

Caracterização do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae, Chiroptera): morfologia e variação hormonal

Larissa Mayumi Bueno

DOUTORADO

**PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL**



**Biologia
Estrutural**

Larissa Mayumi Bueno

**Caracterização do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de *Eptesicus furinalis*
(Vespertilionidae, Chiroptera): morfologia e variação hormonal**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biologia Animal, junto ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Mateus Rodrigues Beguelini

São José do Rio Preto

2018

Bueno, Larissa Mayumi.

Caracterização do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae, Chiroptera) : morfologia e variação hormonal / Larissa Mayumi Bueno. -- São José do Rio Preto, 2018
136 f. : il., tabs.

Orientador: Eliana Morielle Versute

Coorientador: Mateus Rodrigues Beguelini

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia. 2. Morcego - Morfologia. 3. Morcego - Reprodução.
4. *Eptesicus*. 5. Útero. 6. Ovários. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.
II. Título.

CDU – 599.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Larissa Mayumi Bueno

**Caracterização do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de *Eptesicus furinalis*
(Vespertilionidae, Chiroptera): morfologia e variação hormonal**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biologia Animal, junto ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Eliana Morielle Versute – UNESP – São José do Rio Preto (Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Ana Paula da Silva Perez – UFG – Jataí

Prof^a. Dr^a. Danielle Barbosa Moraes – UFRN – Natal

Prof. Dr. Manoel Francisco Biancardi – UFG – Goiânia

Prof^a. Dr^a. Selma Maria de Almeida Santos – Instituto Butantan – São Paulo

São José do Rio Preto
23 de Fevereiro de 2018

'A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos'.

- Marcel Proust

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Eliana Morielle Versute, por ter sido meu exemplo científico durante todos esses anos e que será por todos os próximos anos, e por toda a paciência, compreensão, ensinamentos e amizade.

Agradeço ao meu co-orientador, Mateus Rodrigues Beguelini, que mesmo longe conseguiu me dar o apoio e conhecimentos necessários para a realização desse trabalho.

Agradeço aos membros da banca examinadora pela contribuição a esse trabalho.

Agradeço a minha parceira de laboratório, Manuela Tosi Comelis, por todas as aventuras nas coletas, por todo o apoio e paciência dentro do laboratório e por toda a amizade fora dele.

Agradeço ao Professor Sebastião Roberto Taboga pela parceria, pelo laboratório e também por todos os ensinamentos e seu extenso conhecimento em morfologia.

Agradeço aos técnicos Luiz Roberto Falleiros Júnior e Jorge Freytag Buchdid, por toda a extensa ajuda e paciência no laboratório, e por todos os motivos que vocês me deram para rir e fazer meus dias melhores.

Agradeço aos professores do Departamento de Zoologia e Botânica e do Departamento de Biologia, em especial, à Professora Eliane Gonçalves de Freitas, por todos os conhecimentos.

Agradeço a todos os alunos do Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálises, em especial a Mariana Marcielo e Luiz Henrique Guerra, por toda a ajuda, amizade e risadas.

Agradeço aos amigos de São José do Rio Preto, em especial, Ana Luiza, Carol Bertoque, Andréia, Carol N., Carol Z., Juliane, Fernanda, Dianelli, Bruna e Plínio por todos os outros que passaram pela minha vida durante esses anos e que, de alguma forma, me deram forças nos momentos em que eu precisei. E também as amigas de longa data de Ribeirão Preto, Rosi e Mari, que mesmo longe, sempre me deram forças.

Agradeço à CAPES pela bolsa de doutorado e pela bolsa de doutorado sanduíche (PDSE).

A special thanks to my Canadian supervisors Dr. Paul Faure and Dr. Denys DeCatanzaro from McMaster University, for having me in your labs and everything that you both have done for me in this lovely country and university. Also, a special thanks to my lab partners, Lucas, Rob, Tyler and Evan, and all ungrads from both labs.

And a special thanks to the friends that I've made in Canada, Jéssica, Gabriela, Felipe Damas, Felipe Gomes, Richelmy, Tati, Giácomo, Dandara, Tania, Ale, Brian, Hiraku, Cristina, Monica, Marion, Bertha, Eric, Jay and Austin. Canada wouldn't be the same without you guys!

E como a sobremesa (que é a melhor parte!) vem por último, eu agradeço aqui meus três pilares: meu pai Cesar, minha mãezinha Sonía, e minha irmã Andressa, por terem sido a luz em muitos momentos de escuridão, e que se eu juntar a inicial de vocês, C.A.S., vai significar a forma que eu carrego vocês: "Com Amor Sempre".

Sumário

RESUMO.....	06
ABSTRACT	08
I. INTRODUÇÃO GERAL	10
A. Ordem Chiroptera	10
B. Família Vespertilionidae.....	12
C. Reprodução em Mamíferos	14
D. Reprodução em Chiroptera.....	18
II. OBJETIVOS.....	22
III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
IV. RESULTADOS.....	32
Capítulo 1 - “Variação morfológica dos testículos e seus receptores hormonais durante o processo de regressão testicular em <i>Eptesicus furinalis</i> (Vespertilionidae: Chiroptera)”.....	33
Capítulo 2 - “Morfologia do epidídimo de <i>Eptesicus furinalis</i> (Chiroptera: Vespertilionidae) durante o processo de regressão testicular”	58
Capítulo 3 - “Morfologia do útero de <i>Eptesicus furinalis</i> (Vespertilionidae: Chiroptera) em diferentes fases do ciclo reprodutivo”	77
Capítulo 4 - “Variações morfológicas nos ovários de <i>Eptesicus furinalis</i> (Vespertilionidae: Chiroptera) durante o ciclo reprodutivo anual”	95
Capítulo 5 - “Ovarian morphology and folliculogenesis process in the flat-faced fruit-eating bat <i>Artibeus planirostris</i> and the Argentine brown bat <i>Eptesicus furinalis</i> : a comparative analysis”	122
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS	135

RESUMO

Os morcegos apresentam ampla diversidade nos aspectos reprodutivos, entretanto, são poucos os estudos detalhados sobre a morfologia reprodutiva de Chiroptera, principalmente nas espécies de clima tropical. O estudo dos aspectos reprodutivos de uma espécie é de grande importância para, por exemplo, o entendimento de estratégias para sua conservação. Portanto, o presente estudo teve como objetivos analisar a morfologia dos órgãos reprodutivos de machos e fêmeas de *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae), uma espécie de grande distribuição pela América do Sul, além de comparar a foliculogênese e a morfologia geral dos ovários dessa espécie com a espécie simpátrica *Artibeus planirostris* (Phyllostomidae). Nos machos de *E. furinalis*, durante o processo de regressão testicular, no qual o testículo apresenta quatro fases reprodutivas distintas morfologicamente (fase ativa, em regressão, regredida e recrudescência), as células testiculares apresentaram variação na imunomarcagem de receptores hormonais androgênicos (AR) e luteinizantes (LHR). Essa variação na imunomarcagem desses receptores indica a participação hormonal no controle do processo da regressão testicular, por meio da ativação do AR nas células de Sertoli, e LHR nas células de Leydig. Na fase de regressão testicular, a imunomarcagem de LHR e AR tende a diminuir, causando a desativação da espermatogênese, e na fase de recrudescência testicular ocorre um aumento na imunomarcagem de LHR e AR, os quais reativam a espermatogênese. A morfologia do epidídimo, que é dividido em cabeça, corpo e cauda, e tem o epitélio composto por células principais, apicais, basais, estreitas, claras e halo, também sofre influência do processo de regressão testicular, evidenciadas principalmente pela altura do epitélio e porcentagem relativa do lúmen e do estroma. Com relação às fêmeas, a morfologia geral dos ovários diferiu entre as espécies: enquanto *E. furinalis* apresentou uma abundância de glândulas intersticiais e folículos primordiais distribuídos por todo o ovário, os ovários de *A. planirostris* apresentaram poucas glândulas intersticiais e os folículos primordiais estão localizados em uma área específica, constituindo um ovário polarizado. No processo da foliculogênese de *A. planirostris* e *E. furinalis* foram reconhecidos cinco tipos de folículos ovarianos: primordiais, primários, secundários, terciários e antrais. Em *E. furinalis* a ovulação ocorre em ambos os ovários, podendo ser liberados mais de um oócito por ovário (poliovular), enquanto em *A. planirostris* as fêmeas liberam um único oócito predominantemente pelo ovário esquerdo (monovular). No período de Janeiro a

