A - 4F). Na espécie *P. discolor* as células apresentaram em 71% delas, além da marcação central observada em todas as células, outras 1 a 4 pequenas marcações espalhadas (Fig. 4G).

Com frequências variadas no número de marcações, as células de Sertoli de *M. molossus* apresentaram três diferentes padrões, onde 54,8% das células apresentaram somente uma grande marcação central; 26,4% apresentaram duas marcações distintas (Fig. 4H) e 19% apresentaram a marcação fluorescente espalhada em torno do núcleo sem limites definidos e irregulares (Fig. 4I).

Nas células de Sertoli da espécie *H. velatus* o padrão foi nitidamente distinto, com 100% das células apresentando várias pequenas marcações fluorescentes de tamanhos variados e irregulares (Fig. 4J). As marcações apareceram em número de dois (37,6%), três (35,1%) e quatro ou mais (27,3%). Todas marcações estavam localizadas em área periférica ao nucléolo.

A espécie com maior variação foi *M. nigricans*, onde as células de Sertoli apresentaram quatro padrões distintos, com 61,2% das células apresentando somente pequenas marcações fluorescentes, estas de tamanhos variados (Fig. 4K), condição também observada em *H. velatus*; 24,5% apresentando células com somente uma única marcação central (Fig. 4L); 13% apresentando duas marcações e 1,3% apresentando marcações fluorescentes irregulares espalhadas em torno do núcleo e sem limites definidos.

Análise Quantitativa

As medidas tomadas relativas à relação de área nucleolar/área nuclear (Nu/N) e do índice densitométrico dos nucléolos, estão apresentadas na Tabela 1. Podemos observar que *C. perspicillata* foi a espécie que apresentou a menor porcentagem de Nu/N (4,5%) e também o menor índice densitométrico. *Platyrrhinus lineatus* e *P. discolor* apresentaram uma porcentagem de Nu/N bem próxima a dos molossídeos *C. planirostris* e *M. rufus*. *A. lituratus* e *A. planirostris* apresentaram uma maior porcentagem que as espécies anteriores, e essas estão bem próximas a de *M. molossus*. Já os vespertilionídeos apresentaram as maiores porcentagens de Nu/N, além de *H. velatus* possuir o segundo maior índice densitométrico (186,6), tendo em vista que o maior valor foi observado em *M. rufus*.

Discussão

Originalmente descrita por Enrico Sertoli em 1865, a célula de Sertoli desempenha uma função auxiliar crucial na espermatogênese (Petersen e Söder 2006). Essas células apresentam, geralmente, um único e grande nucléolo na maioria das espécies de mamíferos estudadas (Hodgson et al. 1979; Pawar e Wrobel 1991; Guttenbach et al. 1996). Nas espécies de morcegos estudadas a presença de um único nucléolo central foi à característica comum, no entanto, esse apareceu constituído por um número variável de subcomponentes. A individualização de subcomponentes na constituição do nucléolo dessas espécies é devida a características de arranjo das estruturas que compõem o nucléolo, e em especial das proteínas argirofílicas que nele estiverem presentes, uma vez que são elas que reagem com a prata.

Uma outra associação que pode ser feita quanto à variação na presença e número dos subcomponentes é de que eles parecem variar de acordo com o número de RONS que as espécies apresentam, pois a variação total ficou dentro do número de RONS que cada espécie apresenta, ou seja, um único componente para *C. perspicillata*, um ou dois para *P.*

discolor e *P. lineatus* e de quatro a seis para *A. lituratus* e *A. planirostris*, que apresentam respectivamente uma, duas e seis RONS. As exceções foram *C. planirostris* e *M. rufus*, que apesar de apresentarem duas RONS, apresentaram apenas um único componente. Apesar da variação de subcomponentes, a predominância de um único nucléolo na maioria das células reforça o evento de fusão das RONS durante a formação do nucléolo, que apresentou morfologia variada, o que possivelmente esta refletindo diferenças no arranjo das estruturas e na expressão gênica.

Mirre e Knibiehler (1982) observaram em ratos que, apesar de apresentar cinco pares de cromossomos com RONS, as células de Sertoli possuem um único nucléolo que também apresenta variação em seus subcomponentes. Eles observaram que o número de centros fibrilares varia de célula para célula e que quanto maior for o número de centros fibrilares ativos, maior será o tamanho nucleolar. No presente estudo observamos que o nucléolo das células de Sertoli variou não só em número de subcomponentes, mas também em morfologia e expressão.

O nucléolo com formato filamentar e disperso indica que, possivelmente, o mecanismo fisiológico que coordena a junção das RONS e de seus centros fibrilares na formação de um único nucléolo, observado nas células de Sertoli da maioria dos mamíferos, está ausente ou modificado em *H. velatus* e *M. nigricans*. Nessas espécies, possivelmente, as RONS encontram-se desconectadas, com seus centros fibrilares ativos concentrando proteínas nucleolares em diversos pontos separados, não dando o aspecto circular comum do nucléolo das células de Sertoli de outros mamíferos.

A presença de mais de um nucléolo nas células de Sertoli de *M. nigricans* e *M. molossus*, também indica que essa fisiologia celular pode estar modificada em certos momentos do ciclo do epitélio seminífero de algumas espécies. Possivelmente, em estágios do ciclo de grande requerimento nutricional ou hormonal as células de Sertoli sejam fortemente estimuladas a produção, e essa super-expressão pode ser sustentada por um

aumento na atividade e, por conseguinte, no tamanho nucleolar na maioria das espécies, no entanto, a separação das RONS para formação de novos nucléolos pode ter sido, possivelmente, um mecanismo fisiológico importante estabelecido nessas espécies.

O padrão de expressão evidenciado pelo alaranjado de acridina foi semelhante ao observado na impregnação pela prata, e de forma geral detectou apenas uma única marcação central na maioria das espécies, à exceção de *P. discolor* que apresentou alguns pontos com expressão aparentemente fora da região nucleolar. Esses pontos, possivelmente, tratam-se de regiões de expressão de RNAm, uma vez que o alaranjado de acridina marca diferencialmente DNA e RNA inespecificamente (Kosower et al.1992).

As espécies que apresentaram maior variação de padrões na morfologia nucleolar e expressão nas células de Sertoli foram *M. molossus*, *H. velatus* e *M. nigricans*, em que a presença de nucléolos irregulares ou em número de dois foi observada.

Em *H. velatus* o nucléolo apresentou um padrão atípico de morfologia nucleolar, com aspecto filamentar e difuso. Essa conformação pode ser devida a uma maior desespiralização do DNA ribossômico durante a expressão nessa espécie ou uma maior quantidade de motivos repetitivos de DNAr. A expressão desse nucléolo filamentar, observada na coloração pelo alaranjado de acridina, indica que ela ocorre apenas nas extremidades e de forma pontual.

O padrão observado em *M. nigricans*, com variação na composição e expressão, pode ser devido ao seu grande número de RONS, ao menos 5 pares (Marchesin 2002), que possibilitam maiores possibilidades de adequações fisiológicas.

Não se pode também excluir, como condição responsável por parte da variação observada nas espécies, o artefato de técnica, onde o processo de obtenção das células pode desestruturar a composição nucleolar, espalhado ou alterando a posição de seus subcomponentes. Contudo, nos parece mais provável que as diferenças sejam também

consequências das variações fisiológicas dos estágios do ciclo espermatogênico das diferentes espécies.

Mudanças funcionais e morfológicas das células de Sertoli durante o ciclo do epitélio seminífero já foram observadas por diversos autores, essas alterações podem ser observadas na ultraestrutura das mitocôndrias (Posalaki et al. 1968), microtúbulos (Fawcett 1975), complexo de Golgi (Chen e Yates 1975), lisossomos (Chemes 1986) e em várias outras organelas (Assaf 1980; Kerr 1988; Wrobel e Schimmel, 1989). No entanto, a maioria dessas alterações morfológicas cíclicas é observada, principalmente, na parte basal do citoplasma.

Wrobel e Schimmel (1989) e Pawar e Wrobel (1991) observaram que o volume e a área do núcleo das células de Sertoli de touros e búfalos, respectivamente, também variaram ciclicamente, no entanto, essas variações não eram significativas, apresentando valores relativamente constantes durante todo o ciclo. Essas observações estão de acordo com o observado para outros mamíferos (Johnson e Nguyen 1986; Sinha Hikin et al. 1989; Russel et al. 1990).

No presente estudo também ocorreram variações intra-específicas na área nuclear e nucleolar, e que, possivelmente, podem ser devidas a variações funcionais dessas células durante o ciclo, como o observado em outros mamíferos. No entanto, não pode ser, de novo, descartada a hipótese de um possível efeito de hipotonização diferencial decorrente da técnica de obtenção dessas células.

A relação área nucleolar/área nuclear nas espécies analisadas variou entre as espécies de diferentes famílias, assim como dentro de uma mesma família. Não foi possível correlacionar a área nucleolar e a densitometria com o número de RONS que as espécies apresentam. Apenas a espécie *C. perspicillata*, que apresentou a menor porcentagem de área nucleolar/área nuclear e também o menor índice densitométrico, correlaciona-se diretamente com o número de RONS, uma vez que a sua única RON,

possivelmente é super expressa para poder desempenhar um papel fisiológico adequado. Apesar do menor tamanho e de uma menor compactação em seus componentes, o nucléolo de *C. perspicillata* assemelhou-se ao dos outros filostomídeos que possuem um par de RONS, ou seja *P. discolor* e *P. lineatus*.

As espécies *C. planirostris* e *M. rufus*, que possuem um par de RONS, apresentaram uma relação área nucleolar/área nuclear semelhante às espécies de filostomídeos que também tem um par de RONS, indicando que as células estão, possivelmente, sobre o controle de um mesmo processo fisiológico.

Molossus molossus novamente se diferenciou dos demais molossídeos e, apesar de também possuir apenas um par de RONS, apresentou uma relação de área nucleolar/área nuclear próxima a das espécies de filostomídeos que possuem três pares de RONS (*A. lituratus* e *A. planirostris*).

Os vespertilionídeos se diferenciaram das outras espécies, apresentando uma maior relação de área nucleolar/área nuclear. Apesar de *H. velatus* possuir apenas um par de RONS, essa espécie apresentou uma relação de área nucleolar/área nuclear bem maior que a de espécies com maior número de RONS. Isso pode ser devido a sua conformação em forma filamentar, que propicia mais sítios de interação das proteínas nucleolares com o nucléolo. Já *M. nigricans* apresentou a maior porcentagem de área nucleolar/área nuclear, acima dos 10%, possivelmente, por essa espécie apresentar o maior número de RONS dentre todas as espécies analisadas.

Analisando os dados conjuntamente podemos perceber que as células de Sertoli das espécies de Phyllostomidae apresentam um único e bem distinto nucléolo que é formado pela interação de todas as RONS em um único ponto, esse nucléolo apresenta um padrão de expressão periférica e a relação de área nucleolar/área nuclear é proporcional ao número total de RONS que as espécies apresentam. Observamos que o mesmo é válido para as espécies de Molossidae, *C. planirostris* e *M. rufus*, mas que *M. molossus* se diferencia dos

demais, tanto qualitativa quanto quantitativamente. Essa diferenciação, possivelmente, se deve a uma regulação fisiológica exclusiva de *M. molossus*. Vespertilionidae apresenta características morfológicas únicas, em relação às outras espécies, e também uma maior relação de área nucleolar/área nuclear.

Apesar da importância funcional que as células de Sertoli apresentam e aos vários mecanismos que regulam, o padrão nucleolar foi variável dentro e entre as diferentes famílias de morcegos sendo que, dentro de uma mesma família, a variação está mais relacionada ao número total de RONS que as espécies apresentam.

Referências Bibliográficas

- Abrams JM, White K, Fessler LI et al. (1993) Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 117:29-43.
- Andrade FM, Trieveiler F, Freitas TRO (1995) Estudos ecomorfológicos e citogenéticos em Quirópteros do Parque Estadual de Monai, RS. *Rev Bras Genet* 18:496.
- Assaf AA (1980) Cyclic changes of cytoplasmic components in rat Sertoli cells. Thesis, McGill University, Montreal, Canada.
- Bickham JW, Mcbee K, Schlitter DA (1986) Chromosomal variation among seven species of *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *J Mammal* 67:746-750.
- Chemes H (1986) The phagocytic function of Sertoli cells: a morphological, biochemical, and endocrinological study of lysosomes and acid phosphatase localization in the rat testis. *Endocrin* 119:1673-1681.
- Chen II, Yates RD (1975) The fine structure and phosphatase cytochemistry of the Golgi complex and associated structures in the Sertoli cells of Syrian hamsters. *Cell Tissue Research* 157:227-238.
- Enders GC, Millette CF (1988) Pachytene spermatocyte and round spermatid binding to Sertoli cells *in vitro*. *J Cell Sci* 90:105-114.

- Fawcett DW (1975) Ultrastructure and function of the Sertoli cell. In: Hamilton DW, Greep RO (eds.) Handbook of Physiology, Sect 7, vol 5. Washington, DC. American Physiology Society. 21-55.
- França LR, Becker-Silva SC, Chiarini-Garcia H (1999) The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). Tissue Cell 31:274–280.
- Guttenbach M, Martínez-Expósito MJ, Engel W et al (1996) Interphase chromosome arrangement in Sertoli cells of adult mice. Biol Reprod 54:980-986.
- Hodgson YM, Irby DC, Kerr JB et al (1979) Studies of the structure and function of the Sertoli cell in a seasonally breeding rodent. Biol Reprod 21:1091-1098.
- Johnson L, Nguyen HB (1986) The annual cycle of the Sertoli cell population in adult stallions. J Reprod Fertil 76:311-316
- Josso N, di Clemente N, Gouedard L (2001) Anti-Mullerian hormone and its receptors. Mol Cell Endocrinol 179:25–32.
- Kavalco KF, Pazza R (2004) A rapid alternative technique for obtaining silver-positive patterns in chromosomes. Genet Mol Biol 27,2:196-198.
- Kerr JB (1988) An ultrastructural and morphometric analysis of the Sertoli cell during the spermatogenic cycle of the rat. Anat Embryol 179:191-203.
- Kosower NS, Katayose H, Yanagimachii R (1992) Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. J. Androl. 13:342-348.
- Mackay S (2000) Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. Internat Rev Cytol 200:47–99.
- Marchesin SRC (2002) Análise citogenética em espécies de Vespertilionidae dos gêneros *Eptesicus*, *Hitiotus*, *Lasiurus* e *Myotis* (Chiroptera, Mammalia). Dissertação (Mestrado em Genética) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto.
- Matsumoto AM (1996) Spermatogenesis. Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 17:359-384.

- Mirre C, Knibiehler B (1982) A re-evaluation of the relationships between the fibrillar centers and the nucleolus organizing regions in reticulated nucleoli: ultrastructural organization, number and distribution of the fibrillar centers in the nucleolus of the mouse Sertoli cell. *J. Cell. Sci.* 55:247-259.
- Nikaido M, Harada M, Cao Y et al (2000) Monophyletic origin of the order Chiroptera and its phylogenetic position among Mammalia, as inferred from the complete sequence of the mitochondrial DNA of a japanese megabat, ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*). *J Mol Evol* Nova Iorque 51:318-328.
- Oliveira-Filho AB (1999) Microdisseção testicular: repercussões vasculares homolateral, epiteliais contra-lateral, imunológicas e hormonais. Tese, Programa de Pós-Graduação em Urologia. UNIFESP. São Paulo-SP, 19p.
- Pawar HS, Wrobel KH (1991) The Sertoli cell of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) during the spermatogenic cycle. *Cell Tissue Research.* 265:43-50.
- Petersen C, Söder O (2006) The Sertoli cell – a hormonal target and ‘super’ nurse for germ cells that determines testicular size. *Hormone Research.* 66:153-161.
- Pettigrew JD (1986) Flying primates? Megabats have the advanced pathway from eye to midbrain. *Science.* Washington, 231 (4743):1304-1306.
- Posalaki Z, Szabó D, Bácsi E et al (1968) Hydrolytic enzymes during spermatogenesis in rat: an electron microscopic and histochemical study. *J Histochem Cytochem* 16:249-262.
- Russell LD, Ren HP, Sinha Hikim I et al (1990) A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Amer J Anat* 188:21-30.
- Simmons NB (1994) The case for chiropteran monophyly. *Amer Museum Novitates* 3103:1-54.

- Simmons NB (1995) Bat relationships and the origin of flight. In: Racey PA , Swift SM (eds.) Ecology, Evolution and Behavior of Bats. Symposium Zool. Society London, Oxford University Press. 67:27-43.
- Sinha Hikim AP, Amador AG, Klemcke HG et al (1989) Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. Endocrinol 125:1829-1843.
- Van Den Bussche RA, Hoofer SR (2004) Phylogenetic relationships among recent chiropteran families and the importance of choosing appropriate out-group taxa. J Mammal 85 (2):321-330.
- Wrobel KH, Schimmel M (1989) Morphology of the bovine Sertoli cell during the spermatogenic cycle. Cell Tissue Research. 257:93-103.

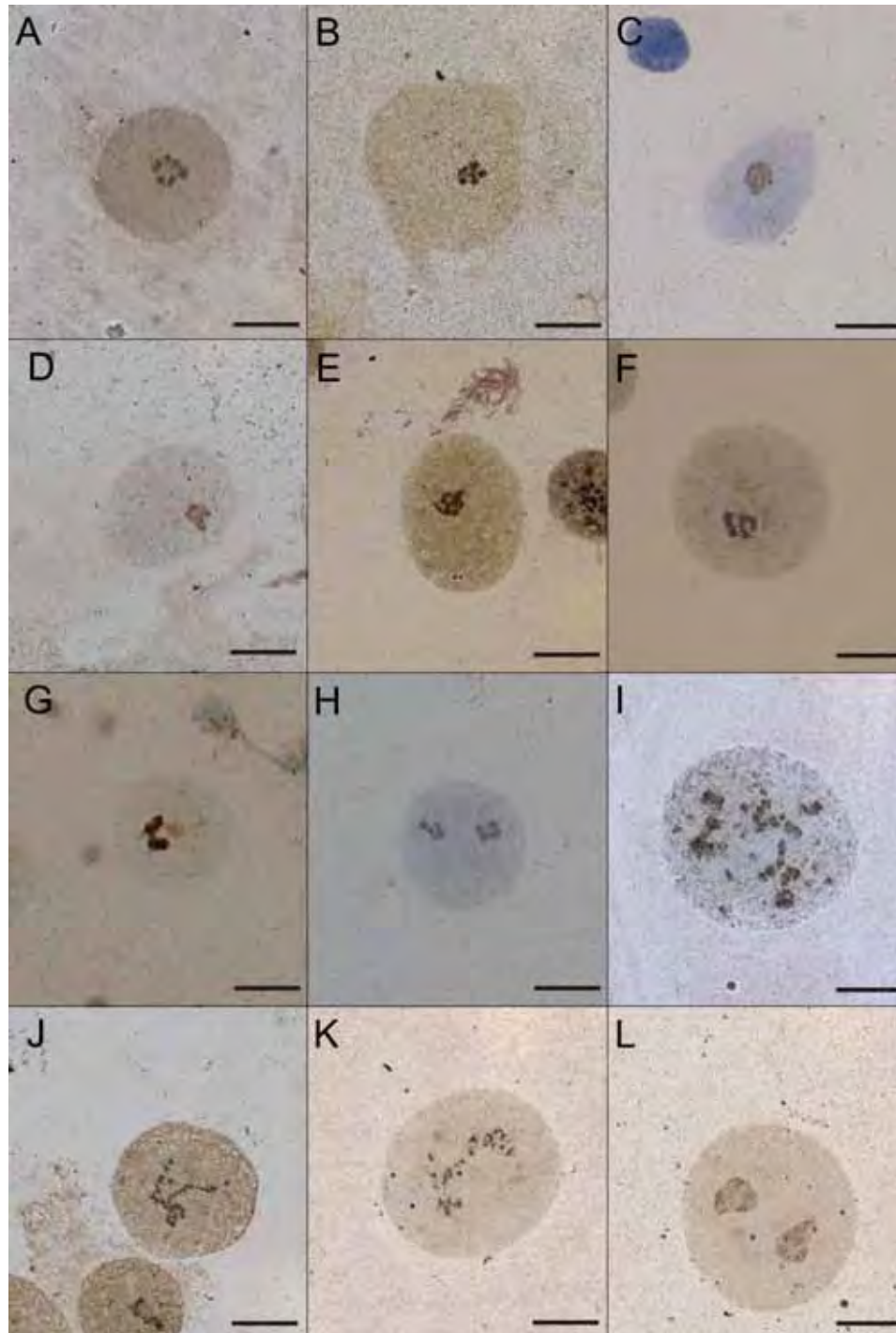
Fig. 1 Aspecto geral da lâmina com suspensão testicular de *Molossus rufus* submetida a impregnação por nitrato de prata. Células de Sertoli (S), célula mióide (M), espermatogônia (Sg) e espermátide (Sd). Barra = 10 µm.

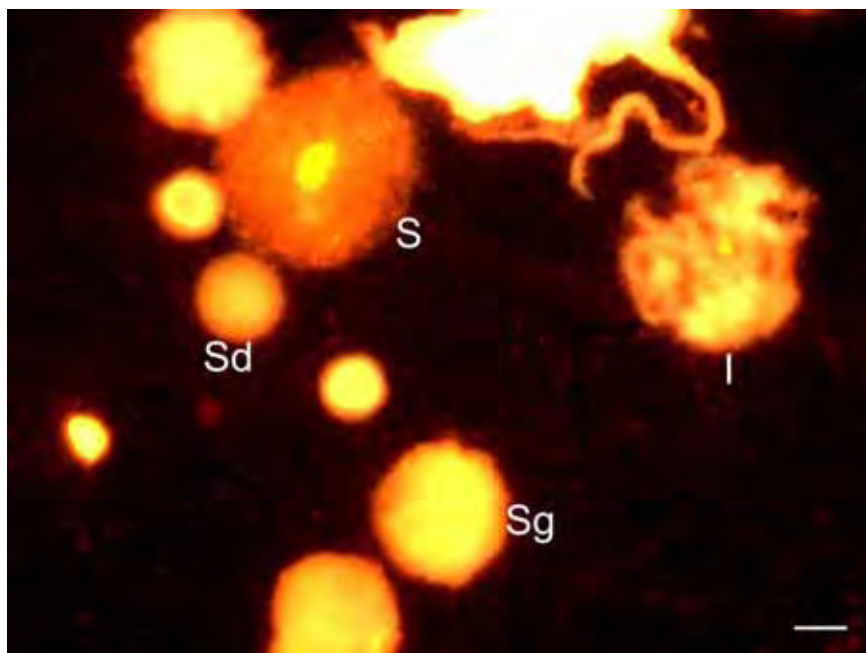
Fig. 2 Células de Sertoli submetidas a impregnação por nitrato de prata. **A.** *Artibeus lituratus*. **B.** *Artibeus planirostris*. **C.** *Carollia perspicillata*. **D.** *Cynomops planirostris*. **E.** *Molossus rufus*. **F.** *Platyrrhinus lineatus*. **G.** *Phyllostomus discolor*. **H e I.** *Molossus molossus*. **J.** *Histiotus velatus*. **K e L.** *Myotis nigricans*. Barras = 10 µm.

Fig. 3 Aspecto geral da lâmina com suspensão testicular de *Phyllostomus discolor* submetida a impregnação por nitrato de prata. Células de Sertoli (S), espermatogônia (Sg), espermátide primário (I) e espermátide (Sd). Barra = 10 µm.

Fig. 4 Células de Sertoli submetidas ao alaranjado de acridina. **A.** *Artibeus lituratus*. **B.** *Artibeus planirostris*. **C.** *Carollia perspicillata*. **D.** *Cynomops planirostris*. **E.** *Molossus rufus*. **F.** *Platyrrhinus lineatus*. **G.** *Phyllostomus discolor*. **H e I.** *Molossus molossus*. **J.** *Histiotus velatus*. **K e L.** *Myotis nigricans*. Barras = 10 µm.







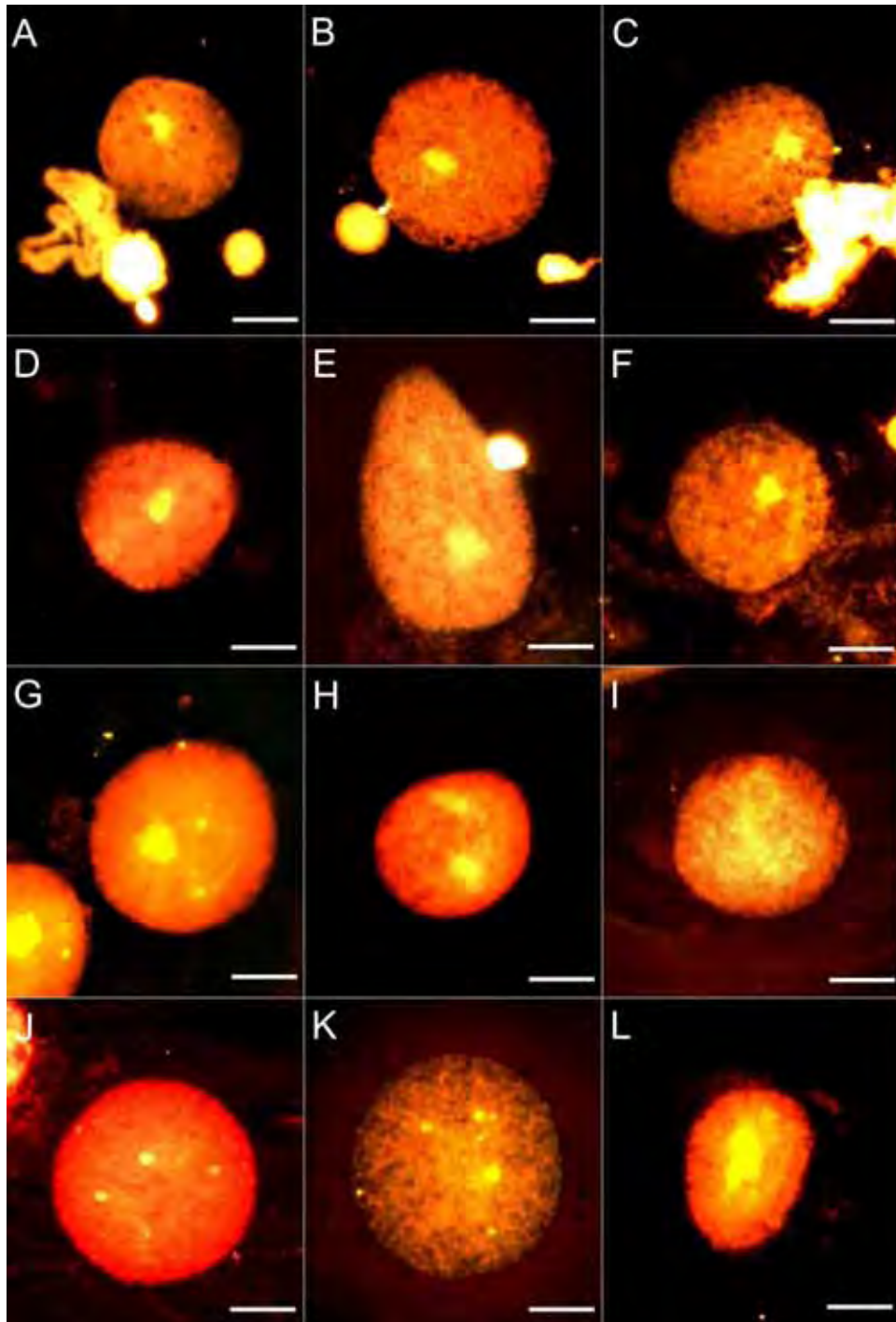


Tabela 1. Relação de área nucleolar / área nuclear e índice densitométrico dos nucléolos das espécies: *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Phyllostomus discolor*, *Platyrrhinus lineatus* (Phyllostomidae), *Cynomops planirostris*, *Molossus molossus*, *Molossus rufus* (Molossidae), *Histiotus velatus* e *Myotis nigricans* (Vespertilionidae).

Família	Espécies	Relação de área nucleolar/ área nuclear (%)	Índice Densitométrico
Phyllostomidae	<i>A. lituratus</i>	5,89	148,4
	<i>A. planirostris</i>	6,06	179,09
	<i>C. perspicillata</i>	4,5	127,92
	<i>P. discolor</i>	4,94	161,69
	<i>P. lineatus</i>	4,67	172,62
Molossidae	<i>C. planirostris</i>	4,61	130,2
	<i>M. molossus</i>	5,72	159,15
	<i>M. rufus</i>	4,82	186,6
Vespertilionidae	<i>H. velatus</i>	7,12	181,61
	<i>M. nigricans</i>	10,75	133,93

V. ARTIGO 3

Comportamento do nucléolo e das regiões organizadoras nucleolares (RONS) durante a divisão meiótica em espécies de morcegos

Mateus Rodrigues Beguelini^a, Sandra Regina de Carvalho Marchesin^a, Maria Tercília

Vilela de Azeredo Oliveira^b, Eliana Morielle Versute^a

^a*Laboratório de Chiroptera, Departamento de Zoologia e Botânica, UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil 15054-000*

^b*Departamento Biologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil 15054-000*

Short Title: Comportamento nucleolar na meiose de morcegos.

Corresponding author. Tel.: +55 17 32212369. FAX: + 55 17 32212374

E-mail address: morielle@ibilce.unesp.br (Eliana Morielle-Versute)

Resumo

O nucléolo tem sido proposto como o paradigma da compartimentalização nuclear funcional. Estudos revelam que cada um dos seus subcompartimentos apresenta uma distribuição diferencial, dispersando-se para diferentes partes da célula durante a divisão mitótica. Apesar das diferentes abordagens sobre o ciclo nucleolar, há ainda muito a ser entendido, principalmente na divisão meiótica e, em decorrência disso, o objetivo desse estudo foi analisar a nucleologênese meiótica em cinco espécies de morcegos que apresentam variação no número de regiões organizadoras nucleolares (RONs): *Artibeus lituratus* e *Artibeus planirostris* (3 pares), *Carollia perspicillata* (RON no cromossomo X), *Myotis nigricans* (5 pares) e *Platyrrhinus lineatus* (1 par). As marcações encontradas no FISH corroboram estudos da literatura confirmando o número de locos de DNAr observados após coloração pela prata, ou seja apenas um sítio de DNAr em *C. perspicillata*, dois em *P. lineatus*, seis em *A. lituratus* e *A. planirostris* e dez em *M. nigricans*. A desorganização do nucléolo, de todas as espécies, inicia-se quando as espermatogônias entram em meiose, onde o material nucleolar passa a comportar-se de até três maneiras. Parte dele dissolve-se no nucleoplasma, outra parte permanece associada as RONs durante toda a divisão meiótica e outra junta-se as regiões pericromossomais. A atividade diferencial de RONs e a fusão nucleolar são eventos que também ocorrem nas células meióticas de morcegos.

Palavras-chave: Nucleologênese, Nucléolo, Chiroptera.

Introdução

A regularidade do processo espermatogênico está ligada aos processos genéticos, transcricionais, traducionais e reguladores, onde o ciclo é mantido por uma grande rede de reações que vai desde a ativação e desativação gênica, até a produção de proteínas que coordenam as divisões celulares. Dentro deste rico e complexo sistema encontramos um

outro ciclo muito importante, o ciclo nucleolar. Este ciclo caracteriza-se por alterações na forma e tamanho dos nucléolos, em consequência do papel funcional dos vários domínios nucleolares, que desorganizam-se e reorganizam-se durante o ciclo, caracterizando o fenômeno denominado nucleologênese (Sirri *et al.* 2002).

Nas células de eucariotos superiores, no início da mitose quando a transcrição do DNA ribossômico (DNAr) é reprimida, o nucléolo começa a se desorganizar e não pode mais ser observado durante toda a mitose. Por outro lado, ao fim da mitose ele se reorganiza concomitantemente com a restauração da transcrição do DNAr e torna-se funcionalmente ativo ao longo de toda a intérfase (Sirri *et al.* 2008).

O nucléolo tem sido proposto como o paradigma da compartimentalização nuclear funcional (Strouboulis & Wolffe 1996). Ele é o sítio de biogênese dos ribossomos e sua maquinaria nucleolar apresenta-se distribuída em diferentes compartimentos. Quando observado em microscopia eletrônica, três principais componentes (compartimentos) podem ser distinguidos nas células de mamíferos: o centro fibrilar (CF), o componente fibrilar denso (CFD) e o componente granular (CG). Os CFs são áreas claras, parcial ou totalmente rodeadas por uma região altamente contrastada, o CFD, e ambos estão embebidos no CG (Sirri *et al.* 2008).