Julho, as fêmeas de *E. furinalis* estavam em condição não reprodutiva, ou seja, não estavam em período de gravidez ou lactação, sendo que de Maio a Julho foram observados espermatozoides no útero, indicando portanto, ocorrência de cópula. No período de Agosto a Dezembro, as fêmeas apresentaram condições de gravidez e/ou lactação, podendo exibir até quatro embriões no útero bicórneo no estágio inicial da gravidez (Agosto e Setembro), que se reduziu para dois embriões em estágio mais avançado (Outubro). As variações na concentração sérica de estradiol, a presença de folículos antrais nos períodos de gravidez e lactação, e a presença de fêmeas lactantes e grávidas concomitantemente sugerem a ocorrência de estro pós-parto na espécie. Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho demonstram a variação morfológica dos órgãos reprodutivos entre espécies de morcegos simpátricas, em especial, as espécies *A. planirostris* e *E. furinalis*, bem como a complexidade da morfologia e do controle hormonal da reprodução em *E. furinalis*.

Palavras-chave: morfologia reprodutiva, ovários, úteros, regressão testicular, epidídimos, AR, LH e estradiol.

ABSTRACT

Bats show the greatest reproductive diversity within all mammals, however, there are few studies about the detailed reproductive morphology in Chiroptera, principally about tropical species. The study of the reproductive aspects of a species is of great importance to understand, for example, the strategies for its conservation. Therefore, our aims were to analyze the morphology of male and female reproductive organs of *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae), a species of great distribution in South America, and to compare the folliculogenesis and general morphology of the ovaries of this species with the sympatric species *Artibeus planirostris* (Phyllostomidae). In males of *E. furinalis*, during the process of testicular regression, in which testes show four reproductive phases morphologically distinct (active phase, regression, regressed and recrudescence), the testicular cells showed variation in the immunostaining of androgen and luteinizing hormone receptors. These immunostaining indicate the involvement of these hormones in the control of the process of testicular regression, and this control occurs through the activation of androgen receptors in Sertoli cells and luteinizing hormone receptors in Leydig cells. In the testicular regression phase, the immunostaining of LHR and AR tends to decrease, which causes the deactivation of spermatogenesis, and in the testicular recrudescence phase occurs an increase in the immunostaining of LHR and AR, which reactivates spermatogenesis. The morphology of the epididymis, which is divided into caput, corpus and cauda, and has the epithelium composed of main, apical, basal, narrow, clear and halo cells, is also influenced by the process of testicular regression, evidenced mainly by the height of the epithelium and percentage of lumen and stroma. In regard of the females, the general morphology of the ovaries differed between species, in which *E. furinalis* presented an abundance of interstitial glands cells and the primordial follicles are distributed throughout the ovary, and the ovaries of *A. planirostris* showed few interstitial glands cells and the primordial follicles are located in a specific area of the ovary, composing a polarized ovary. In the folliculogenesis process of *A. planirostris* and *E. furinalis*, five types of follicles were recognized: primordial, primary, secondary, tertiary and antral follicles. In *E. furinalis*, ovulation occurs in both ovaries, and more than one oocyte can be released per ovary (poliovular), whereas in *A. planirostris*, females release a single oocyte predominantly from the left ovary (monovular). In the period from January to July, the females of *E. furinalis* were in a non-reproductive condition, i.e., they were not in the period of

pregnancy or lactation, and from May to July we observed spermatozoa in the uterus, indicating the occurrence of copulation in these months. In the period from August to December, females were in pregnancy and / or lactation conditions, and presented four embryos in the bicornous uterus at the initial stage of pregnancy (August and September), which was reduced to two embryos in late pregnancy (October). Variations in the concentration of serum estradiol, the presence of antral follicles during pregnancy and lactation, and the presence of lactating and pregnant females at the same time suggest the occurrence of postpartum estrus in the species. Therefore, our results demonstrate the variation of the morphology of the reproductive organs among sympatric species of bats, in particular, the species *A. planirostris* and *E. furinalis*, and the complexity of the morphology and the hormonal control of the reproduction in *E. furinalis*.

Key words: reproductive morphology, ovaries, uterus, testicular regression, epididymis, AR, LH and estradiol.

I. INTRODUÇÃO GERAL

A. Ordem Chiroptera

Os morcegos compõem 1/5 da fauna vivente de mamíferos e constituem a segunda maior ordem de mamíferos, relativo ao número de espécies (Fenton e Simmons, 2014). Além disso, os morcegos apresentam a maior distribuição dentro de Mammalia (**Figura 1**), sendo encontrados em todo o globo terrestre, exceto algumas ilhas oceânicas remotas e da Antártica (Nowak, 1999). A grande capacidade de distribuição da ordem se deve, principalmente, ao fato de os morcegos serem os únicos mamíferos capazes de realizar o voo verdadeiro (Voight e Kingston, 2016), uma vez que possuem as mãos adaptadas em asa, condição essa que derivou o nome da ordem Chiroptera (do grego, *Cheiro* = mão, *Ptero* = asa). As asas dos morcegos possuem uma morfologia diferente de outros vertebrados voadores, uma vez que apresentam os cinco dígitos da mão altamente prolongados e desenvolvidos, diferentemente da regressão óssea observada em aves, as quais possuem apenas três dígitos, e nos pterossauros, os quais possuíam quatro dígitos (Pough, 2008).

Além do voo, a ecolocalização é uma característica dos morcegos que também possibilitou a grande dispersão mundial desses animais. A ecolocalização é a capacidade de produzir sons de altas frequências que são modulados pela cavidade bucal e nasal do animal, sendo que algumas espécies conseguem amplificar os sons produzidos através de apêndices nasais. Os sons emitidos pelos animais batem nas presas ou obstáculos e são recebidos de volta pelo animal através de uma rica inervação ligada ao trago, anti-trago ou diretamente ao tímpano e, em algumas espécies, também pelos ornamentos faciais que auxiliam no processo da ecolocalização (Speakman, 2001; Fenton e Simmons, 2014).



Figura 1. Mapa da distribuição mundial dos morcegos. As áreas em preto mostram as regiões habitadas por morcegos. (Fonte: <http://www.saudeanimal.com.br/distr.htm>).

Como consequência dessa grande distribuição em diferentes habitats, os morcegos apresentam a maior variedade de hábitos alimentares entre todos os mamíferos, com espécies carnívoras, insetívoras, frugívoras, nectarívoras e até mesmo, espécies hematófagas (Fenton, 1992). Devido a essa ampla variedade de alimentos consumidos pelos morcegos, os mesmos desempenham importantes papéis ecológicos, como o controle populacional de insetos e pequenos vertebrados em áreas naturais e a polinização e a dispersão de sementes, tendo um papel fundamental na regeneração de habitats fragmentados (Boyles et al., 2011). Além disso, os morcegos apresentam grande importância na saúde pública mundial, uma vez que são potenciais reservatórios de alguns vírus nocivos aos humanos, como o vírus do ebola e alguns coronavírus, que são vírus responsáveis por algumas doenças respiratórias altamente infecciosas, além de serem transmissores do vírus da raiva (Hayman, 2016).