O CF contém centenas de cópias de genes DNAr arranjados em um ou mais arranjos em tandem, em vários locos cromossômicos denominados regiões organizadoras nucleolares (RONs). Apesar dos vários genes, somente um subconjunto deles está normalmente ativo e este parece ter uma localização mais periférica, estendendo-se para o CFD, onde são observados os RNAs ribossômicos recém transcritos. No CG, o mais periférico, vão ocorrer os eventos finais do processamento dos transcritos de RNAr, com a formação das partículas pré-ribossomais que serão translocadas para o citoplasma através dos poros nucleares (Carmo-Fonseca *et al.* 2000).

A localização dos componentes nucleolares está correlacionada com sua função na produção das subunidades ribossômicas. Cadeias de RNA ribossômico (RNAr) em transcrição são localizadas na junção dos CFs com o CFD e se acumulam no CFD (Puvion-Dutilleul *et al.* 1997; Cmarko *et al.* 2000; Guillot *et al.* 2005). Por outro lado, o processamento do pré-RNAr é iniciado junto ao sítio de transcrição no CFD (Cmarko *et al.* 2000) e continua durante a migração intra-nucleolar do RNA até o CG. Do mesmo modo, as proteínas nucleolares que participam das primeiras etapas do processamento do RNAr, como a fibrilarina e a nucleolina, localizam-se no CFD (Puvion-Dutilleul *et al.* 1991; Ginisty *et al.* 1998), enquanto que proteínas como a B23/NPM e a PM-Scl 100, que estão envolvidas nas etapas intermediárias e tardias do processamento, localizam-se no CG (Biggiogera *et al.* 1989; Gautier *et al.* 1994).

Estudos revelam que cada um desses subcompartimentos existente dentro do nucléolo apresenta uma distribuição diferencial ao longo da divisão celular, dispersando-se para diferentes partes da célula durante a divisão mitótica (Hernandez-Verdun *et al.* 1993; Dundr *et al.* 1997; Leung *et al.* 2004; Chen *et al.* 2005).

Apesar das diferentes abordagens sobre o ciclo nucleolar, há ainda muito a ser entendido, principalmente na divisão meiótica, merecendo destaque o fato de que nas células somáticas a transcrição é suspensa no início do ciclo de condensação cromossômica, mas nas células gaméticas os genes ribossomais são ativos durante a prófase I – leptóteno, zigóteno e início do paquíteno, nos espermatócitos, e até o diplóteno, nos oócitos (Wachtler & Sthal 1993), o que propicia a análise mais prolongada dos eventos. Além disso, a maioria das observações sobre RONS e nucléolos foram feitas em espécies chave, como humanos e roedores, estabelecendo suas características morfológicas e fisiológicas básicas, no entanto, a investigação de como a nucleologênese pode ser afetada pela variação no número de RONS não foi notadamente explorada.

Em decorrência da escassez de informações e do interessante aspecto envolvendo a nucleologênese em células meióticas, o objetivo do presente estudo foi analisar esse interessante processo em células meióticas de cinco espécies de morcegos que apresentam variação no número de RONS: *Artibeus lituratus* e *Artibeus planirostris* (3 pares), *Carollia perspicillata* (RON no cromossomo X: 1 par na fêmea e uma RON no macho), *Platyrrhinus lineatus* (1 par) (Morielle & Varella-Garcia 1988) e *Myotis nigricans* (5 pares) (Marchesin 2002), por meio de técnicas que possibilitam a identificação de diferentes estruturas envolvidas no processo (proteínas nucleolares, RNAs e DNAr).

Materiais e Métodos

Animais

Foram avaliados quatro espécimes, sexualmente maduros, das espécies *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Myotis nigricans* e *Platyrrhinus lineatus*. Os animais foram capturados com o uso de redes de espera na região urbana de São José do Rio Preto (São Paulo, Brasil). A fim de preservar os espécimes testemunhos, esses foram fixados, catalogados e depositados na coleção científica do laboratório de Chiroptera, IBILCE-UNESP.

Suspensão Meiótica

Após a morte do animal, que seguiu o proposto por Oliveira-Filho (1999), os testículos foram removidos e macerados em placas de Petri contendo solução hipotônica de KCl (0,075 M) e colquicina (0,1%), onde permaneceram por 40 minutos a temperatura ambiente. A suspensão celular foi então centrifugada a 1000 rpm por 6 minutos, o sobrenadante descartado e de 7 a 9 ml de solução fixadora, metanol: ácido acético (3:1) foi adicionada por 15 minutos. A suspensão foi centrifugada e a solução fixadora trocada mais duas vezes. A suspensão final foi pingada sobre lâminas de vidro limpas e as células

submetidas aos procedimentos de impregnação por nitrato de prata (Kavalco & Pazza, 2004), coloração pelo alaranjado de acridina (Abrams *et al.* 1993) e a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr.

Hibridização in situ Fluorescente (FISH)

Nesse procedimento foi utilizada a sonda de DNA ribossômico de *Xenopus laevis*, fornecida pela Dra Shirlei Recco Pimentel (UNICAMP). As lâminas foram submetidas a um pré-tratamento envolvendo a desidratação do material em uma série de álcoois (70, 85 e 100%), e uma digestão enzimática por pepsina (8%) e Rnase (1%). Após o pré-tratamento, o material foi desnaturado em solução de formamida a 70%, pH 7,0 a 70°C durante 2 minutos, lavado em uma série de álcoois gelados, seco e colocado a hibridizar com a sonda de sequência de DNAr marcada com biotina, por um período, em média, de 36 horas a 37°C. A detecção da hibridização foi feita pela incubação das lâminas em solução de fluorosceína-isocianato (FITC-avidina Vector) por 20 minutos e contra coloração com iodeto de propídio (PI) 0,3 µg/ml e diamidino-fenilindole (DAPI) 0,5 µg/ml.

As lâminas foram analisadas em foto microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot II e as melhores imagens foram capturadas digitalmente com o auxílio de uma câmera Zeiss AxioCam MR por meio do programa Axiovision 3.1 para Windows.

Resultados

Impregnação por íons prata

As células de *A. lituratus* e *A. planirostris* apresentaram as mesmas características, com as espermatogônias apresentando quatro (Fig. 1A) a seis nucléolos que nos espermatócitos primários (leptóteno) começam a desorganizar-se e os componentes nucleolares passam a se comportar de duas ou três maneiras (Figs. 1B – 1I). Parte deles

podem ser visualizados como marcações irregulares que se dissolvem no nucleoplasma (Fig. 1D), outra parte associa-se às regiões pericromossomais (Fig. 1D – 1G) e a terceira permanece associada às RONS durante toda a divisão (Fig. 1G – 1K). As células em metáfase I apresentaram seis cromossomos marcados (Fig. 1J), e em metáfase II um a três cromossomos marcados (Fig. 1K). Nas espermatídes um a cinco nucléolos foram observados (Fig. 1L).

A análise das células de *C. perspicillata* submetidas à impregnação por nitrato de prata revelou nas espermatogônias e nos espermatócitos primários iniciais (leptóteno) a presença de um único nucléolo (Fig. 2A). À medida que ocorre o avanço na compactação cromossômica esse nucléolo desorganiza-se e seus componentes podem ser visualizados como marcações irregulares no nucleoplasma (Fig. 2B), associados às RONS, onde são observados durante toda a divisão celular (Fig. 2C – 2E) e associados às regiões pericromossomais (Fig. 2F). Nas células em metáfase II foram observados um ou nenhum cromossomo marcado (Fig. 2G e 2H). Nas espermatídes um único e grande nucléolo foi notado (Fig. 2I).

Em *P. lineatus* as espermatogônias apresentaram um (Fig. 3A) ou dois nucléolos, os espermatócitos primários iniciais (leptóteno) um único nucléolo (Fig. 3B) que, a semelhança do observado em *A. lituratus*, com a compactação cromossômica desorganiza-se, e seus componentes são visualizados no nucleoplasma, associados às RONS e às regiões pericromossomais (Figs. 3B – 3F). As células em metáfase mitótica apresentaram dois cromossomos marcados (Fig. 3G), e em metáfase meiótica I uma única marcação (bivalentes) foi observada (Fig. 3H). Nas espermatídes um único e bem definido nucléolo foi observado (Fig. 3I).

Em *M. nigricans* foram observadas espermatogônias com cinco a dez marcações (Fig. 4A) que se desorganizam e passam a ser observadas como pontos escuros sobre os cromossomos (Figura 4B – 4D). Nas metáfases I até dez cromossomos marcados (5

bivalentes) foram visualizados (Figura 4E) e nas espermatídes uma a cinco marcações foram características (Fig. 4F).

Hibridização in situ fluorescente (FISH)

As células das diferentes espécies quando hibridizadas com a sonda DNAr apresentaram marcações indicativas dos sítios cromossômicos de DNAr hibridizados com as seqüências características da sonda. Os sinais fluorescentes indicativos da hibridização foram melhor evidenciados em espermatócitos primários, por esses encontrarem-se em um estado de maior condensação, facilitando a visualização e distinção da fluorescência. Já em células em intérfase, devido ao recrutamento ocasional de mais de um cromossomo com RON para a formação do nucléolo e do acentuado grau de descondensação cromossômica, foram observados números variados de sinais, além de intensidades diferentes.

Os três tipos celulares de *C. perspicillata*, ou seja, as espermatogônias, espermatócitos primários e espermatídes recém formadas e em alongamento apresentaram uma única marcação fluorescente, com variação no tamanho, evidenciada pela intensidade de fluorescência (Figs. 5A – 5H).

Nas preparações de *P. lineatus* células mióides, não detectadas nas preparações das outras espécies, apresentaram uma ou duas marcações fluorescentes (Fig. 5I), as espermatogônias apresentaram uma (Fig. 5J) ou duas marcações fluorescentes (Fig. 5K), os espermatócitos primários uma única e grande marcação fluorescente que ao longo da divisão meiótica se subdivide em duas marcações (Figs. 5L – 5P), ou espermatócitos com duas marcações fluorescentes já distintas (Figs. 5Q – 5S) e espermatídes com uma única marcação (Fig. 5T).

Em *A. lituratus* os espermatócitos primários iniciais (leptóteno) apresentaram duas a três marcações fluorescentes (Fig. 6A) que ao longo da divisão meiótica se subdividem em até seis marcações distintas (Figs. 6B – 6E). Nas células em metáfase II foram

observados três cromossomos marcados (Fig. 6F). As espermátides apresentaram uma única e grande marcação (Fig. 6G) ou duas ou três marcações menores (Fig. 6H).

As suspensões testiculares de *A. planirostris* apresentaram resultados semelhantes aos observados em *A. lituratus*.

As espermatogônias da espécie *M. nigricans* apresentaram de cinco a dez marcações fluorescentes (Fig. 7A). Nos espermátócitos primários o número de marcações fluorescentes foi variável (Figs. 7B – 7D) e nas espermátides uma a cinco marcações foram notadas (Fig. 7E). Os espermatozóides exibiram uma ou duas marcações fluorescentes anteriores (Fig. 7F).

Alaranjado de acridina

De maneira geral, todas as espécies submetidas ao alaranjado de acridina apresentaram um mesmo padrão, sendo observada marcações indicando a presença de RNA intra-nuclear, tanto em células interfásicas como também nas células em divisão meiótica.

A análise das células de *C. perspicillata* revelou espermatogônias com uma marcação fluorescente central (Fig. 8A), indicativa, possivelmente, da região nucleolar. Os espermátócitos primários iniciais (leptóteno) apresentaram marcações (áreas vermelhas) indicativas de concentração de RNA espalhadas pelo núcleo (Fig. 8B) que, no decorrer da divisão meiótica vão se desorganizando (Fig. 8C – 8F), e apenas marcações pontuais podem ser observadas, e essas, geralmente, diminuem de tamanho ao longo da compactação cromossômica, desaparecendo na metáfase (Fig. 8G). Nas espermátides a marcação fluorescente única é novamente observada (Fig. 8H). Esses resultados evidenciam que, ao longo da prófase meiótica as regiões ricas em RNA se desorganizam e o material pode ser observado, à semelhança dos subcomponentes nucleolares,

dissolvendo-se no nucleoplasma, movendo-se para fora do núcleo ou ainda associado às regiões pericromossomais.

Em *P. lineatus* as observações foram semelhantes às de *C. perspicillata*, onde as espermatogônias apresentaram uma única marcação fluorescente central (Fig. 8I), os espermatócitos primários (leptóteno) apresentaram pontos indicativos de concentração de RNA (Fig. 8J) que, no decorrer da compactação cromossômica vão se desorganizando e as marcações passam a ser observadas na periferia nuclear, assim como associados a certas porções dos cromossomos (Figs. 8K – 8N), desaparecendo na metáfase (Fig. 8O). Nas espermatídes a marcação fluorescente central é novamente observada (Fig. 8P).

Nas preparações de *A. lituratus* e *A. planirostris* as espermatogônias apresentaram uma a três marcações fluorescentes (Fig. 9A), os espermatócitos primários iniciais (leptóteno) apresentaram pontos de concentração de RNA (Fig. 9B) que, à semelhança do observado nas espécies anteriores, no decorrer da compactação cromossômica vão se desorganizando e as marcações de RNA podem ser observadas na periferia nuclear, assim como associados a certas porções dos cromossomos (Figs. 9C – 9E), desaparecendo no diplóteno (Fig. 9F) e em metáfase (Fig. 9G). Nas espermatídes uma a três marcações fluorescentes são observadas (Fig. 9H).

Em *Myotis nigricans* as espermatogônias apresentaram uma a três marcações fluorescentes distintas ou marcações difusas, que ocuparam grande parte do núcleo (Fig. 9I), os espermatócitos primários iniciais (leptóteno) apresentaram pontos de concentração de RNA (Fig. 9J) que, no decorrer da compactação cromossômica se desorganizam e as marcações sugestivas de RNA são, então, observadas na periferia nuclear, assim como associadas a certas porções dos cromossomos (Figs. 9K – 9O). Uma a três marcações fluorescentes distintas ou marcações difusas foram observadas nas espermatídes (Fig. 9P).

Discussão

A utilização do nitrato de prata na análise de estruturas nucleolares e de regiões organizadoras nucleolares é uma metodologia citogenética básica já utilizada por muitos autores. Por sua constituição química, a molécula combina-se às proteínas não histônicas e aos componentes ácidos que estão associados às RONS, de forma que, após aquecimento, esses podem ser seletivamente visualizados por métodos cito-histológicos rotineiros (Howell 1982).

A utilização da prata nas células meióticas das cinco espécies de morcegos analisadas evidenciou a presença do nucléolo nas diferentes células, bem como o ciclo de eventos ao longo da divisão celular. O nucléolo começa a sua desorganização quando as espermatogônias entram em meiose e, a semelhança do observado por Schwarzacher e Wachtler (1993) e González-García e Rufas (1995), o material nucleolar se comportou de duas ou três maneiras. Parte dele permaneceu associado às RONS durante toda a divisão, outra parte ficou associado as regiões pericromossomais e uma terceira parte dissolveu-se no nucleoplasma comum.

Para muitos autores (Roussel *et al.* 1993, 1996; Sirri *et al.* 1999), quando ocorre a repressão da transcrição de DNAr durante a prófase tardia, a maquinaria de transcrição do DNAr permanece associada com o DNAr nas RONS, e esse material pode ser visualizado nas metáfases marcadas pela prata. Contudo, os componentes da maquinaria de processamento dos pré-RNAr se dissociam do nucléolo ficando parcialmente distribuídos na superfície de todos os cromossomos (Gautier *et al.* 1992; Hernandez-Verdun *et al.* 1993).

Wachtler e Sthal (1993) evidenciaram que nos espermátócitos os genes ribossomais permanecem ativos durante a prófase I – leptóteno, zigóteno e início de paquíteno, ficando sua maquinaria transcricional – RNA polimerase I e seus fatores de transcrição, associados as RONS (Weisenberger & Scheer, 1995, Jordan *et al.* 1996, Roussel *et al.* 1996). Essa

associação foi observada nas células de morcegos pela presença da marcação das RONS ao longo de toda a meiose.

Estes resultados contrariam os achados de Hofgärtner e colaboradores (1979) que ao estudarem a espermatogênese de quatro espécies de mamíferos (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Cavia cobaya*), verificaram que estas espécies apresentavam um padrão muito similar de atividade das RONS durante os vários estágios da espermatogênese. Eles detectaram precipitados de prata nas espermatogônias em crescimento e até o estágio de paquíteno da prófase meiótica. Observaram que durante as metáfases I e II e durante a intercinese a coloração pela prata desaparecia completamente. O ressurgimento da impregnação pela prata ocorria somente nas espermátides iniciais de forma arredondada indicando uma reativação pós-mitótica de RONS. Esse ressurgimento da impregnação nas espermátides iniciais e o seu desaparecimento ao longo do processo de espermição, também foi observado nas células de morcegos.

Mello (1995) encontrou corpos semelhantes a nucléolos associados aos cromossomos ou livres no citoplasma, durante a mitose, em células MCF-10A, sugerindo que estes representavam a persistência do nucléolo durante a mitose dessas células.

Dessa forma, assim como Mello (1995) hipotetizou a respeito dos nucléolos de células em mitose, podemos dizer que a persistência de corpos semelhantes a nucléolos durante a meiose dá suporte a idéia que o material nucleolar não se desorganiza completamente durante a metáfase e anáfase, tendo um significado funcional ainda não muito claro. Assim pode ser hipotetizado que estes corpos carregam um primeiro ou novo material ou represente uma fonte de RNA nucleolar para as células filhas enquanto o novo nucléolo está sendo organizado.

No presente estudo, a persistência do nucléolo durante a meiose espermatogênica foi verificada pela observação de corpos semelhantes a nucléolos associados aos

cromossomos das diferentes células ao longo do ciclo do epitélio seminífero, com marcações sendo evidenciadas desde as espermatogônias até as espermátides.

Estudos envolvendo análises imunocitoquímicas e ultraestruturais tem hipotetizado que, durante a divisão celular, as proteínas nucleolares estão homogeneamente distribuídas ao redor dos cromossomos, as proteínas do processamento se concentram em alguns pontos específicos designados de corpúsculos pré-nucleolares (PNBs) e partículas grandes empacotam-se e se deslocam para o citoplasma. Durante a telófase há uma translocação das proteínas da periferia dos cromossomos e dos PNBs para os sítios de transcrição e com a reativação desses sítios, essas proteínas servem de material para a formação do novo nucléolo (Dundr *et al.* 2000; Savino *et al.* 2001; Angelier *et al.* 2005)

O número de nucléolos observados nas células foi variável entre as espécies, sendo que as que apresentam maior número de RONS, ou seja, *M. nigricans*, *A. lituratus* e *A. planirostris*, apresentaram um maior número de nucléolos por célula interfásica, assim como uma maior quantidade de material nucleolar nas células em divisão. Contudo, os nucléolos observados não correspondem ao número de RONS nas diferentes fases das células meióticas. É bem estabelecido que o número total de RONS que uma espécie apresenta corresponde ao número máximo de nucléolos que podem ser encontrados em suas células interfásicas, todavia, o número de RONS que são ativas em cada célula pode variar e, portanto, o número de nucléolos pode ou não corresponder ao número total de RONS. A ativação diferencial de RONS conduz a uma variação no número e tamanho dos nucléolos, o que pode explicar a variação intra-específica no número de nucléolos observados nas espermatogônias e espermátides das espécies analisadas.

As RONS fazem parte do centro fibrilar e, portanto, são indispensáveis à formação do nucléolo (Carmo-Fonseca *et al.* 2000). Não só em Chiroptera, mas em vários outros grupos de organismos, o número e a posição das RONS varia amplamente entre as espécies e essa variação vai desde um par como o observado em *P. lineatus*, *Molossus rufus* e

Lasiurus ega, até cinco pares como nas espécies *Cynomops abrasus* e *M. nigricans* (Morielle & Varella-Garcia, 1988; Souza & Araújo, 1990; Morielle-Versute *et al.* 1996; Marchesin, 2002). Além disso, as RONS podem ser encontradas tanto nas porções terminais dos braços curtos de cromossomo autossômicos, como em regiões de constrição secundária e intersticial. No caso específico da espécie *C. perspicillata*, a RON está localizada na região intersticial do cromossomo X, que é único nos machos (Morielle & Varella-Garcia, 1988). Toda essa variação pode, possivelmente, ter acarretado mudanças significativas na nucleologênese das espécies de morcegos, explicando também parte da variação interespecífica.

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é uma técnica citoquímica com sensibilidade para detectar seqüências específicas de ácidos nucléicos (DNA e RNA) em estruturas biológicas conservadas. Seu princípio é baseado na complementariedade das seqüências dos ácidos nucléicos ao invés da similaridade visual, ou seja, é o processo pelo qual as bases de uma cadeia simples de ácido nucléico ligam-se por pontes de hidrogênio com bases complementares de outra seqüência de ácido nucléico, para produzir uma molécula híbrida de cadeia dupla. Portanto, esta técnica permite a visualização citológica de seqüências específicas de DNA ou RNA e identificação segura de seguimentos cromossômicos.

As marcações encontradas no FISH realizado nas suspensões testiculares das espécies analisadas corroboram alguns estudos de citogenética convencional (Morielle & Varella-Garcia 1988; Souza & Araújo 1990), confirmando o número de locos de DNAr (RONS) observados após coloração pela prata, ou seja, apenas um sítio de DNAr em *C. perspicillata*, dois em *P. lineatus*, seis em *A. lituratus* e *A. planirostris* e dez em *M. nigricans*.

As marcações fluorescentes variaram em intensidade nas diferentes espécies analisadas. Essa variação pode ser devida a não especificidade da sonda utilizada que pode

ter resultado em uma baixa hibridização, ou ainda, a saída desta durante a lavagem pós-hibridização. Entretanto, não pode ser descartada a diferença no número dos locos de DNAr que certamente as espécies apresentam. A espécie que apresentou a maior marcação fluorescente foi *C. perspicillata*, sugerindo que, apesar de apresentar uma única RON, o número de seqüências repetitivas de DNAr não é necessariamente inferior ao das outras espécies. Os rearranjos cromossômicos ocorridos na diferenciação das espécies de morcegos e a localização variável das RONs evidenciam a participação desses nos eventos, contudo o papel essencial dessas regiões têm sido garantido.

Situação inversa foi observada para as outras espécies analisadas, ou seja, quanto maior o número de RONs menor foi a intensidade das marcações fluorescentes. Assim, as marcações de *P. lineatus* apresentaram maior intensidade que as de *A. lituratus* e *A. planirostris* e, essas, maiores que as observadas em *M. nigricans*.

Outro aspecto interessante das RONs em Chiroptera é a taxa elevada de fusão nucleolar, onde devido a mudanças cíclicas da morfologia e fisiologia durante o ciclo celular, e ao movimento, crescimento e aproximação, duas ou mais RONs podem se unir formando um único nucléolo (Volleth 1987; Morielle & Varella-Garcia 1988). Essa fusão também foi observada nas células meióticas e foi mais evidente nas espécies com maior número de RONs, ou seja, *A. lituratus*, *A. planirostris* e *M. nigricans*.

O alaranjado de acridina pode ser usado como um marcador metacromático seletivo de ácidos nucléicos, interagindo com DNA por intercalação e com RNA por atração eletrostática. Essa interação pode ocorrer em células intactas ou em material desnaturado. Sobre certas condições, o alaranjado de acridina intercala no DNA fluorescendo em verde (525 nm) e liga-se eletrostaticamente ao RNA fluorescendo em vermelho (> 630 nm). Essa capacidade nos permite distinguir células quiescentes de células ativadas, células proliferativas, e também pode propiciar a detecção de múltiplos compartimentos em células em G₁.

Segundo Kosower e colaboradores (1992), sobre certas condições, o DNA é vulnerável a desnaturação e, a coloração pelo alaranjado de acridina nesse DNA desnaturado foge à coloração normal, emitindo fluorescência vermelha. Isso explica a coloração encontrada no presente trabalho, onde a dualidade verde/vermelho não foi encontrada usualmente, mas sim em apenas alguns núcleos. Assim, os núcleos interfásicos apresentaram DNA corado em vermelho e pontos de RNA em amarelo, e as células em divisão meiótica apresentaram o DNA em tons verde/amarelos e o RNA em vermelho.

No presente estudo observamos que as células interfásicas (espermatogônias e espermatídes) apresentaram uma maior marcação fluorescente que as células em divisão, e isso pode ser devido a inativação dos genes ribossomais e a degradação dos RNAs durante o processo de divisão celular que, segundo Dundr e colaboradores (2000), na mitose é interrompida no início da fase M (mitose) e os transcritos de pré-RNA_r são liberados do componente fibrilar denso, associados com os componentes do processamento. No entanto, observamos que, à semelhança do que Wachtler e Sthal (1993) observaram, a atividade transcricional das células em divisão meiótica é reprimida gradativamente, onde os genes ribossomais permanecem ativos durante a prófase I – leptóteno, zigóteno e início do paquíteno, podendo ser observada como marcações fluorescentes fortemente associadas a certas regiões cromossômicas, só sendo interrompida no paquíteno tardio.

Corroborando com os achados de Mirre e Knibiehler (1985), que encontraram variações ultraestruturais e funcionais nas espermatídes, durante a espermiogênese de camundongo, o presente trabalho também observou que as RONS reassumem sua atividade nessas células, logo após as duas divisões meióticas, durante a fase de diferenciação da espermatíde. Esta atividade cai com a entrada das espermatídes nas fases iniciais da diferenciação espermiogênica e nenhuma transcrição nucleolar é visível durante as fases posteriores.

Os dados do presente trabalho evidenciam que a atividade diferencial de RONS e fusão nucleolar são eventos que também ocorrem nas células meióticas de morcegos e que os componentes nucleolares podem se comportar de até três formas durante a divisão meiótica, como o observado para outros mamíferos.

Referências Bibliográficas

- Abrams JM, White K, Fessler LI *et al.* (1993) Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 117: 29-43.
- Angelier N, Tramier M, Louvet E *et al.* (2005) Tracking the interactions of rRNA processing proteins during nucleolar assembly in living cells. *Mol Biol Cell* 16: 2862–2871.
- Biggiogera M, Fakan S, Kaufmann SH, Black A, Shaper JH, Busch H (1989) Simultaneous immunoelectron microscopic visualization of protein B23 and C23 distribution in the HeLa cell nucleolus. *J Histochem Cytochem* 37: 1371–1374.
- Carmo-Fonseca M, Memdes-Soares L, Campos I (2000) To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* 2: E107-E112.
- Chen D, Dundr M, Wang C *et al.* (2005) Condensed mitotic chromatin is accessible to transcription factors and chromatin structural proteins. *J Cell Biol* 168: 41–54.
- Cmarko D, Verschure PJ, Rothblum LI *et al.* (2000) Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochem Cell Biol* 113: 181–187.
- Dundr M, Meier UT, Lewis N, Rekosh D, Hammariskjold ML, Olson MOJ (1997) A class of nonribosomal nucleolar components is located in chromosome periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. *Chromosoma* 105: 407-417.
- Dundr M, Mistelli T, Olson OJ (2000) The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol* 150: 433-446.

- Gautier T, Robert-Nicoud M, Guilly M-N, Hernandez-Verdun D (1992) Relocation of nucleolar proteins around chromosomes at mitosis - a study by confocal laser scanning microscopy. *J Cell Sci* 102: 729–737.
- Gautier T, Fomproix N, Masson C, Azum-Gélade MC, Gas N, Hernandez-Verdun D (1994) Fate of specific nucleolar perichromosomal proteins during mitosis: cellular distribution and association with U3 snoRNA. *Biol Cell* 82: 81–93.
- Ginisty H, Amalric F, Bouvet P (1998) Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J* 17: 1476–1486.
- Gonzalez-Garcia JM, Rufas JS (1995) Nucleolar cycle and localization of NORs in early embryos of *Parascaris univalens*. *Chromosoma* 104: 287-297.
- Guillot PV, Martin S, Pombo A (2005) The organization of transcription in the nucleus of mammalian cells. In: Hemmerich P, Diekmann S (eds) *Visions of the cell nucleus*. ASP, CA, 95–105.
- Hernandez-Verdun D, Roussel P, Gautier T (1993) Nucleolar proteins during mitosis. *Chromosomes Today* 11: 79–90.
- Hofgärtner FJ, Schmid M, Krone W *et al.* (1979) Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammal as analyzed by silver-staining. *Chromosoma (Berl)* 71: 197-216.
- Howell WM (1982) Selective staining of nucleolus organizer regions (NORs). In: Busch, H., Rothblum, L. (Eds.). *The Cell Nucleolus*, Academic Press, New York 89-143.
- Jordan P, Mannervik M, Tora L, Carmo-Fonseca M (1996) *In vivo* evidence that TATA-binding protein/SL1 colocalizes with UBF and RNA polymerase I when rRNA synthesis is either active or inactive. *J Cell Biol* 133: 225-234.
- Kavalco KF, Pazza R (2004) A rapid alternative technique for obtaining silver-positive patterns in chromosomes. *Genet Mol Biol* 27,2: 196-198.

- Kosower NS, Katayose H, Yanagimachii R (1992) Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl* 13: 342-348.
- Leung AK, Gerlich D, Miller G *et al.* (2004) Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J Cell Biol* 166: 787–800.
- Marchesin SRC (2002) Análise citogenética em espécies de Vespertilionidae dos gêneros *Eptesicus*, *Hitiotus*, *Lasiurus* e *Myotis* (Chiroptera, Mammalia). (98.f). Dissertação (Mestrado em Genética) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto.
- Mello MLS (1995) Relocation of RNA metachromasy at mitosis. *Acta Histochem Cytochem* 28: 149-154.
- Mirre C, Knibiehler B (1985) Ultrastructural and functional variations in the spermatid nucleolus during spermatogenesis in the mouse. *Cell Differ* 16: 51-61.
- Morielle E, Varella-Garcia M (1988) Variability of nucleolus organizer regions in Phyllostomid bats. *Brasil J Genet* 11: 853-871.
- Morielle-Versute E, Varella-Garcia M, Taddei VA (1996) Karyotypic patterns of seven species of Molossid bats (Molossidae, Chiroptera). *Cytogenet Cell Genet* 72: 26-33.
- Oliveira-Filho AB (1999) Microdisseção testicular: repercussões vasculares homolateral, epiteliais contra-lateral, imunológicas e hormonais. Projeto de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Urologia. UNIFESP. São Paulo-SP, 19p.
- Puvion-Dutilleul F, Bachellerie J-P, Puvion E (1991) Nucleolar organization of HeLa cells as studied by *in situ* hybridization. *Chromosoma* 100: 395–409.
- Puvion-Dutilleul F, Puvion E, Bachellerie J-P (1997) Early stages of pre-rRNA formation within the nucleolar ultrastructure of mouse cells studied by *in situ* hybridization with 5'ETS leader probe. *Chromosoma* 105: 496–505.

- Roussel P, André C, Masson C, Géraud G, Hernandez-Verdun D (1993) Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle. *J Cell Sci* 104: 1327–1337.
- Roussel P, André C, Comai L, Hernandez-Verdun D (1996) The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol* 133: 235–246.
- Savino TM, Gébrane-Younès J, De Mey J, Sibarita J-B, Hernandez-Verdun D (2001) Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol* 153: 1097–1110.
- Schwaezacher HG, Wachtler F (1993) The nucleolus. *Anat Embryol* 188: 515-536.
- Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D (1999) The mitotically phosphorylated form of the transcription termination factor TTF-1 is associated with the repressed rDNA transcription machinery. *J Cell Sci* 112: 3259–3268.
- Sirri V, Hernandez-Verdun D, Roussel P (2002) Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus. *J Cell Biol* 156: 969–981.
- Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D (2008) Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* 129: 13-31.
- Souza MJ, Araújo MCP (1990) Conservative pattern of the G-bands and diversity of C-banding patterns and NORs in Stenodermatinae (Chiroptera-Phyllostomatidae). *Rev Brasil Genet* 13: 255-269.
- Strouboulis J, Wolffe AP (1996) Functional compartmentalization of the nucleus. *J Cell Sci* 109: 1991–2000.
- Volleth M (1987) Differences in location of nucleolus organizer regions in European Vespertilionid bats. *Cytogenet Cell Genet* 44: 186-197.
- Wachtler F, Stahl A (1993) The nucleolus: a structural and functional interpretation. *Mícron* 24: 473-505.

Weisenberger D, Scheer U (1995) A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. J Cell Biol 129: 561-575.

Fig. 1 Células testiculares de *Artibeus lituratus* submetidas a impregnação por nitrato de prata. **A.** Espermatogônia. **B.** Espermatócito primário em leptóteno. **C.** Espermatócitos primário em início de paquíteno. **D - F.** Espermatócitos primário em paquíteno. **G - I.** Espermatócitos primário em diplóteno. **J.** Metáfase I, com seis cromossomos marcados (setas). **K.** Metáfase II, com um único cromossomo marcado (seta). **L.** Espermátides. Barras = 10 µm.