Outra consequência da grande distribuição mundial dos morcegos é a ampla diversidade de formas reconhecidas nas suas 1.300 espécies agrupadas em 20 famílias, apresentando espécies como *Pteropus giganteus*, que podem chegar a 1,70 m de envergadura e 1,5 kg de peso corporal, e *Craseonycteris thonglongyai*, com 03 cm de envergadura e 02 g de peso corporal (Fenton e Simmons, 2014; Voight e Kingston, 2016). Essa diversidade de formas resulta na dificuldade de classificação dessas espécies, começando pela origem incerta dos morcegos, uma vez que o registro fóssil mais antigo (*Icaronycteris index*) apresenta um morcego com a morfologia completa das formas hoje viventes (Jepsen, 1966).

Os morcegos foram tradicionalmente divididos nas subordens Megachiroptera e Microchiroptera (Koopman, 1994; Simmons e Geisler, 1998). Megachiroptera era considerada a subordem basal e constituída de uma única família, Pteropodidae, a qual abrange as grandes formas de morcegos, como a *P. giganteus*, restritas à Índia, África, Ásia e Austrália (Bergmans, 1997). Microchiroptera era constituída pelas 19 famílias restantes, com indivíduos de menor porte e com distribuição mundial (Simmons e Geisler, 1998).

Entretanto, novas investigações realizadas com a associação de informações morfológicas, moleculares, fósseis, citogenéticas, entre outras, propuseram novas classificações para a ordem Chiroptera. A melhor aceita e mais generalizada subdividiu a ordem Chiroptera em dois clados, o Yinpterochiroptera e o Yangochiroptera. O primeiro é composto pelas famílias Pteropodidae, Rhinolophidae, Megadermatidae, Rhinopomatidae, Hipposideridae e Craseonycteridae, enquanto o segundo é composto

pelo restante das famílias: Nycteridae, Emballonuridae, Phyllostomidae, Mormoopidae, Noctilionidae, Furipteridae, Thyropteridae, Myzopodidae, Mystacinidae, Natalidae, Molossidae, Miniopteridae, Cistugidae e Vespertilionidae (Teeling et al., 2005; Fenton e Simmons, 2015). No Brasil, os morcegos estão representados apenas pela subordem Yangochiroptera, com um total de 178 espécies em 68 gêneros e nove famílias, sendo que as três famílias com o maior número de espécies em ordem decrescente são Phyllostomidae, Molossidae e Vespertilionidae, compostas por 92, 29 e 28 espécies, respectivamente. As outras seis famílias restantes são Emballonuridae (17 espécies), Furipteridae (01 espécie), Mormoopidae (03 espécies), Natalidae (01 espécie), Noctilionidae (02 espécies) e Thyropteridae (05 espécies) (Nogueira et al., 2014).

B. Família Vespertilionidae

Vespertilionidae é a família com a maior diversidade de espécies e de distribuição geográfica no mundo, sendo 48 gêneros com 407 espécies no total, correspondendo a quase um terço de todas as espécies de morcegos viventes (Simmons, 2005; Reis et al., 2007).

Os morcegos dessa família apresentam como característica mais diagnóstica o uropatágio em forma de V e a cauda completamente contida no mesmo, raramente ultrapassando sua borda distal em uma vértebra (**Figura 2**), possuem olhos pequenos, além de não apresentarem qualquer ornamento facial (Goodwin e Greenhall, 1961; Eisenberg e Redford, 1999). Os vespertilionídeos são predominantemente insetívoros, portanto, apresentam um importante papel biológico, atuando no controle populacional de insetos (Nowak, 1999).

No Brasil, Vespertilionidae é composta por 24 espécies distribuídas em cinco gêneros: *Eptesicus*, *Myotis*, *Histiotus*, *Lasiurus* e *Rhogeessa*, sendo os dois primeiros, os gêneros com o maior número de espécies (Reis et al., 2011; Nogueira et al., 2014). *Eptesicus* possui 23 espécies no total (Simmons, 2005) e, no Brasil, são registradas seis: *E. andinus* J. A. Allen, 1914; *E. brasiliensis* (Desmarest, 1819); *E. chiriquinus* Thomas, 1920; *E. diminutus* Osgood, 1915; *E. furinalis* (D'Orbigny, 1847) e a mais recentemente descrita, *E. taddeii* (Miranda, Bernardi e Passos, 2006).



Figura 2. Exemplar de *Histiotus velatus* pertencente à família Vespertilionidae. Notar o uropatágio em V (seta), a ausência de ornamentos faciais e olhos pequenos (Fonte: <http://morcegosdobrasil.blogspot.com.br/search/label/Histiotus%20velatus>).

Eptesicus furinalis é a espécie que possui a maior representação, ocorrendo desde o México ao norte da Argentina, Paraguai, Bolívia, Brasil, Guianas e leste do Peru (Mies, Kurta e King, 1996; Simmons, 2005). A dieta é exclusivamente insetívora, capturando as presas durante o voo (LaVal e Fitch, 1977). São animais de tamanho pequeno a médio (Reis et al., 2007), apresentando a região do rostro inflada (**Figura 3**), com antebraço podendo variar de 36,5 a 42,5 mm, as orelhas e as membranas são desprovidas de pelos e são de coloração marrom-escuro a preta, com a região ventral mais clara que a dorsal (Mies, Kurta e King, 1996, Bianconi e Pedro, 2007).



Figura 3. Exemplar de *Eptesicus furinalis*. Nota-se a região do rosto inflada (seta), as orelhas desprovidas de pelos e a região dorsal do corpo mais escura que a região ventral (Fonte: <http://morcegosdobrasil.blogspot.com.br/2012/10/eptesicus-furinalis.html>).

C. Reprodução em Mamíferos

O aparelho reprodutivo masculino da maioria dos mamíferos eutérios consiste de dois testículos, dois epidídimos, o pênis, as glândulas sexuais acessórias, como a próstata e a glândula bulbouretral, e os ductos (Pough, 2008).

Nos testículos ocorre a etapa mais inicial do processo da reprodução nos machos, a espermatogênese, processo de divisão e diferenciação celular que ocorre nos túbulos seminíferos testiculares, no qual as espermatogônias se transformam em espermatozoides, sendo que milhões de espermatozoides são produzidos diariamente nos mamíferos machos (Matsumoto, 1996).

O processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: a fase mitótica, a fase meiótica e a espermiogênese. A fase mitótica é também conhecida como fase proliferativa ou fase espermatogonial, e é representada pelas divisões mitóticas das células-tronco que vão dar origem a novas células que podem ter dois destinos diferentes: a renovação da população de espermatogônias ou continuar o processo da espermatogênese em si, sofrendo ainda algumas divisões mitóticas formando outros tipos de espermatogônias, as quais serão deslocadas para o compartimento adluminal dos túbulos seminíferos, onde entrarão em divisão meiótica, dando origem aos espermátócitos. A partir desse momento, todos os tipos celulares subsequentes da

linhagem espermatogênica estarão no compartimento adluminal, formado pelas junções celulares das células de Sertoli, as quais fornecerão nutrientes e hormônios necessários ao processo espermatogênico (Costa e Paula, 2003).

A fase meiótica compreende as duas divisões meióticas sofridas pelos espermatócitos originando as espermátides haploides (Russel et al., 1990), sendo que nessa fase são observados os eventos preparatórios para a divisão celular, como a inibição da transcrição, a duplicação da fita de DNA, a formação dos complexos sinaptonêmicos e a gradual condensação da cromatina ao seu redor, além da desorganização e reorganização do nucléolo (Parvinen et al., 1991). A espermiogênese é a fase final da espermatogênese, na qual ocorrem mudanças morfológicas progressivas, em que as espermátides alongadas se diferenciam em espermatozoides alongados e aptos para a locomoção e a fertilização (Clermont, 1972).

O processo da espermatogênese nos mamíferos em geral está sob o controle de um conjunto de peptídeos e hormônios esteroides, que atuam regulando o desenvolvimento das células germinativas. Além disso, os hormônios e os peptídeos regulam a proliferação e o funcionamento das células somáticas testiculares, as quais são essenciais para o funcionamento normal dos testículos (McLachlan et al., 2002), sendo elas as células mióides, as quais circundam os túbulos seminíferos e têm função contrátil; as células de Leydig, que são as células produtoras de hormônios andrógenos, localizadas no compartimento intersticial e as células de Sertoli, as quais estão localizadas dentro dos túbulos seminíferos, dando suporte estrutural e nutricional para as células germinativas, além de formarem a barreira hematotesticular, bem como outras funções (Mendis-Handagama, 1997; Maekawa et al., 1996; Russel e Griswold, 1993).

O controle hormonal da espermatogênese se dá pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. O hipotálamo produz o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que vai atuar na hipófise, e esta, por sua vez, vai liberar os hormônios luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH) (Hall, 2011). O LH atua nas células de Leydig, regulando a síntese de hormônios andrógenos e estrógenos pelas mesmas (Holdcraft e Braun, 2004), e o FSH atua nas células de Sertoli, estimulando as mesmas a produzirem os fatores essenciais para a manutenção das células germinativas, além da inibina, que vai atuar como um sistema *feedback* na hipófise (Hall, 2011).

Os andrógenos testiculares atuam na iniciação, manutenção e restauração da espermatogênese (O'Donnell et al., 2006), sendo que suas ações nos testículos são mediadas via receptores de andrógenos (AR), que estão localizados principalmente nas

células de Leydig e células de Sertoli (Holdcraft e Braun, 2004). Os estrógenos também possuem papel na regulação da fisiologia testicular (O'Donnell et al., 2001; Hess, 2003), sendo produzidos em vários tipos de células testiculares (células de Leydig e Sertoli e, no adulto, principalmente nas células germinativas), o que sugere uma ação parácrina sobre a espermatogênese (Tsai-Morris et al., 1985; Dorrington e Khan, 1993; Nitta et al., 1993). Além disso, estrógenos circulantes também podem ter algum papel sobre a espermatogênese, atuando em *feedback* endócrino junto ao hipotálamo e a pituitária (Hayes et al., 2000; Bagatell et al., 1994). Estudos constataram que camundongos *knockout* para ER α , ER β e aromatase são inférteis, fato que indica que a ação dos estrógenos é de grande importância para a espermatogênese (Lubahn et al., 1993; Eddy et al., 1996; Dupont et al., 2000).

Porém, os fatores e os hormônios produzidos no testículo não possuem apenas uma ação local, podendo também atuar no epidídimo. Os hormônios e os fatores produzidos nos testículos podem chegar aos epidídimos através dos ductos eferentes, ou através da circulação sanguínea (Robaire e Hamzeh, 2011). A testosterona, por exemplo, é o principal hormônio que atua na manutenção do epitélio do epidídimo (Rodriguez et al., 2002).

Apesar do processo espermatogênico e seu controle hormonal serem conservados entre os mamíferos (Clermont, 1972), diferentes táxons podem exibir diferenças morfológicas no aparelho reprodutivo em si, sendo que essas diferenças podem estar relacionadas, por exemplo, com o hábitat em que a espécie vive (Bronson, 1985).

O aparelho reprodutivo feminino da maioria dos mamíferos eutérios consiste de dois ovários, dois ovidutos, um útero e a vagina (Pough, 2008).

Nos ovários ocorre o processo da foliculogênese, que se caracteriza pelo crescimento e desenvolvimento dos folículos primordiais até folículos maduros, em que o ovócito pode então ser liberado do ovário para ser fecundado. As mudanças que ocorrem nos folículos durante o processo da foliculogênese podem ser classificadas em diferentes estágios foliculares de maturação, sendo que foram propostos vários modelos de classificação desses estágios. A variação no número de estágios foliculares totais reconhecidos durante a foliculogênese varia entre diferentes espécies (Pedersen e Peters, 1968; Myers et al., 2004; Gougeon, 2004; Griffin et al., 2006).

Alguns modelos classificam os folículos de acordo com o diâmetro do oócito, a morfologia e o número de células foliculares (Pedersen, 1969), enquanto que outros

modelos baseiam-se no número de camadas e a morfologia das células da granulosa, bem como a presença e o tamanho do antro (Myers et al., 2004; Gougeon, 2004; Griffin et al., 2006). Contudo, em um mamífero-modelo geralmente são reconhecidas quatro categorias para os folículos: primordial (o oócito é circundado por uma única camada de células foliculares pavimentosas), primário (o oócito é circundado por uma única camada de células da granulosa cúbicas), secundário (o oócito é circundado por mais de uma camada de células da granulosa) e antral (quando as camadas da granulosa que envolvem o oócito apresentam antro), sendo o último subdividido em vários estágios de acordo com o tamanho do antro (Griffin et al., 2006; Erickson, 2002).

A foliculogênese está sob o controle hormonal exercido pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. O hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que atua na hipófise anterior, a qual secreta os hormônios FSH e LH que irão agir sobre os ovários, estimulando o processo da oogênese. Durante a puberdade, o FSH e LH atuam nos oócitos, estimulando o crescimento e modificações dos folículos ovarianos (Moore e Persaud, 1994). O FSH atua principalmente nas células da granulosa dos folículos ovarianos, estimulando a proliferação celular, a síntese de esteroides e a expressão de receptores de LH (Martins et al., 2008). Além disso, atua no crescimento dos folículos pré-antrais, uma vez que já foram observados receptores de FSH nas células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais, bem como em oócitos de folículos primordiais (Wandji et al., 1992; Roy, 1993).

O hormônio LH também atua sobre o desenvolvimento folicular, atuando também nos folículos com desenvolvimento mais avançado, durante a fase pré-ovulatória (Wu et al., 2000) e estimulando a ovulação (Junqueira e Carneiro, 2004). Os primeiros receptores de LH funcionais foram observados em ovários de camundongos cinco dias após o nascimento (O'Shaughnessy et al., 1997) e estudos in-vitro demonstraram que o LH é necessário para o desenvolvimento de pequenos folículos pré-antrais (Wu et al., 2000). Receptores de LH também já foram observados na teca interna de folículos pré-antrais mais avançados, sendo estes relacionados à viabilidade folicular (Braw-Tal e Roth, 2005).

O estrógeno e a progesterona também possuem importante papel na reprodução feminina. Os estrógenos possuem influência direta na proliferação, diferenciação e desenvolvimento folicular, além de atuar no ciclo menstrual (Findlay e Drummond, 1999; Junqueira e Carneiro, 2004). A progesterona atua no desenvolvimento do útero e

das glândulas mamárias, além de influenciar no crescimento folicular, ovulação e luteinização (Schreiber et al., 1980; Peluso, 2006).

O objetivo final da foliculogênese é a liberação do oócito maduro, que deve ser transportado pelo oviduto, o qual é o local onde ocorre a fertilização pelo espermatozoide, na maioria dos mamíferos, até o útero (Neil, 2006).