Fig. 2 Células testiculares de *Carollia perspicillata* submetidas a impregnação por nitrato de prata. **A.** Espermatócito primário em leptóteno. **B.** Espermatócito primário em início de paquíteno. **C e D.** Espermatócitos primário em paquíteno. **E.** Espermatócito primário em paquíteno-diplóteno. **F.** Espermatócito primário em diplóteno. **G e H.** Metáfases II. Notar um único cromossomo marcado em G (seta). **I.** Espermátides. Barras = 10 µm.

Fig. 3 Células testiculares de *Platyrrhinus lineatus* submetidas a impregnação por nitrato de prata. **A.** Espermatogônia. **B.** Espermatócito primário em leptóteno. **C.** Espermatócito primário em início de paquíteno. **D.** Espermatócito primário em paquíteno. **E.** Espermatócito primário em leptóteno. **F.** Espermatócito primário em zigóteno. **G.** Metáfase mitótica, com dois cromossomos marcados (setas). **H.** Metáfase meiótica I, com uma única marcação (seta). **I.** Espermátides. Barras = 10 µm.

Fig. 4 Células testiculares de *Myotis nigricans* submetidas a impregnação por nitrato de prata. **A.** Espermatogônia com sete marcações (setas). **B.** Espermatócito primário em início de paquíteno. **C.** Espermatócitos primário em paquíteno. **D.** Espermatócito primário em

paquíteno-diplóteno. **E.** Metáfase I, com cinco marcações (pontas de seta). **F.** Espermatíde com quatro marcações. Barras = 10 μ m.

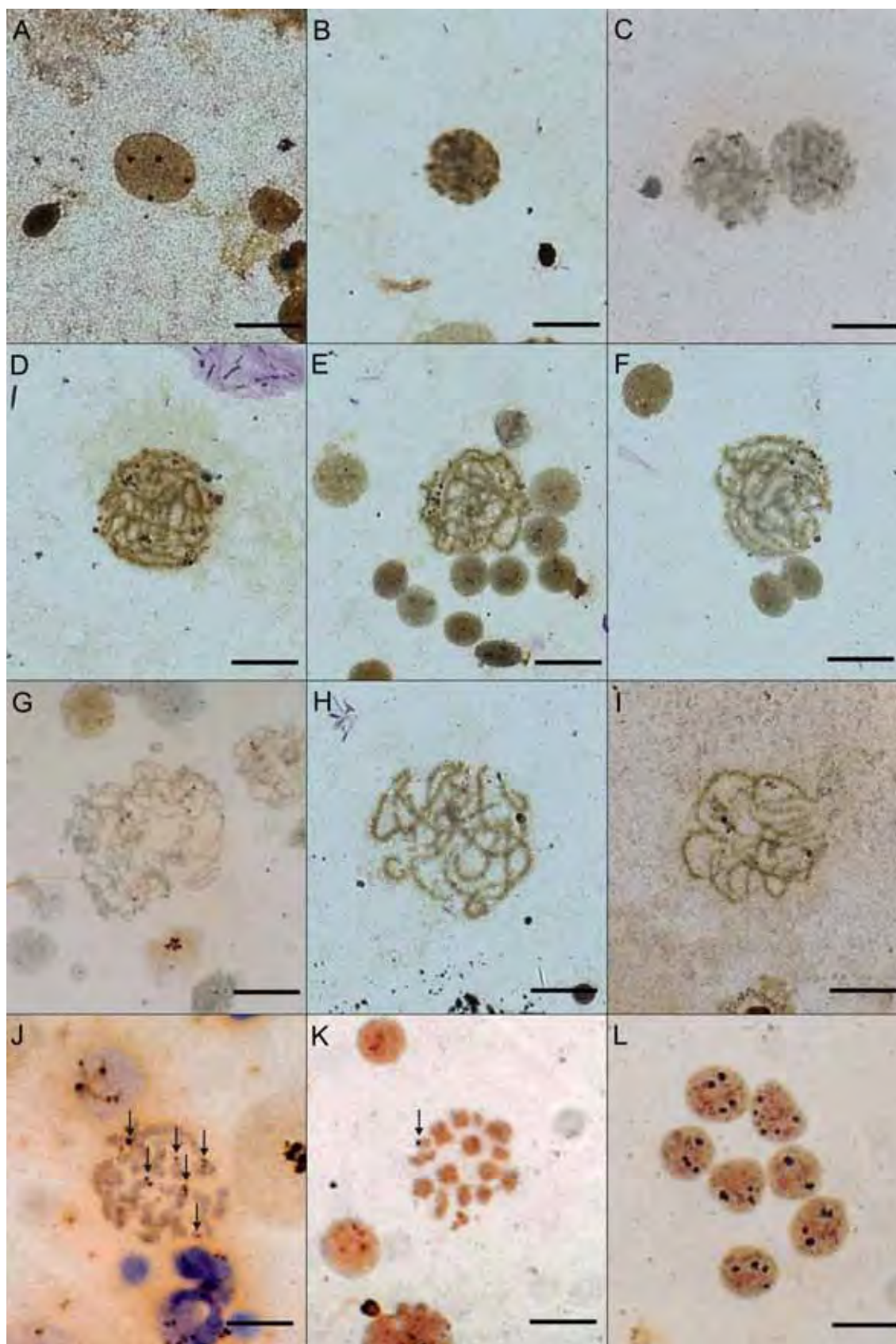
Fig. 5 Células testiculares de *Carollia perspicillata* (A – H) e de *Platyrrhinus lineatus* (I – T) submetidas a hibridização *in situ* fluorescente (FISH). **A.** Espermatogônia. **B.** Espermatócito primário em leptóteno. **C.** Espermatócito primário em zigóteno. **D.** Espermatócito primário em início de paquíteno. **E.** Espermatócito primário em paquíteno. **F.** Espermatócito primário em paquíteno-diplóteno. **G.** Espermatíde recém formada. **H.** Espermatídes tardias. **I.** Célula mióide com duas marcações. **J.** Espermatogônia com uma única marcação. **K.** Espermatogônia com duas marcações (setas). **L.** Espermatócito primário em leptóteno com uma única marcação. **M.** Espermatócito primário em zigóteno. **N.** Espermatócito primário em início de paquíteno. **O e P.** Espermatócitos primário em paquíteno. Notar as RONS se separando (setas). **Q.** Espermatócito primário em zigóteno. Notar as duas RONS já separadas. **R.** Espermatócito primário em início de paquíteno com as RONS separadas (pontas de seta). **S.** Espermatócito primário em paquíteno-diplóteno com as RONS separadas (setas). **T.** Espermatíde. Barras = 10 μ m.

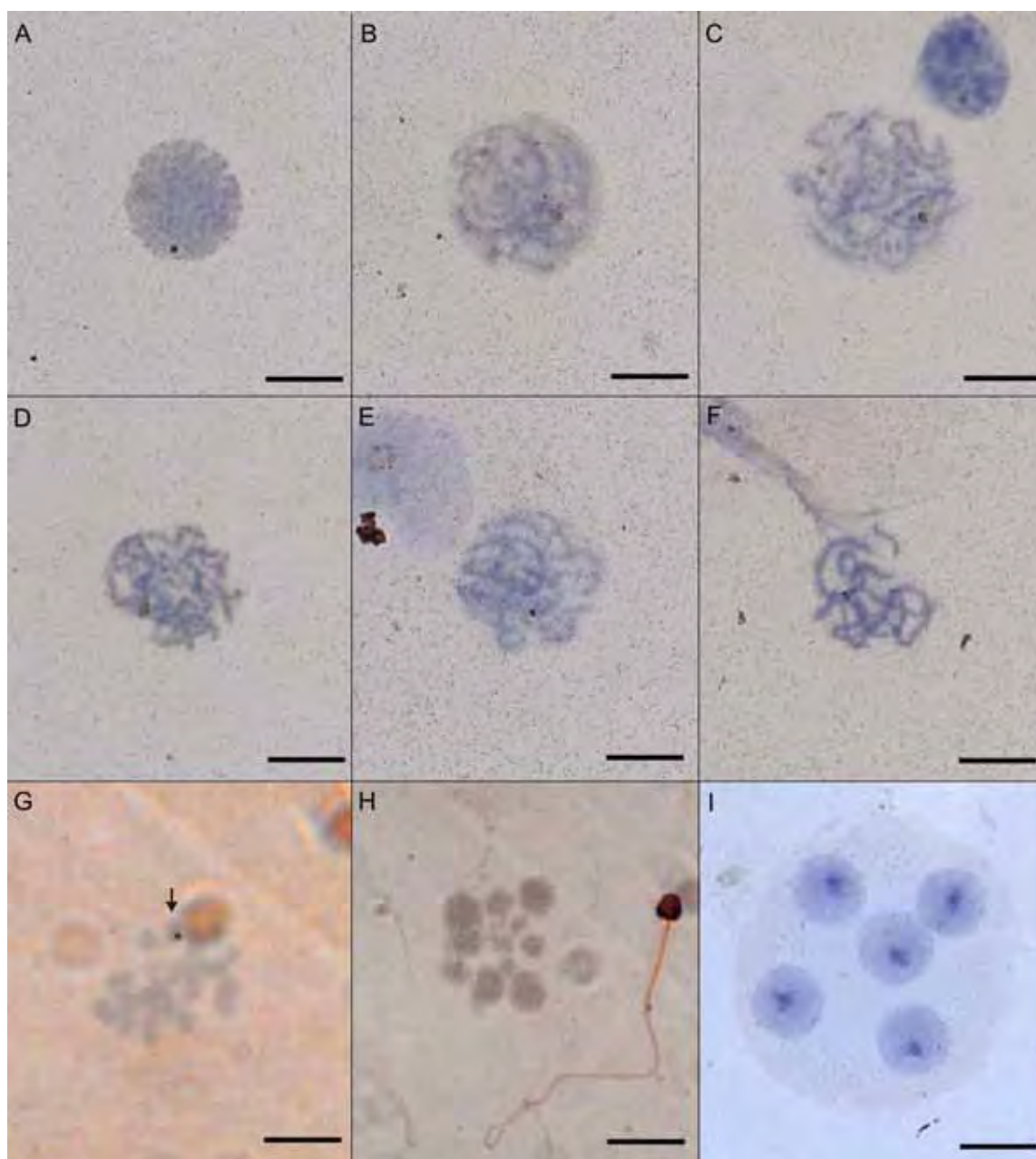
Fig. 6 Células testiculares de *Artibeus lituratus* submetidas a hibridização *in situ* fluorescente (FISH). **A.** Espermatócito primário em leptóteno com três marcações (setas). **B.** Espermatócito primário em zigóteno com as seis RONS separadas (setas). **C.** Espermatócito primário em início de paquíteno com apenas três marcações (setas). **D.** Espermatócito primário em paquíteno com seis marcações (setas). **E.** Espermatócito primário em diplóteno com seis marcações (pontas de seta). **F.** Metáfase II com três cromossomos marcados (pontas de seta). **G.** Espermatíde com uma única e grande marcação. **H.** Espermatíde com três marcações. Barras = 10 μ m.

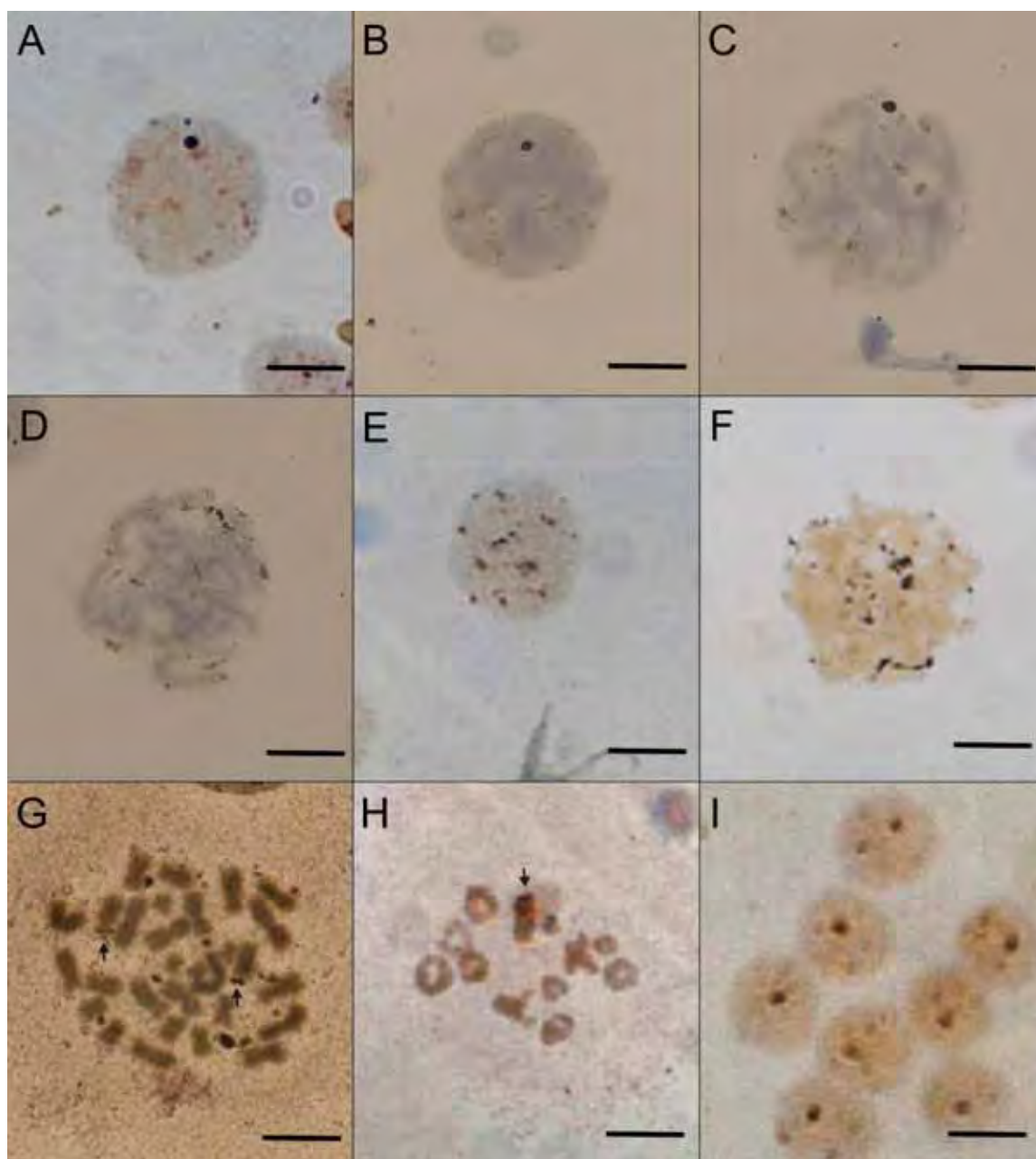
Fig. 7 Células testiculares de *Myotis nigricans* submetidas a hibridização *in situ* fluorescente (FISH). **A.** Espermatogônia com seis marcações (setas). **B.** Espermatócito primário em zigóteno com uma grande marcação (seta). **C.** Espermatócito primário em paquíteno. **D.** Espermatócito primário em paquíteno. **E.** Espermátide recém formada com cinco marcações (setas). **F.** Espermátide tardia com duas marcações. Barras = 10 μ m.