O útero nos mamíferos pode ter diferentes morfologias, podendo ser do tipo duplo, bicórneo, bipartido e simples, as quais são classificadas com base no grau de fusão dos cornos uterinos. O útero duplo apresenta cornos completamente separados; no útero bipartido ocorre uma fusão discreta na porção caudal dos cornos uterinos, diferindo do útero bicórneo, o qual apresenta uma grande porção dos cornos uterinos fusionados; e o útero simples apresenta uma cavidade uterina única, o corpo uterino, consequente da completa fusão dos cornos uterinos (Mossman, 1977). Além disso, o útero dos mamíferos euterianos é composto por paredes espessas, as quais são divididas em três camadas distintas: o perimétrio, a túnica serosa externa; o miométrio, a túnica intermediária composta por fibras musculares, e o endométrio, a túnica interna, composta por glândulas (Kardong, 2010).

Assim como ocorre nos machos, a foliculogênese e seu controle hormonal também são processos conservados entre as fêmeas de mamíferos (Costa e Paula, 2013), entretanto, diferentes espécies apresentam diferenças morfológicas nos órgãos reprodutivos (Bukovsky et al., 2005; Reynaud et al., 2009; Adams et al., 2012). As diferenças morfológicas entre as espécies implicam em diferentes estratégias reprodutivas, e a investigação e o conhecimento das diferentes estratégias reprodutivas de cada espécie é fundamental para o entendimento da reprodução e, consequentemente, conservação de cada espécie.

D. Reprodução em Chiroptera

A grande distribuição mundial dos morcegos também possibilitou a diversidade reprodutiva na ordem, sendo que os morcegos apresentam a maior diversidade de estratégias reprodutivas entre todas as ordens de Mammalia (Crichton e Krutzsch, 2000). Essas estratégias reprodutivas, bem como a morfologia e a fisiologia da reprodução em morcegos são complexas e diversas, e apresentam variações em relação à latitude em que o morcego habita, bem como variações taxonômicas, variando dentro da família, gênero ou até mesmo, espécie a qual o morcego pertence (Crichton e Krutzsch, 2000).

De maneira geral, os morcegos de regiões temperadas possuem reprodução sazonal, sendo monoestros, devido a um período de hibernação relacionado às baixas temperaturas durante o rígido inverno (Krutzsch, 1979). São várias as adaptações reprodutivas associadas ao período de hibernação, tais como, regressão testicular; armazenamento prolongado de espermatozoides na cauda do epidídimo, assincronia entre a espermatogênese e a cópula nos machos e armazenamento prolongado de espermatozoides no corno uterino, atraso na ovulação, fertilização e implantação no trato reprodutivo nas fêmeas (Gustafson, 1979; Krutzsch, 1979; Crichton e Krutzsch, 2000).

Os morcegos da região tropical não hibernam (Fleming et al., 1972; Taddei, 1976), e os processos reprodutivos geralmente sofrem influência de fatores abióticos, tais como, temperatura, precipitação, fotoperíodo e disponibilidade de alimentos (Fleming et al., 1972; Taddei, 1976). Por esta razão e pelo fato de que há variação no hábito alimentar entre os morcegos tropicais, a sazonalidade reprodutiva não é generalizada. Sendo assim, existe uma grande diversidade de estratégias reprodutivas nas espécies tropicais de morcegos, como padrões monoéstricos, poliéstricos ou até mesmo, reprodução contínua ao longo do ano (Taddei, 1980; Fazzolari-Corrêa, 1995; Zortéa, 2003).

Morcegos tropicais podem apresentar espermatogênese contínua durante o ano, porém nos períodos de cópula, apresentam picos de produção de espermatozoides (Crichton e Krutzsch, 2000; Beguelini et al., 2013a; Morais et al., 2012; 2013). Entretanto, algumas espécies de morcegos tropicais apresentam um padrão de regressão testicular, onde ocorre uma interrupção temporária do processo espermatogênico (Myers, 1977; Taddei, 1980; Crichton and Krutzsch, 2000; Araújo et al., 2013; Beguelini et al., 2013a; Morais et al., 2013). Além disso, o processo de regressão testicular influencia não apenas o processo espermatogênico em si, como também influencia a morfofisiologia das células do epidídimo em *Myotis nigricans*, bem como o funcionamento do mesmo (Beguelini et al., 2015).

No entanto, o processo de regressão testicular na espécie *M. nigricans* parece ser pouco correlacionado às mudanças ambientais (Beguelini et al., 2013b). Portanto, o ambiente pode afetar de forma diferente os gêneros e espécies desses morcegos, influenciando diretamente o ciclo reprodutivo das fêmeas (disponibilidade de alimentos sincronizada com o período de amamentação) e, indiretamente, influencia o ciclo reprodutivo dos machos (receptividade das fêmeas durante o período de cópula). Alguns

exemplos da sincronia entre os ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de espécies tropicais ocorrem em *Otomops martiensseni* (Mutere, 1973; Kayanja e Mutere, 1978), *O. wroughtoni* (Brosset, 1962), *Tadarida aegyptiaca* (Kashyap, 1980) e *Neoplatymops* (= *Molossops*) *mattogrossensis* (Willig, 1985).

Existe também uma grande variedade no padrão reprodutivo das fêmeas de diferentes espécies de morcegos tropicais, principalmente em Phyllostomidae e Molossidae, como a variação no formato do útero - duplo, bipartido, bicórneo e simples (Rasweiler e Badwaik, 2001; Komaret al., 2007); espécies que apresentam menstruação verdadeira (Rasweiler, 1991; Rasweiler e Bonilla, 1992; Komar et al., 2007; Wang et al., 2008; Rasweiler et al., 2011); ovários polarizados (Komar et al., 2007); ovulação preferencial, alternada ou dupla (Rasweiler e Badwaik, 2001); ovulação tardia (Abhilasha e Krishna, 1996) e retardos no desenvolvimento embrionário (Fleming, 1971; Rasweiler e Badwaik, 1997).

Dentre os morcegos de regiões tropicais, a espécie *Eptesicus furinalis* possui grande representação no Brasil, como citado anteriormente. Entretanto, as informações sobre os aspectos reprodutivos dessa espécie são controversas. Alguns dados apontam que essa espécie se reproduz uma vez ao ano (Davis, 1966), enquanto outros apontam reprodução duas vezes ano, com a gestação apresentando duração em torno de três meses (Myers, 1977; González, 2001).

As variações relatadas para *E. furinalis* parecem estar associadas mais à variação geográfica, do que específica. Animais de Belize (América Central), durante a estação reprodutiva, formam hárens, sendo que o macho abriga-se fora do grupo das fêmeas, e os nascimentos ocorrem no final de maio (geralmente com dois filhotes); contudo, algumas fêmeas parem novamente entre julho e agosto, gerando apenas um único filhote (McCarthy, 1980). No Paraguai, o primeiro parto ocorre no mês de julho e agosto e o segundo no mês de janeiro (Myers, 1977). Na Argentina, já foi registrado estro pós-parto (com fêmeas prenhas amamentando em novembro) e machos capturados com testículo escrotado nos meses de maio e novembro (Barquez et al., 1999).

Estudos recentes mostram que *E. furinalis* apresenta um processo de regressão testicular pelo menos uma vez no ano e quatro fases morfológicamente distintas no testículo (Bueno et al., 2014). A razão desse processo de regressão testicular (similar ao processo em morcegos hibernantes de clima temperado) ocorrer em morcegos de clima tropical ainda não foi elucidada. Porém, os dados de Beguelini et al. (2013b, c) evidenciam que o ciclo reprodutivo dos machos de algumas espécies de

vespertilionídeos de clima tropical parece não ser influenciado diretamente pelas mudanças ambientais, como é o caso de machos de espécies de Phyllostomidae (Beguelini et al., 2009). Além disso, o estudo de Pfeiffer e Mayer (2012) realizado com machos de quatro espécies de vespertilionídeos de clima temperado demonstrou que, provavelmente, o ciclo reprodutivo dos machos seja sincronizado com o ciclo reprodutivo das fêmeas.

Essa diversidade das características reprodutivas dos morcegos é interessante de ser investigada, principalmente com um intuito comparativo, para melhor entendermos a evolução das características reprodutivas dentro de Chiroptera e até mesmo, Mammalia. Além disso, o melhor conhecimento sobre as estratégias reprodutivas desses animais permite a criação de melhores estratégias de conservação dos mesmos. Além disso, como citado acima, algumas espécies de morcegos apresentam especializações reprodutivas similares a de outros primatas, que não é comum de observar nas espécies de mamíferos comumente estudados, tais como menstruação verdadeira e as assimetrias no trato reprodutivo, sendo ótimos animais modelos para estudos de desordens reprodutivas (Rasweiler e Badwaik, 2001).

Entretanto, o estudo de morcegos representa um grande desafio para os mamalogistas, uma vez que são animais de difícil acesso, em decorrência da sua capacidade de voo verdadeiro, somado ao hábito noturno. Embora as estratégias e métodos de captura desses animais sejam bem estabelecidos, elas não garantem que os animais propostos para o estudo sejam capturados. Nesse sentido, enfatizamos o grande desafio dos estudos com Chiroptera, especialmente aqueles voltados para análises de morfologia de sistemas e órgãos, bem como da fisiologia desses órgãos e diferentes tecidos.

II. OBJETIVOS

Diante das informações destacadas, o objetivo geral deste trabalho foi obter informações sobre o ciclo reprodutivo de machos e fêmeas do táxon de Vespertilionidae *Eptesicus furinalis*, avaliando morfologicamente e fisiologicamente os órgãos reprodutivos por meio de análises histológicas e fisiológicas, com o intuito de acrescentar novas informações sobre a reprodução de espécies tropicais da Ordem.

Objetivos Específicos

- Analisar nas células dos testículos de *E. furinalis* a expressão dos diferentes receptores de hormônios ligados à espermatogênese (LHR nas células de Leydig e AR nas células de Sertoli), bem como a taxa de proliferação celular (PCNA) nas células da linhagem espermatogênica e correlacionar as variações dos receptores às fases da regressão testicular;
- Caracterizar a morfologia do epidídimo de *E. furinalis* durante as quatro fases do processo de regressão testicular;
- Caracterizar o ciclo reprodutivo anual de fêmeas de *E. furinalis*;
- Avaliar, por meio de análises morfométricas, as mudanças mensais na morfologia do útero e ovários de *E. furinalis*;
- Caracterizar e comparar a morfologia do ovário e o processo da foliculogênese de *Eptesicus furinalis* com a espécie *Artibeus planirostris* (Phyllostomidae).

III.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHILASHA, S.; KRISHNA, A. High androgen production by ovarian thecal interstitial cells: a mechanism for delayed ovulation in a tropical vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 106, p. 207-211, 1996.

ADAMS, G. P. et al. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. **Theriogenology**. v. 78, p. 1733-1748, 2012.

ARAÚJO, R.A. et al. Seasonal Reproduction of Yellowish *Myotis*, *Myotis levis* (Chiroptera: Vespertilionidae), from a Neotropical Highland. **Journal of Morphology**. v. 274(11), p. 1230-1238, 2013.

BAGATELL, C.J.; DAHL, K.D.; BREMNER, W.J. The direct pituitary effect of testosterone to inhibit gonadotropin secretion in men is partially mediated by aromatization to estradiol. **Journal of Andrology**. v. 15, p. 15-21, 1994.

BARQUEZ, R.M.; MARES, M.A.; BRAUN, J.K. **The Bats of Argentina**. Lubbock: Special Publications of the Museum of Texas Tech University, 1999.

BEGUELINI, M.R. et al. Morphological Characterization of the Testicular Cells and Seminiferous Epithelium Cycle in Six Species of Neotropical Bats. **Journal of Morphology**. v. 270, p. 943-953, 2009.

BEGUELINI, M.R. et al. Annual reproductive cycle of males of the flat-faced fruit-eating bat, *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). **General and Comparative Endocrinology**. v. 185, p. 80-89, 2013a.

BEGUELINI, M.R. et al. Two periods of total testicular regression are peculiar events of the annual reproductive cycle of the black *Myotis* bat, *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). **Reproduction Fertility and Development**. v. 26(6), p. 834-46, 2013b.

BEGUELINI, M.R. et al. Morphological Variation of Primary Reproductive Structures in Males of Five Families of Neotropical Bats. **Anatomical Record**. v. 296, p. 156-167, 2013c.

BEGUELINI, M.R. et al. Impact of the Processes of Total Testicular Regression and Recrudescence on the Epididymal Physiology of the Bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). **PlosOne**, 2015.

BERGMANS, W. Taxonomy and biogeography of African fruit bats (Mammalia, Megachiroptera). **Beaufortia**. v. 47(2), p. 11-90, 1997.

BIANCONI, G.V.; PEDRO, W.A. Família Vespertilionidae. In: REIS, N.L.; PERACCHI, A.I.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P (Eds). **Morcegos do Brasil**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2007.

BOYLES, J.G. et al. Economic Importance of Bats in Agriculture. **Science**. v. 332, p. 41-42, 2011.

BRAW-TAL, R.; ROTH, Z. Gene expression for LH receptor, 17 alpha-hydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. **Reproduction**. v. 129, p. 453-461, 2005.

BRONSON, F.H. Mammalian Reproduction: An Ecological Perspective. *Biology of Reproduction*. v. 32, p. 1-26, 1985.

BROSSET, A. The bats of central and western India, Part III. **Journal of the Bombay Natural History Society**. v. 59, p. 707-746, 1962.

BUENO, L.M. et al. Ultrastructure of spermatogenesis, spermatozoon and processes of testicular regression and recrudescence in *Eptesicus furinalis* (Chiroptera: Vespertilionidae). **Animal Reproduction Science**. v. 148, p. 228-244, 2014.

Bukovsky, A. et al. Oogenesis in Adult Mammals, Including Humans. **Endocrine**. v. 26, p. 301-316, 2005.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological Reviews**. v. 52, p. 198-236, 1972.

COSTA, D.S.; PAULA, T.A.R. Espermatogênese em mamíferos. **Scientia Vila Velha (ES)**, v. 49(1/2), p. 53-72, 2003.

CRICHTON, E.G.; KRUTZSCH, P.H. **Reproductive biology of bats**. London: Academic Press, 2000.

DAVIS, W. Review of South American bats of the genus *Eptesicus*. **Southwestern Natural**. v. 11, p. 245-274, 1966.

DORRINGTON, J. H.; KHAN, S. A. Steroid production, metabolism and release by Sertoli cells. In: RUSSEL, L.D.; GRISWOLD, M.D. (Eds.) **The Sertoli Cell**. Cache River Press: Clearwater, FL., 1993.

DUPONT, S. et al. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. **Development**. v. 127, p. 4277-4291, 2000.

EDDY, E.M. et al. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. **Endocrinology**. v. 137, p. 4796-4805, 1996.

EISENBERG, J.F.; REDFORD, K.H. **Mammals of the Neotropics. The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brasil**. Chicago: University of Chicago Press., 1999.

ERICKSON, G.F. Follicle growth and development. In: SCIARRA, J.J. (Ed.) **Gynecology and Obstetrics**, 2002.

FAZZOLARI-CORRÊA, S. Aspectos sistemáticos, ecológicos e reprodutivos de morcegos na Mata Atlântica. **Tese Doutorado**. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 158f, 1995.

FENTON, M.B.; SIMMONS, N.B. **Bats: a world of Science and mystery**. The University of Chicago Press, 2014.