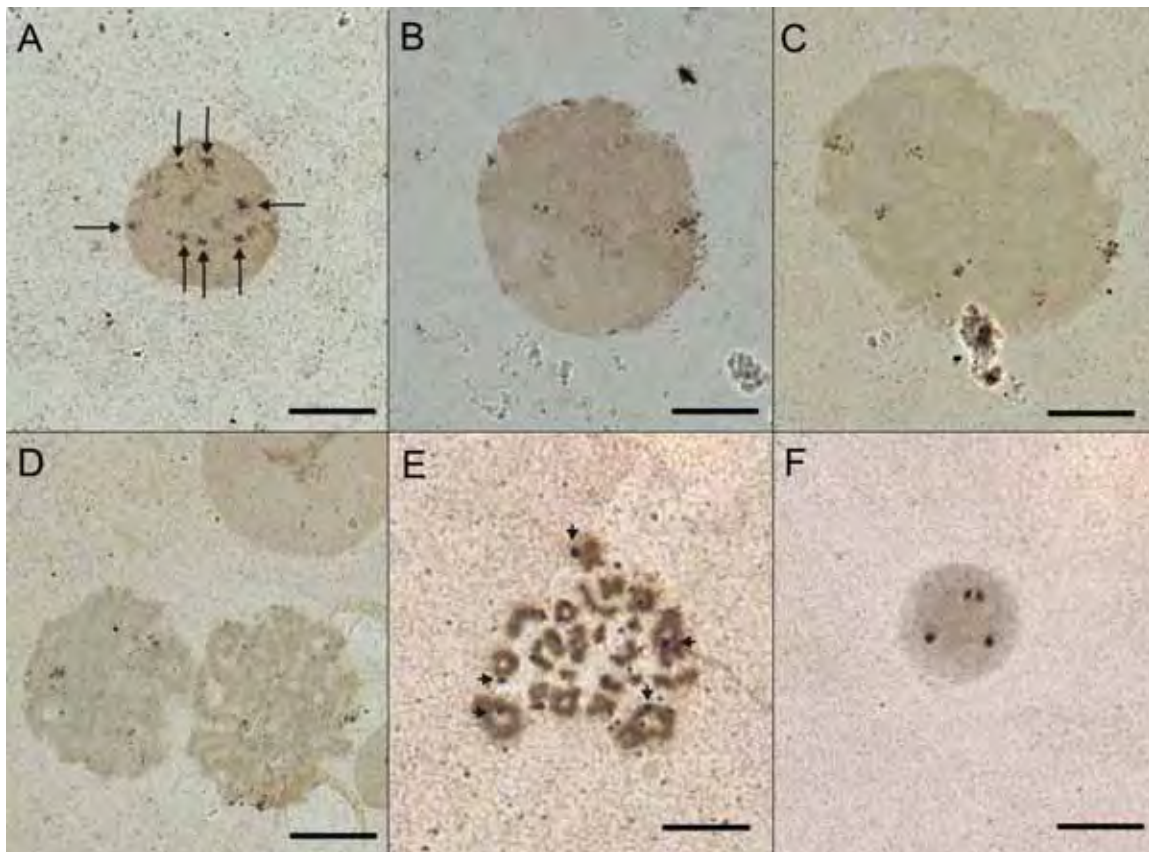
Fig. 8 Células testiculares de *Carollia perspicillata* (A – H) e de *Platyrrhinus lineatus* (I – P) coradas com o alaranjado de acridina. **A.** Espermatogônia. **B.** Espermatócito primário em leptóteno. **C.** Espermatócito primário em zigóteno. **D.** Espermatócito primário em início de paquíteno. **E.** Espermatócito primário em paquíteno. **F.** Espermatócito primário em paquíteno-diplóteno. **G.** Metáfase. **H.** Espermátides. **I.** Espermatogônia. **J.** Espermatócito primário em leptóteno. **K e L.** Espermatócitos primário em paquíteno. Notar a marcação de RNA se desligando dos cromossomos (seta). **M e N.** Espermatócitos primário em diplóteno. **O.** Metáfase I. **P.** Espermátides. Barras = 10 μ m.

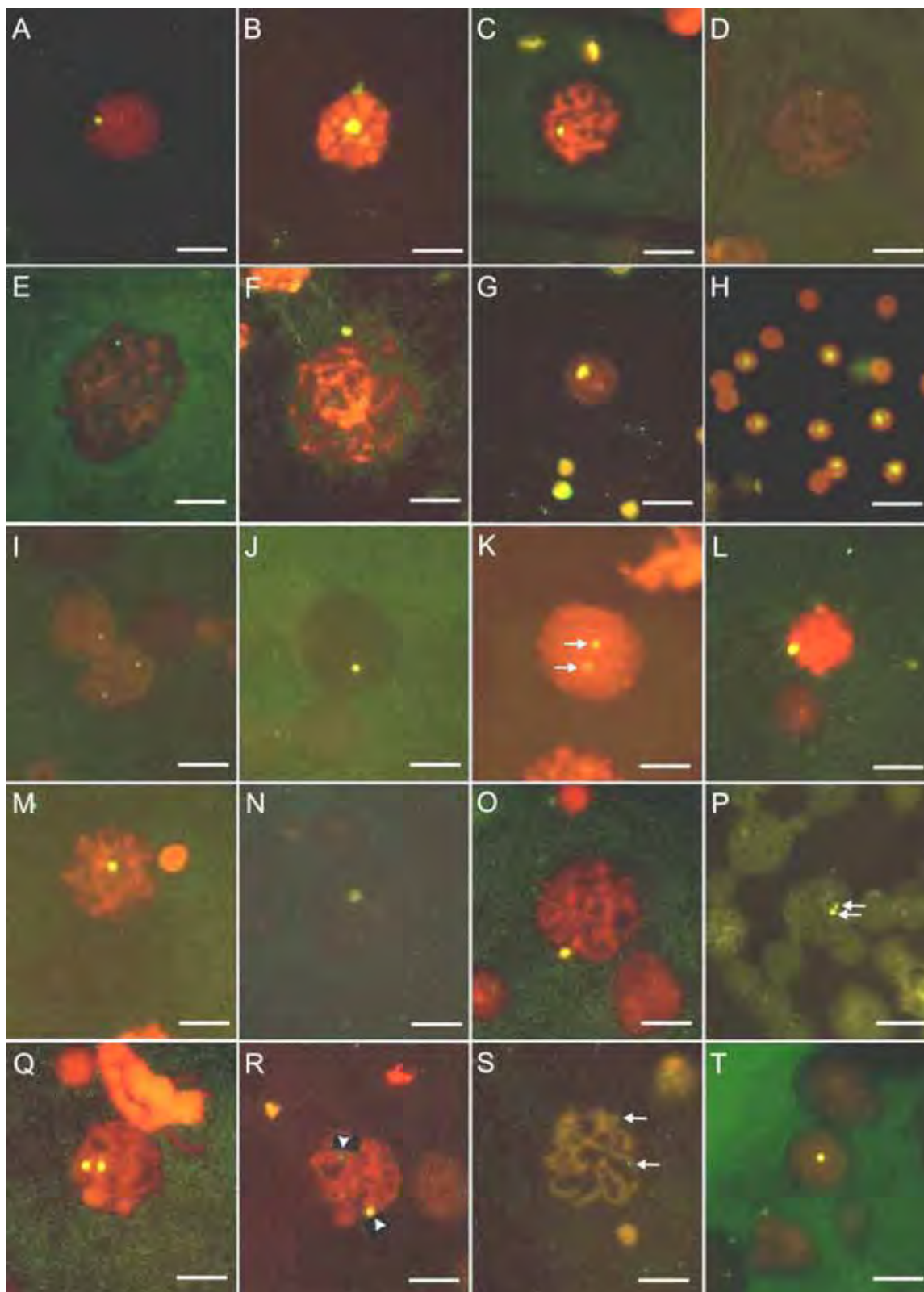
Fig. 9 Células testiculares de *Artibeus lituratus* (A – H) e de *Myotis nigricans* (I – P) coradas com o alaranjado de acridina. **A.** Espermatogônias. **B.** Espermatócito primário em zigóteno. **C - E.** Espermatócitos primário em paquíteno. **F.** Espermatócito primário em diplóteno. **G.** Metáfase II. **H.** Espermátides. **I.** Espermatogônias. **J e K.** Espermatócitos primário em leptóteno. **L.** Espermatócito primário em zigóteno. **M.** Espermatócito primário em paquíteno-diplóteno. **N e O.** Espermatócitos primário em diplóteno. **P.** Espermátides. Barras = 10 μ m.

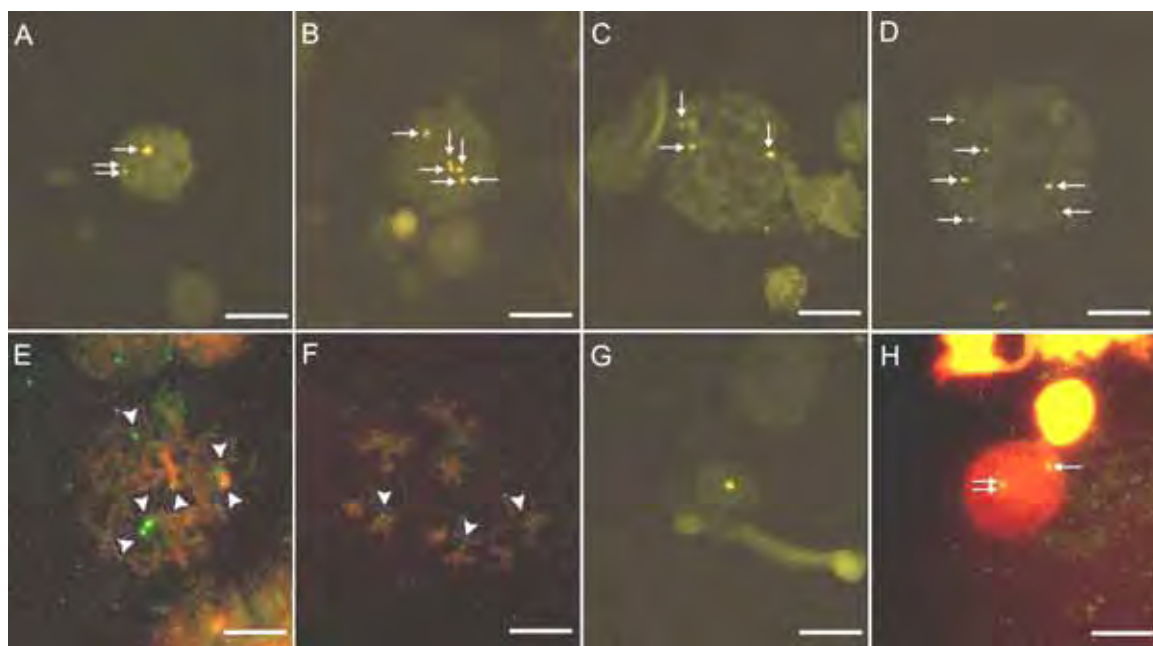


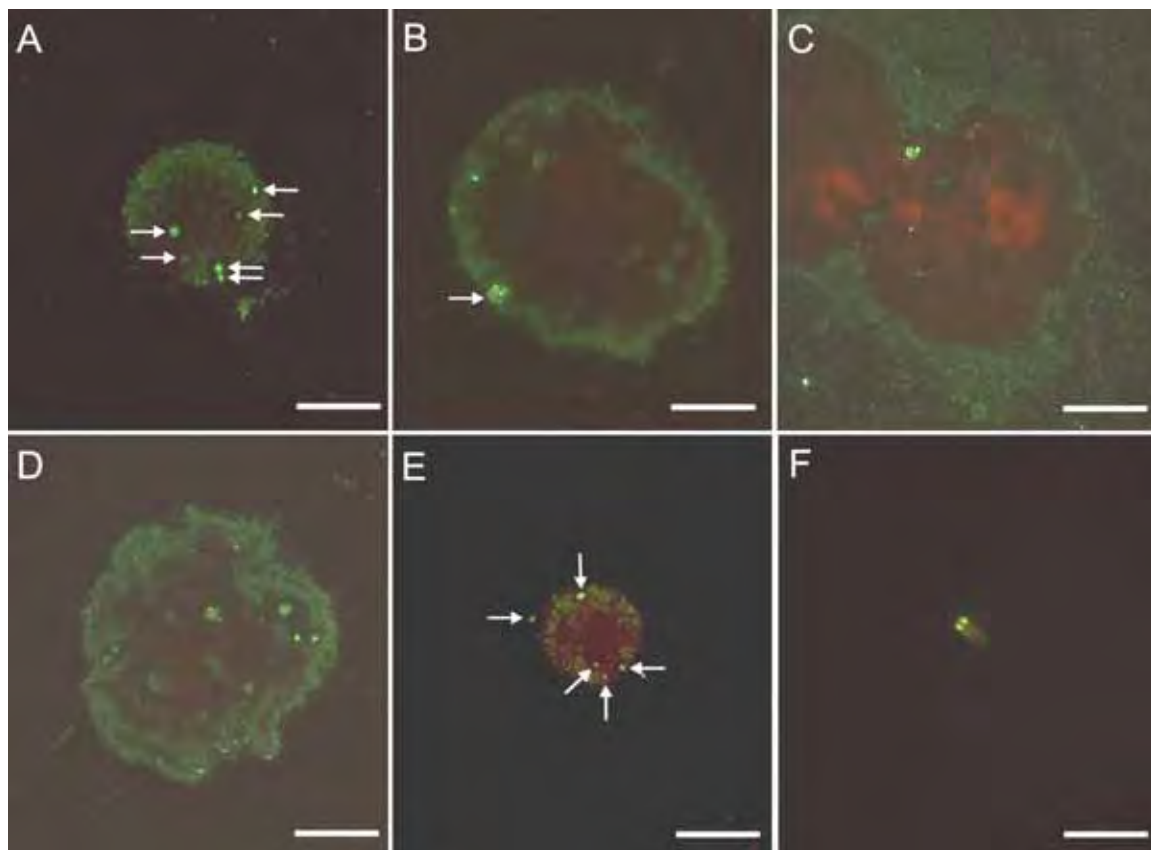


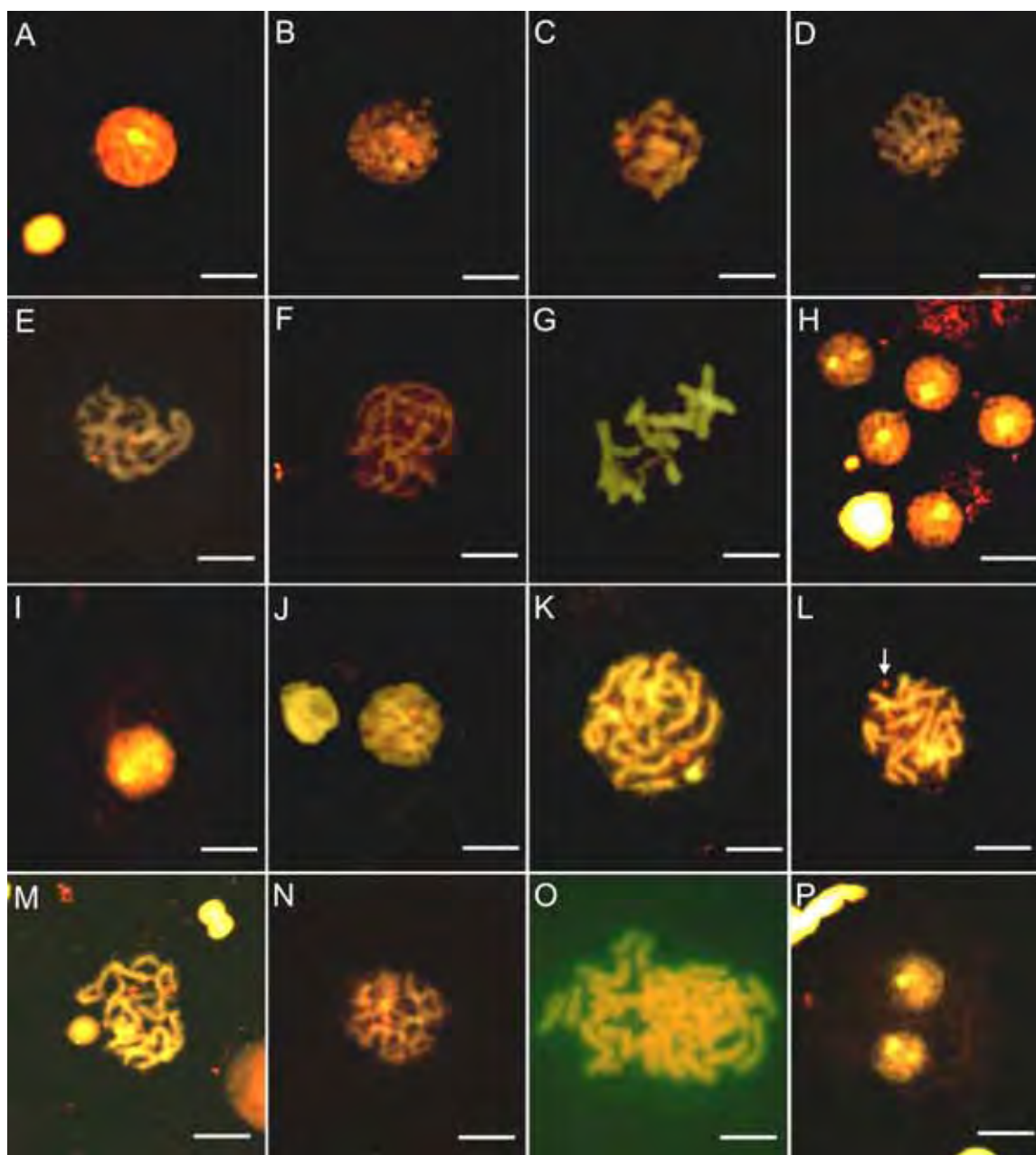


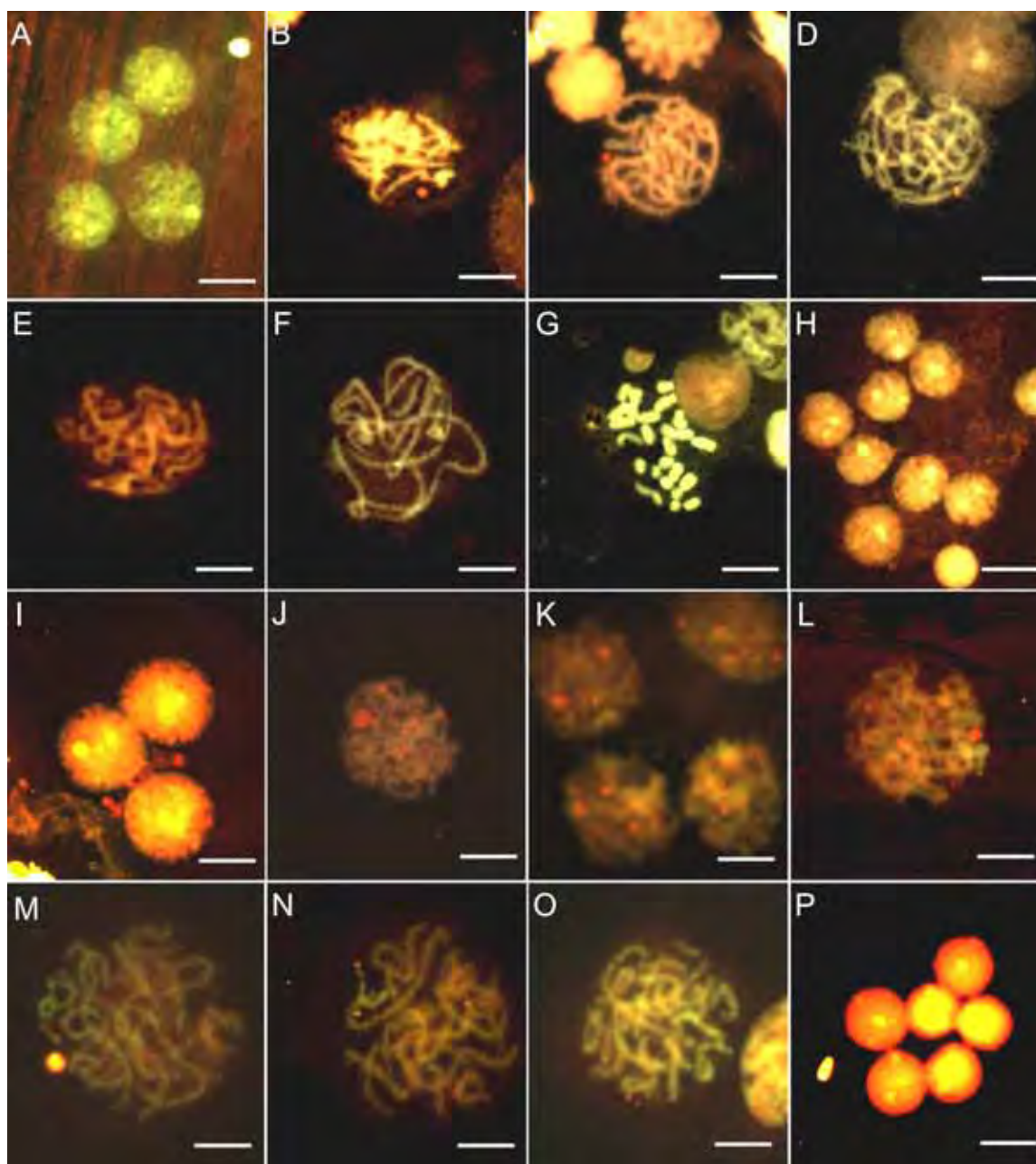












VI. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Apesar da espermatogênese ser um processo já bem estudado em várias espécies de roedores, no ser humano e outros mamíferos, poucos estudos foram feitos em Chiroptera, uma grande e diversa ordem que apresenta mais de mil espécies distribuídas em vários habitats. Devido a grande diversidade de espécies, a ampla distribuição geográfica e a grande variação dos aspectos biológicos é possível que processos fisiológicos, como os reprodutivos, apresentem acentuadas diferenças entre essas espécies.

A variação reprodutiva em Chiroptera é ampla, existindo desde espécies tropicais que se reproduzem durante o ano todo, até espécies de clima temperado que hibernam e se reproduzem apenas em uma determinada época do ano. Há muitas diferenças também relativas ao comportamento reprodutivo (forma da cópula, escolha de casais, estabelecimentos de haréns, etc), tamanho da prole, além de aspectos como a sazonalidade e o armazenamento e a maturação diferencial de espermatozóides.

Dentro desses aspectos, no presente estudo procuramos analisar diferentes aspectos relacionados à espermatogênese e também a nucleologênese de algumas espécies de morcegos, procurando entender melhor esses múltiplos mecanismos que governam a fisiologia reprodutiva de Chiroptera.

As características morfológicas das células germinativas dos filostomídeos analisados são conservadas e diferem acentuadamente das de *M. nigricans*, um vespertilionídeo, não só em relação à morfologia, mas, principalmente, quanto à cinética e ao comportamento. Diferente do apresentado pela maioria dos mamíferos e das espécies de filostomídeos, a espermatogênese de *M. nigricans* não apresenta um ciclo do epitélio seminífero totalmente definido, apresentando ciclos indefinidos e sobreposição de fases.

Essa espécie, possivelmente, apresenta adaptações ao clima tropical, uma vez que já não apresenta mais a fase hibernante, comum as espécies de clima temperado do seu gênero. Essas acentuadas diferenças reprodutivas de *M. nigricans* podem estar ligadas a sua maior distância filogenética onde, pertencendo a outra família (Vespertilionidae), já divergiu das outras espécies há um tempo bem maior, podendo assim acumular diferenças significativas.

As características nucleolares das células de Sertoli das espécies de Phyllostomidae apresentaram um padrão similar a dos molossídeos, *C. planirostris* e *M. rufus*, com um único e bem distinto nucléolo que é formado pela interação de todas as RONS em um único ponto, esse apresenta um padrão de expressão periférica e a relação de área nuclear/área nucleolar é proporcional ao número total de RONS que as espécies apresentam. No entanto, as características dos vespertilionídeos analisados e de *M. molossus* se diferenciam das demais, tanto qualitativa quanto quantitativamente. Essa diferenciação, possivelmente, se deve a uma regulação fisiológica exclusiva de *M. molossus* e a Vespertilionidae ter divergido a um bom tempo de Phyllostomidae e Molossidae.

Com essas características podemos propor que apesar da importância funcional que as células de Sertoli apresentam e aos vários mecanismos que regulam, o padrão nucleolar se diferencia dentro e entre as diferentes famílias de morcegos e que, dentro de uma mesma família, ele varia de acordo com o número de RONS que as espécies apresentam.

A nucleogênese nas diferentes espécies analisadas ocorre de maneira semelhante ao observado para muitos mamíferos, onde os componentes nucleolares podem se comportar de até três formas durante a divisão meiótica, dissolver-se no nucleoplasma, associar-se às regiões pericromossomais ou ficar ligado às RONS durante toda a divisão. Por outro lado, diferente do observado na mitose, os genes ribossomais permanecem ativos durante a prófase I – leptóteno, zigóteno e início de paquíteno e a persistência nucleolar

também pode ser observada, sendo que o grau de fusão nucleolar aumenta nas espécies com maior número de RONS.

As variações na intensidade das marcações fluorescentes, após o FISH, podem ser interpretadas, possivelmente, como uma possível diferença no tamanho dos loci de DNAr que as espécies apresentam. O número de RONS que as espécies apresentam foi inversamente relacionado a intensidade das marcações fluorescentes.

A análise conjunta dos resultados evidencia que as características reprodutivas dos morcegos estudados estão intimamente relacionadas às famílias as quais pertencem e que, apesar de possuírem um perfil de nucleologênese semelhante, as espécies ainda apresentam diferenças importantes em relação ao nucléolo. Com esses estudos esclarecemos alguns aspectos da espermatogênese e da nucleologênese de morcegos, assim como levantamos dados que podem ser utilizados em análises filogenéticas multifatoriais, para uma melhor elucidação das relações filogenéticas entre as espécies de morcegos.

Assim, são conclusões deste trabalho:

- de maneira geral, a espermatogênese dos morcegos analisados assemelha-se a dos outros mamíferos já estudados, apresentando células de Leydig e de Sertoli com características similares e três tipos principais de espermatogônias (A_d , A_p e B).
- a espermiogênese das espécies analisadas, avaliada pela coloração por hematoxilina-eosina, apresenta diferenças em relação à forma de diferenciação e ao número de passos, podendo ser subdividida em sete passos.

- o ciclo do epitélio seminífero dos filostomídeos analisados pode ser distintamente separado em oito fases e uma única fase foi observada em cada secção do epitélio seminífero.
- *Myotis nigricans* apresenta uma assincronia no ciclo do epitélio seminífero, apresentado sobreposição de fases, o que pode ser devido a uma adaptação ao ambiente tropical.
- as frequências dos estágios do ciclo do epitélio seminífero foram similares para todas as espécies, com o estágio 5 tendo a mais alta frequência e o estágio 4 a mais baixa.
- as frequências das fases do ciclo do epitélio seminífero também foram similares, com uma maior frequência da fase pós-meiótica (mais de 50%) e menor da meiótica (menos de 10%), o que está de acordo com o observado na literatura para outros microquirópteros.
- as características morfológicas das células germinativas dos filostomídeos são conservadas entre as suas diferentes espécies e diferem acentuadamente das de *M. nigricans*, não só em relação à morfologia, mas, principalmente, quanto à cinética e ao comportamento.
- na maioria dos morcegos estudados observamos um único nucléolo central nas células de Sertoli, no entanto, esse pode ser distinguido em um número variável de subcomponentes, que variaram de acordo com o número de RONS ativos.

- devido possivelmente a menor distancia filogenética, as características nucleolares das células de Sertoli dos filostomídeos são conservadas entre as suas diferentes espécies e assemelham-se fortemente as características dos molossídeos analisados, no entanto, essas diferem acentuadamente das dos vespertilionídeos, por seu maior tempo de divergência, e de *M. molossus*, possivelmente, por essa espécie apresentar uma autoapomorfia.
- as marcações encontradas no FISH corroboram alguns estudos de citogenética convencional, confirmando o número de loci de DNAr (RONs) observados após coloração pela prata, ou seja, apenas um sítio de DNAr em *Carollia perspicillata*, dois em *Platyrrhinus lineatus*, seis em *Artibeus lituratus* e *Artibeus planirostris* e dez em *Myotis nigricans*.
- o número de RONs que a espécie apresenta está inversamente relacionado a intensidade das marcações fluorescentes evidenciadas pelo FISH.
- uma elevada taxa de fusão nucleolar pôde ser observada nos morcegos analisados, sendo que esta é mais facilmente evidenciada nas células das espécies com maior número de RONs.
- a nucleologênese nas diferentes espécies analisadas ocorre de maneira semelhante, onde os componentes nucleolares podem se comportar de até três formas durante a divisão meiótica: parte dos componentes se dissocia do nucléolo e dissolve-se no nucleoplasma, outra parte permanece associada às regiões organizadoras nucleolares (RONs) durante toda

a divisão celular e a última parte dissocia-se do nucléolo e associa-se as regiões pericromossomais.

– a atividade transcricional das células em divisão meiótica é reprimida gradativamente, onde os genes ribossomais permanecem ativos durante a prófase I – leptóteno, zigóteno e início do paquíteno

– as RONS reassumem sua atividade nas espermatídes, logo após as duas divisões meióticas. Esta atividade cai com a entrada das espermatídes nas fases iniciais da diferenciação espermiogênica e nenhuma transcrição nucleolar é visível durante as fases posteriores.

– as espécies que apresentam maior número de RONS, apresentaram um maior número de nucléolos por célula interfásica, assim como uma maior quantidade de material nucleolar nas células em divisão.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, R. J.; HOOD, C. S.; HONEYCUTT, R. L. Phylogenetic relationships and classification of the higher categories of the New World bat family Phyllostomidae. **Syst. Zool.**, v. 38, p. 228-238, 1989.

BAKER, R. J.; HOOVER, S. R.; PORTER, C. A.; VAN DEN BUSSCHE, R. A. Diversification among New World Leaf-Nosed Bats: an evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence. **Spec. Publ. Mus. Texas Tech. Univ.**, v. 230, p. 1-32, 2003.

BITENCOURT, V. L.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P.; FONSECA, C. C.; BENJAMIN, L. A.; COSTA, D. S. The seminiferous epithelium cycle and daily spermatid production in the adult maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811). **Micron**, v. 38, p. 584-589, 2007.

BRADBURY, J.; VEHCENCAMP, S. Social organization and foraging in emballonurid bats. III. Mating systems. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, v. 2, p. 1-17, 1977.

CARMO-FONSECA, M.; MENDES-SOARES, L.; CAMPOS, I. To be or not to be in the nucleolus. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, p. E107-E112, 2000.

COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. Espermatogênese em Mamíferos. **Scientia Vila Velha (ES)**, v. 4 (1/2), p. 53-72, 2003.

DE ROOIJ, D. G.; VAN ALPHEN, M. M. A.; VAN DE KANT, H. J. G. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and its stages in the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Biol. Reprod.**, v. 35, p. 587-591, 1986.

DUNDR, M.; OLSON, M. O. J. Partially processed pre-rRNA is preserved in association with processing components in nucleolus-derived foci during mitosis. **Mol. Biol. Cell.**, v. 9, p. 2407-2422, 1998.

DUNDR, M.; MISTELLI, T.; OLSON, O. J. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. **J. Cell Biol.**, v. 150, p. 433-446, 2000.

DUNDR, M.; MEIER, U. T.; LEWIS, N.; REKOSH, D.; HAMMARSKJOLD, M. L.; OLSON, M. O. J. A class of nonribosomal nucleolar components is located in chromosome periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. **Chromosoma**, v. 105, p. 407-417, 1997.

ENDERS, G. C.; MILLETTE, C. F. Pachytene spermatocyte and round spermatid binding to Sertoli cells *in vitro*. **J. Cell Sci.**, v. 90, p. 105-114, 1988.

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

FOMPROIX, N.; GÉRBRANE-YOUNÉS, J.; HERNANDEZ-VERDUN, D. Effects of anti-fibrillarin antibodies on building of functional nucleoli at the end of mitosis. **J. Cell Sci.**, v. 111, p. 359-372, 1998.

FOREMAN, D. Seminiferous tubule stages in the prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) during the annual breeding cycle. **Anat. Rec.**, v. 247, p. 355-367, 1997.

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

JONES, K. E.; CARTER, D. C. Annotated checklist, with keys to subfamilies and genera. **Spec. Publ. Mus. Texas Tech. Univ.**, v. 10, p. 7-38, 1976.

JONES, K. E.; PURVIS, A.; MACLARNON, A.; BININDA-EDMONDS, O. R. P.; SIMMONS, N. B. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). **Biol. Rev.**, v. 77, p. 223-259, 2002.

JORDAN, P.; MANNERVIK, M.; TORA, L.; CARMO-FONSECA, M. *In vivo* evidence that TATA-binding protein/SL1 colocalizes with UBF and RNA polymerase I when rRNA synthesis is either active or inactive. **J. Cell Biol.**, v. 133, p. 225-234, 1996.

KOOPMAN, K. F. Zoogeography of bats. In: About bats. A Chiropteran Biology Symposium. Dallas: Southern Methodist University Press. 339p, 1970.

KOOPMAN, K. F. Mammal Species of the world. A taxonomic and geographic reference. Washington and London: **Smithsonian Institution Press.**, p. 137-241 1993.

LEITE, F. L. G.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P.; FONSECA, C. C.; NEVES, M. T. D.; BARROS, J. B. G. Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). **Anim. Reprod. Sci.**, v. 91, p. 307-316, 2006.