FENTON, M.B. **Bats**. New York: Facts on File, Inc., 1992.

FINDLAY, J.K.; DRUMMOND, A.E. Regulation of the FSH receptor in the ovary. **Trends in Endocrinology & Metabolism**. v. 10, p. 183-188, 1999.

FLEMING, T.H. *Artibeus jamaicensis*: Delayed Embryonic Development in a Neotropical Bat. **Science, New Series**. v. 171, p. 402-404, 1971.

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.

GONZÁLEZ, E.M. **Guía de Campo de los Mamíferos de Uruguay**. Montevideo: Vida Silvestre, Sociedade Uruguaya para la Conservación de la Naturaleza, 2001.

GOODWIN, G.G.; GREENHALL, A.M. A review of the bats of Trinidad and Tobago: descriptions, rabies infection and ecology. **Bulletin of the American Museum of National History**. v. 122(3), p. 187-302, 1961.

GOUGEON, A. Dynamics of human follicular growth: morphologic, dynamic, and functional aspects. In: LEUNG, P.; ADASHI, E. (Eds). **The Ovary**. Elsevier Academic Press, 2004.

GRIFFIN, J. et al. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig and human). **Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction**. v.3(2), 2006.

GUSTAFSON, A.W. Male reproductive patterns in hibernating bats. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.56, p. 317-331, 1979.

HALL, J.E. **Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology**. Philadelphia: PA Elsevier Saunders, 2011.

HAYES, F.J. et al. Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 85, p. 3027-3035, 2000.

HAYMAN, T.S.D. Bats as viral reservoirs. **Annual Review of Virology**. v. 3, p. 77-99, 2016.

HESS, R.A. Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 1, p. 52, 2003.

HOLDCRAFT, R.W.; BRAUN, R.E. Hormonal regulation of spermatogenesis. **International Journal of Andrology**. v. 27, p. 335-342, 2004.

JEPSEN, G.L. Early Eocene Bat from Wyoming. **Science**. v. 154(3754), p. 1333-1339, 1966.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Masculino. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (Eds). **Histologia básica**. Editora Guanabara Koogan S.A., 2004.

KARDONG, K.V. Vertebrates: comparative anatomy, function e evolution. New York: McGraw Hill, 2010.

KASHYAP, S.K. Reproductive cycle of the Indian molossid bat, *Tadarida aegyptiaca*. **Current Science**. v. 49, p. 252-253, 1980.

KAYANJA, F.I.B.; MUTERE, F.A. The fine structure of the testis of the insectivorous bat, *Otomops martiensseni*. **Proceedings of the 4th International Bat Research Conference**: OLEMBO, R.J.; CASTELINO, J.B. e MUTERE, F.A. (Eds), pp. 245-254, 1978.

KOMAR, C.M. et al. Polarized ovaries of the long-tongued bat, *Glossophaga soricina*: a novel model for studying ovarian development, folliculogenesis, and ovulation. **Anatomical Record**. v. 290, p. 1439-1448, 2007.

KOOPMAN, K.F. Order Chiroptera, In: WILSON, D.E.; REEDER, D.M. (Eds). **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. Washington, Smithsonian Institute Press, 1993.

KRUTZSCH, P.H. Male reproductive patterns in nonhibernating bats. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 56, p. 333-344, 1979.

LAVAL, R.K.; FITCH, H.S. Structure, movements and reproduction in three Costa Rican bats communities. **Occasional Papers of Museum of Natural History**. v. 6, p. 1-28, 1977.

LUBAHN, D.B. et al. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. v. 90, p. 11162-11166, 1993.

MAEKAWA, M.; KAMIMURA, K.; NAGANO, T. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. **Archives of Histology and Cytology**. v. 59, p. 1-13, 1996.

MARTINS, F.S. et al. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 32(1), p. 36-49, 2008.

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

MCCARTHY, T.J. Aspects of reproduction in *Rhogeessa tumida* and *Eptesicus furinalis* from Belize. Abstract, **Annual meeting, American Society of Mammalogists**, 1980.

MCLACHLAN et al. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rat, monkeys, and man. **Recent Progress in Hormone Research**. v.57, p. 149-179, 2002.

MENDIS-HANDAGAMA, S.M. Luteinizing hormone on Leydig cell structure and function. **Histology and Histopathology**. v. 12, p. 869-882, 1997.

MIES, R.; KURTA, A.; KING, D.G. *Eptesicus furinalis*. **Mammalian species**. v. 526, p. 1-7, 1996.

MIRANDA, J.M.D.; BERNARDI, I.P.; PASSOS, F.C. A new species of *Eptesicus* (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae) from the Atlantic Forest, Brazil. **Zootaxa**. v. 1383, p. 57-68, 2006.

- MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V. Início do desenvolvimento humano. In: MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. (Eds). **Embriologia clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- MORAIS, D.B. et al. Cycle of the seminiferous epithelium of the bat *Molossus molossus*, characterized by tubular morphology and acrosomal development. **Asian Pacific Journal of Reproduction**. v. 1(4), p. 303-307, 2012.
- MORAIS, D.B. et al. Organization and Seasonal Quantification of the Intertubular Compartment in the Bat *Molossus molossus* (Pallas, 1776) Testis. **Microscopy Research and Technique**. v. 76, p. 94-101, 2013.
- MOSSMAN, H.W. Comparative Anatomy. In: WYNN, R.M. (Ed.). **The biology of the uterus**. New York: Ed. Plenum Press., 1977.
- MUTERE, F.A. A comparative study of reproduction in two populations of the insectivorous bat, *Otomops martiensseni*, at latitudes 1°5' S and 2°30' S. **Journal of Zoology**. v. 171, p. 79-92, 1973.
- MYERS M. et al. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. **Reproduction**. v. 127, p. 569-580, 2004.
- MYERS, P. Patterns of reproduction of four species of vespertilionid bats in Paraguay. **UC Publications in Zoology**. v. 107, p. 1-41, 1977.
- NEILL, J.D. **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. New York: Academic Press, 2005.
- NITTA, H. et al. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. **Endocrinology**. v. 132, p. 1396-13401, 1993.
- NOGUEIRA, M.R. et al. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. **Check List**. v. 10, p. 808-821, 2014.
- NOWAK, R.M. **Walker's bats of the world**. Baltimore: Johns Hopkin University Press, 1999.
- O'DONNELL, L. et al. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**. v. 22, p. 289-318, 2001.
- O'DONNELL, L. et al. Endocrine Regulation of Spermatogenesis. In: NEILL, J.D. (Ed.) **Physiology of Reproduction**. New York: Academic Press, 2006.

O'SHAUGHNESSY, P.J.; MCLELLAND, D.; MCBRIDE, M.W. Regulation of luteinizing hormone receptor and follicle-stimulating hormone-receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovarian. **Biology of Reproduction**. v. 57, p. 602-608, 1997.

PARVINEN, M. et al. *In vitro* stimulation of stage-specific deoxyribonucleic acids synthesis in rat seminiferous tubule by interleukin-1 α . **Endocrinology**. v. 129, p. 1614-1620, 1991.

PEDERSEN, T.; PETERS, H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 17, p. 555-557, 1968.

PEDERSEN, T. Follicle growth in the immature mouse ovary. **Acta Endocrinologica** (Copenh). v. 62, p. 117-132, 1969.

PELUSO, J.J. Multiplicity of progesterone's actions and receptors in mammalian ovary. **Biology of Reproduction**. v. 75(5), p. 2-8, 2006.

PFEIFFER, B; MAYER, F. Spermatogenesis, sperm storage and reproductive timing in bats. **Journal of Zoology**. v. 289, p. 77-85, 2012.

POUGH, F.H. **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2008.