MARCHESIN, S. R. C. **Análise citogenética em espécies de Vespertilionidae dos gêneros *Eptesicus*, *Hitiotus*, *Lasiurus* e *Myotis* (Chiroptera, Mammalia).** Dissertação (Mestrado em Genética) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto 98 p., 2002.

MATSUMOTO, A. M. Spermatogenesis. Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996.

MELLO, M. L. S. Nucléolo. A Célula 2001. Editora Manole Ltda, Barueri – SP. p. 101-110, 2001.

MORIELLE, E.; VARELLA-GARCIA, M. Variability of nucleolus organizer regions in Phyllostomid bats. **Brasil J. Genet.**, v. 11, p. 853-871, 1988.

MORIELLE-VERSUTE, E.; VARELLA-GARCIA, M.; TADDEI, V. A. Karyotypic patterns of seven species of Molossid bats (Molossidae, Chiroptera). **Cytogenet. Cell. Genet.**, v. 72, p. 26-33, 1996.

NOWAK, R. M. Chiroptera. In: Walker's mammals of the world. 6.ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press. v. 1, p. 253-489, 1999.

OSMAN, D. I.; PLÖEN, L. Spermatogenesis in the camel (*Camelus dromedarius*). **Anim. Reprod. Sci.**, v. 10, p. 23-36, 1986.

PARVINEN, M.; SÖDER, O.; MALI, P.; FRÖYSA, B.; RITZÉN, E. M. *In vitro* stimulation of stage-specific deoxyribonucleic acid synthesis in rat seminiferous tubule by interleukin-1 α . **Endocrinology**, v. 129, p. 1614-1620, 1991.

PETTIGREW, J. D. Flying primates: crashed, or crashed through? In: Ecology, evolution and behavior of bats. **Symposium of the Zoological Society of London**, v. 67, p. 3-26, 1995.

PETTIGREW, J. D.; JAMIESON, B. G. M. Are flying foxes (Chiroptera: Pteropodidae) really primates? *Australian Mammal*. 10, 119-124, 1987.

PETTIGREW, J. D.; JAMIESON, B. G. M.; ROBSON, S. K.; HALL, L. S.; MCANALLY, K. I.; COOPER, H. M. Phylogenetic relations between microbats, megabats and primates (Mammalia: Chiroptera and Primates). **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v. 325, p. 489-559, 1989.

REIS, N. L.; PERACCHI, A. I.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. Ordem Chiroptera. 1.ed. In: Mamíferos do Brasil. Universidade Estadual de Londrina. v. 1, p. 153-230, 2006.

ROUSSEL, P.; ANDRÉ, C.; COMAI, L.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. **J. Cell Biol.**, v. 133, p. 235-246, 1996.

RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. The Sertoli cell. Clearwater, Florida: Cache River Press., 1993.

SAVINO, T. M.; GÈBRANE-YOUNÉS, J.; MEY, J. D.; SIBARITA, J. B.; HERNANDEZ-VERDUN, D. Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. **J. Cell Biol.**, v. 115, p. 1097-1110, 2001

SCHEER, U.; HOCK, R. Structure and function of the nucleolus. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 11, p. 385-390, 1999.

SCHEER, U.; THIRY, M.; GOESSENS, G. Structure, function and assembly of the nucleolus. **Trends Cell Biol.**, v. 3, p. 236-241, 1993.

SIMMONS, N. B. The case for chiropteran monophyly. **Amer. Mus. Novitates**, v. 3103, 54 p., 1994.

SIMMONS, N. B. Bat relationships and the origin of flight. In: Ecology, evolution and behavior of bats. **Symposium of the Zoological Society of London**, v. 67, p. 27-43, 1995.

SIMMONS, N. B. A reappraisal of interfamilial relationships of bats. In: Bat: biology and conservation. Smithsonian Institution Press. London. p. 3-26, 1998.

SIMMONS, N. B. Order Chiroptera. In: *Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference*. 3.ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press. v. 1, p. 312-529, 2005.

SIMMONS, N. B.; GEISLER, J. H. Phylogenetic relationships of *Icaronycteris*, *Archeonycteris*, *Hassianycteris* and *Palaeochiropteryx* to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocation and foraging strategies in Microchiroptera. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 235, p. 1-182, 1998.

SIMMONS, N. B.; CONWAY, T. Evolution of ecological diversity in bats. In: Bat Ecology. University of Chicago Press, 2003.

SMITH, J. D. Chiropteran evolution. **Spec. Publ. Mus. Texas Tech. Univ.**, v. 10, p. 49-69, 1976.

SMITH, J. D.; MADKOUR, G. Penial morphology and the question of chiropteran phylogeny. In: Proceedings Fifth International Bat Research Conference. Lubbock: **Texas Tech Press**. p. 347-365, 1980.

TADDEI, V. A. The reproduction of some Phyllostomidae (Chiroptera) from the northwestern region of the State of São Paulo. **Biol. Zool. Univ. São Paulo**. v. 1, p. 313-330, 1976.

TADDEI, V. A. Biologia reprodutiva de Chiroptera: perspectivas e problemas. Inter-Facies, Escr. e Doc. v. 6, p. 1-18, 1980.

VOLLETH, M. Differences in location of nucleolus organizer regions in European Vespertilionid bats. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v. 44, p. 186-197, 1987.

VOLLETH, M.; HELLER, K. G. Phylogenetic relationships of vespertilionid genera (Mammalia: Chiroptera) as revealed by karyological analysis. **Zool. Syst. Evol.**, v. 32, p. 11-34, 1994.

WACHTLER, F.; STAHL, A. The nucleolus: a structural and functional interpretation. **Micron**, v. 24, p. 473-505, 1993.

WARD, S. W.; COFFEY, D. S. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells. **Biol Reprod.**, v. 44, p. 569-574, 1991.

WETTERER, A. L.; ROCKMAN, M. V.; SIMMONS, N. B. Phylogeny of Phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera). Data from diverse morphological systems, sex chromosome, and restriction sites. **Bull. Am. Mu. Hist. Nat.**, v. 248, p. 1-200, 2000.

VIII. RESUMO

Beguelini, M.R., Morielle-Versute, E., 2007. **Estudo da espermatogênese e nucleologênese de morcegos.** (141f). Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.

A ordem Chiroptera constitui a segunda maior ordem de mamíferos e está classicamente dividida em duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera. A primeira é encontrada exclusivamente no Velho Mundo e compreende uma única família (Pteropodidae) com 42 gêneros e 185 espécies, enquanto que a segunda está amplamente distribuída por todo o globo, envolvendo 17 famílias, 157 gêneros e 928 espécies. Apesar dos morcegos serem extraordinariamente bem sucedidos, eles permanecem como um dos grupos menos conhecidos em relação a aspectos como: processos evolutivos, mecanismos reprodutivos e características nucleolares. Embora o processo de espermatogênese tenha sido objeto de estudo em muitos mamíferos, pouca atenção tem sido dada a esse estudo em morcegos, apesar dessa ser uma grande e diversa classe de organismos, que apresenta diferentes estratégias reprodutivas para ajustar esses animais às várias condições ecológicas e comportamentais as quais estão submetidos. Da mesma forma, em geral todas as observações sobre regiões organizadoras nucleolares (RONs) e nucléolos em morcegos foram feitas a partir da análise de células somáticas. Assim, devido à escassez de informações referentes à espermatogênese e a nucleologênese em Chiroptera e ao interessante e vasto campo de conhecimento que esses aspectos representam, o intuito do presente estudo foi analisar as células dos túbulos seminíferos das espécies de morcegos,

Artibeus lituratus, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Platyrrhinus lineatus* (Phyllostomidae) e *Myotis nigricans* (Vespertilionidae), por diferentes técnicas histológicas, citoquímicas e moleculares. Três tipos de espermatogônias foram reconhecidos baseado no grau de condensação da cromatina e morfologia nuclear, espermatogônias A_d, A_p e B. Essas após entrar em meiose, passam por duas divisões celulares e formam espermátides haplóides, que sofrem diferenciação, compactando seu DNA, alongando seu núcleo e formando o flagelo e acrossomo, num processo que, em morcegos, pode ser dividido em sete fases. A exceção de *M. nigricans*, o ciclo do epitélio seminífero das cinco espécies de Phyllostomidae é similar ao de outros mamíferos, possuindo oito estágios que podem ser distintamente delimitados pelo método da morfologia tubular. *M. nigricans* apresenta uma assincronia no ciclo, observada na sobreposição de estágios e ciclos indefinidos. As frequências encontradas nas três fases do ciclo foram variáveis, com a fase pós-meiótica apresentando a maior frequência (mais de 50%) e a fase meiótica a menor (menos de 10%). A forma e expressão do nucléolo das células de Sertoli de 10 espécies também foram avaliadas. *C. perspicillata*, *C. planirostris*, *M. rufus*, *P. lineatus* e *P. dislocor* apresentaram um padrão semelhante tanto na expressão, evidenciado pelo alaranjado de acridina como uma única região central, como na morfologia, proporção e densidade, evidenciadas pela impregnação por nitrato de prata como um único nucléolo que ocupa aproximadamente 4,75% da área nuclear. *A. lituratus* e *A. planirostris* apresentaram características qualitativas semelhante a essas, somente possuindo uma proporção de área nucleolar/área nuclear um pouco maior, próximo aos 6%. Diferindo dos outros molossídeos analisados, *M. molossus* apresentou três diferentes padrões, tanto na expressão quanto na morfologia nucleolar além de possuir uma proporção de área nucleolar/área nuclear um pouco maior (5,72%). Os vespertilionídeos apresentaram

a maior proporção de área nucleolar (7,12% para *H. velatus* e 10,75% para *M. nigricans*), assim como padrões morfológicos bem distintos. Em *H. velatus* observamos nucléolos filamentosos e dispersos que apresentam expressão em apenas alguns pontos na sua periferia, já em *M. nigricans* encontramos a maior variação morfológica, onde foram observados quatro padrões diferenciados de forma e expressão nucleolar. As marcações encontradas no FISH corroboram estudos de citogenética convencional confirmando o número de locus de DNAr observados após coloração pela prata, ou seja apenas um sítio de DNAr em *C. perspicillata*, dois em *P. lineatus*, seis em *A. lituratus* e *A. planirostris* e dez em *M. nigricans*. A análise da nucleologênese em *A. lituratus*, *A. planirostris*, *C. perspicillata*, *P. lineatus* e *M. nigricans* evidenciou que o nucléolo começa sua desorganização quando as espermatogônias entram em meiose. Com a desorganização, o material nucleolar pode comportar-se de duas ou três maneiras. Parte dele dissolve-se na prófase, no nucleoplasma comum e retorna ao nucléolo após sua reorganização na telófase, outra parte permanece associada as RONS durante toda a divisão meiótica e uma terceira parte junta-se as regiões pericromossomais e move-se de volta para o núcleo com a descondensação dos cromossomos na telófase. Também observamos a presença de RNAs junto ao material nucleolar em desorganização, só não sendo encontrado RNA em associação as RONS. De maneira geral, as características morfológicas das células germinativas dos filostomídeos são conservadas entre as suas diferentes espécies e diferem acentuadamente das de *M. nigricans*, não só em relação à morfologia, mas, principalmente, quanto à cinética e ao comportamento. A variação parece estar mais intimamente ligada ao número de RONS que as espécies apresentam do que ao grau de proximidade filogenética. Os resultados inéditos sobre alguns aspectos da espermatogênese e da nucleologênese de morcegos constituem dados que podem ser utilizados em análises filogenéticas

multifatoriais, para uma melhor elucidação das relações filogenéticas entre as espécies de morcegos.

Palavras Chaves: Ciclo do Epitélio Seminífero, Espermatogênese, Espermiogênese, Chiroptera, Nucleologênese, FISH.

IX. ABSTRACT

Beguelini, M.R., Morielle-Versute, E., 2007. **Analysis of the spermatogenesis and the nucleogenesis of bats.** (141p). Dissertation – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São Paulo State University, São José do Rio Preto.

The order Chiroptera is the second largest order of mammals and is classically divided into two suborders: Megachiroptera and Microchiroptera. The first is found exclusively in the Old World, and contains a single family (Pteropodidae) with 42 genera and 185 species, while the second is widely distributed around the world, concerning 17 families, 157 genera and 928 species. Despite of the bats are extraordinarily successful, they remain as one of the least recognized groups on aspects such as: evolutionary processes, reproductive patterns and nucleolar characteristics. Although the process of spermatogenesis has been the subject of study in many mammals, little attention has been given to this study in bats, a large and diverse class of organisms, which presents different reproductive strategies to adjust these animals to different ecological and behavioral conditions that they are submitted. In the same way, in general all studies concerning nucleolar organizer regions (NORs) and nucleoli in bats were made from the analysis of somatic cells. Thus, due to the scarcity of information regarding spermatogenesis and nucleogenesis in Chiroptera and the interesting and vast field of knowledge that these things represent, the purpose of this study was to analyze the cells of the seminiferous tubules of the species of bats, *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Platyrrhinus lineatus* (Phyllostomidae) and *Myotis nigricans* (Vespertilionidae), by different histological, molecular and citochemical techniques. Three types of spermatogonia were recognized

based on the chromatin condensation and nuclear morphology, type A_d, type A_p and B. These, undergo meiosis, passing through the two cellular divisions and forming haploid spermatids, which undergo differentiation, condensing its DNA, elongating its nuclei and forming the flagellum and acrossomo, in a process that in bats, can be divided into seven steps. The exception of *M. nigricans*, the cycle of the seminiferous epithelium of the five species of Phyllostomidae is similar to that of other mammals, with eight stages that can be distinctly defined by the tubular morphology method. *M. nigricans* presents an asynchrony in the cycle, observed in the overlapping of stages and undefined cycles. The frequencies found in the three phases of the cycle were variable, with the post-meiotic phase showing the higher frequency (over 50%) and the meiotic phase the minor (less than 10%). The morphology and expression of the nucleolus of Sertoli cells of 10 species were also evaluated. *C. perspicillata*, *C. planirostris*, *M. rufus*, *P. dislocor* and *P. lineatus* showed a similar pattern in both the expression, evidenced by the coloration with acridine orange as a single central region, such as morphology, proportion and density, evidenced by silver impregnation as a single nucleolus which occupies approximately 4.75% of the nuclear area. *A. lituratus* and *A. planirostris* showed similar qualitative characteristics, only having a slightly larger proportion of nucleolar area / nuclear area, close to 6%. Unlike the other species of Molossidae analyzed, *M. molossus* showed three different patterns, both in expression and in the nucleolar morphology, it also had a slightly larger proportion of nucleolar area / nuclear area (5.72%). The vespertilionids had the highest proportion of nucleolar area (7.12% to *H. velatus* and 10.75% for *M. nigricans*), as well distinct morphological patterns. *H. velatus* presents filamentary and scattered nucleoli that present expression in only a few points in its periphery, already in *M. nigricans* we found the greatest morphological variation, which were found four distinct patterns of form and

expression. The markings found on FISH corroborate conventional cytogenetic studies confirming the number of rDNA loci observed after silver staining, a single locus of rDNA in *C. perspicillata*, two in *P. lineatus*, six in *A. lituratus* and *A. planirostris* and ten in *M. nigricans*. The analysis of nucleologenesis in *A. lituratus*, *A. planirostris*, *C. perspicillata*, *P. lineatus* and *M. nigricans* showed that the nucleolus begins its disorganization when the spermatogonia come into meiosis. With the disorganization, the nucleolar components can behave of two or three forms. Part dissolves in the prophase in nucleoplasm and returns to the nucleolus after its reorganization in telophase, another part remains associated with the NORs throughout the meiotic division and a third party associates to perichromosomal regions and move back to the nuclei with the descondensation of the chromosomes in telophase. We also observe the presence of nucleolar RNAs at the components in disorganization, but none RNA was found in association with the NORs. The morphological characteristics of germ cells of phyllostomids are conserved between the different species and differ markedly from those of *M. nigricans*, not only in relation to the morphology, but, mainly, on the kinetics and behavior. The change appears to be more closely linked to the number of NORs that the species present than the degree of phylogenetic distance. The new results on some aspects of spermatogenesis and on the nucleologenesis of bats, are data that can be used in multifactorial phylogenetic analyses, for a better elucidation of the phylogenetic relationships among different species of bats.

Keywords: Seminiferous epithelium cycle, Spermatogenesis, Spermiogenesis, Chiroptera, Nucleologenesis, FISH.