RASWEILER IV, J.J.; BADWAIK, N.K. Delayed development in the short-tailed fruit bat, *Carollia perspicillata*. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 109, p. 7-20, 1997.

RASWEILER IV, J.J.; BADWAIK, N.K. Anatomy and Physiology of the Female Reproductive Tract. In: CRICHTON, E.G.; KRUTZSCH, P.H. (Eds.) **Reproductive Biology of Bats**, London: Academic Press, 2001.

RASWEILER IV, J.J.; BONILLA, H. Menstruation in short-tailed fruit bats (*Carollia* spp.). **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 95, p. 231-248, 1992.

RASWEILER IV, J.J.; BADWAIK, N.K.; MECHINENI, K.V. Ovulation, Fertilization and Early Embryonic Development in the Menstruating Fruit Bat, *Carollia perspicillata*. **Anatomical Records (Hoboken)**. v. 294(3), p. 506-519, 2011.

RASWEILER IV, J.J. Spontaneous decidual reactions and menstruation in the black mastiff bat, *Molossus ater*. **The American Journal of Anatomy**. v. 191, p. 1-22, 1991.

REIS, N.L. et al. **Morcegos do Brasil**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2007.

REIS, N. R; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. Família Vespertilionidae. In PERACCHI, A.L. et al. (Eds). **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Nélío R. dos Reis, 2011.

REYNAUD, K. Folliculogenesis and Morphometry of Oocyte and Follicle Growth in the Feline Ovary. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 44, p. 174-179, 2009.

ROBAIRE, B.; HAMZEH, M. Androgen Action in the Epididymis. **Journal of Andrology**. v. 32(6), p. 592-599, 2011.

RODRIGUEZ, C.M.; KIRBY, J.L.; HINTON, B.T. The development of the epididymis. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B.T. (Eds.), **The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice**, New York: Kluwer Academic/Plenum, 2002.

ROY, S.K. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta modulation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral and early antral follicles. **Biology of Reproduction**. v. 48, p. 552-557, 1993.

RUSSEL, L.D.; GRISWOLD, M.D. **The Sertoli Cell**. Florida: Chace River Press., 1993

RUSSEL, L.D. et al. Mammalian Spermatogenesis. In: RUSSEL, L.D. et al. (Eds.) **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Florida: Cache River Press., 1990.

SCHREIBER, J.R.; NAKAMURA, K.; ERICKSON, G.F. Progestins inhibit FSH stimulated steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. **Molecular Cell Endocrinology**. v. 19(10), p. 165-173, 1980.

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. **Bulletin of American Museum of Natural History**. v. 235, p. 1-182, 1998.

SIMMONS, N.B. Order Chiroptera. In: WILSON, D.E.; REEDER, D.M. **Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference**. Baltimore: John Hopkins University Press., 2005.

SPEAKMAN, J.R. The evolution of light and echolocation in bats: another leap in the dark. **Mammalian Review**. v. 31(2), p. 111-130, 2001.

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

TADDEI, V.A. Biologia reprodutiva de Chiroptera: perspectivas e problemas. **Interfaces**. v. 6, p. 1-18, 1980.

TEELING, E.C. et al. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. **Science**. v. 302, p. 580-584, 2005.

TSAI-MORRIS, C.H.; AQUILANO, D.R.; DUFAU, M.L. Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. **Endocrinology**. v. 116, p. 38-46, 1985.

VOIGHT, C.C.; KINGSTON, T. **Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World**. Springer, 2016.

WANDJI, S.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M. Differential response to gonadotrophins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. **Biology of Reproduction**. v. 46, p. 1034-1041, 1992.

WANG, Z. et al. Sperm storage, delayed ovulation and menstruation of the female Rickett's big-footed bat (*Myotis ricketti*). **Zoological Studies**. v. 47, p. 215-221, 2008.

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

WU, J.; et al. Luteinizing Hormone has a stage-limited effect on preantral follicle development *in vitro*. **Biology of Reproduction**. v. 63, p. 320-327, 2000.

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

IV. RESULTADOS

Os resultados obtidos foram organizados em cinco capítulos representados por manuscritos que foram elaborados de forma a atender especificações de revistas científicas com interesse na área:

Capítulo 1 – Manuscrito: **“Variação morfológica dos testículos e seus receptores hormonais durante o processo de regressão testicular em *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae: Chiroptera)”**

Capítulo 2 – Manuscrito: **“Morfologia do epidídimo de *Eptesicus furinalis* (Chiroptera: Vespertilionidae) durante o processo de regressão testicular”**

Capítulo 3 – Manuscrito: **“Morfologia do útero de *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae: Chiroptera) em diferentes fases do ciclo reprodutivo”**

Capítulo 4 – Manuscrito: **“Variações morfológicas nos ovários de *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae: Chiroptera) durante o ciclo reprodutivo anual”**

Capítulo 5 – **“Ovarian morphology and folliculogenesis process in the flat-faced fruit-eating bat *Artibeus planirostris* and the Argentine brown bat *Eptesicus furinalis*: a comparative analysis”**

Capítulo 1

Variação morfológica dos testículos e seus receptores hormonais durante o processo de regressão testicular em *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae: Chiroptera)

Artigo a ser submetido para publicação na revista “Animal Reproduction Science”.

Variação morfológica dos testículos e seus receptores hormonais durante o processo de regressão testicular em *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae: Chiroptera)

Larissa Mayumi Bueno^a, Mateus Rodrigues Beguelini^b, Sebastião Roberto Taboga^c, Eliana Morielle-Versute^a.

^a Departamento de Zoologia e Botânica, UNESP – Univ. Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil;

^b Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, UFOB – Univ. Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, Bahia, Brasil.

^c Departamento de Biologia, UNESP – Univ. Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil;

*Autor Correspondente: morielle@ibilce.unesp.br (E. Morielle-Versute).

RESUMO

Machos de *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae, Chiroptera) apresentam um processo de regressão testicular, no qual o testículo interrompe temporariamente a produção de espermatozoides. Como a espermatogênese está sob o controle hormonal, principalmente, de hormônios andrógenos, o objetivo desse trabalho foi verificar a variação de receptores hormonais ligados à espermatogênese, bem como a variação morfológica dos testículos durante o processo de regressão testicular da espécie. Para isso, utilizamos 12 machos adultos, sendo 03 machos para cada fase testicular: testículo ativo, em regressão, regredido e em recrudescência, dos quais os testículos foram retirados e processados para análises morfológicas e imunoistoquímicas. Ocorreu uma diminuição da área dos túbulos seminíferos dos testículos ativos para os testículos regredidos, bem como uma variação na porcentagem relativa de compartimentos (epitélio, lúmen e tecido intersticial) entre as diferentes fases reprodutivas testiculares. Além disso, os receptores de andrógenos (AR) e de hormônio luteinizante (LHR), bem como a proliferação celular (PCNA) também exibiram variação de acordo com a fase reprodutiva testicular, apresentando aumento de intensidade no padrão de imunomarcção para o LHR e aumento no número de imunomarcções para o AR e PCNA na fase ativa e menor intensidade no padrão de imunomarcção para o LHR e diminuição no número de imunomarcções para o AR e PCNA na fase regredida. Portanto, o processo de regressão testicular em *E. furinalis* apresenta diferenças morfométricas nos túbulos seminíferos, além de estar ligado à influência de ação dos hormônios andrógenos e luteinizante.

Palavras-chave: receptor de LH, receptor de andrógenos, estereologia.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os mamíferos, os morcegos exibem a maior variedade de padrões e adaptações reprodutivas (Crichton e Krutzsch, 2000). De forma geral, morcegos de hábitat tropical apresentam a reprodução influenciada por fatores abióticos, tais como, pluviosidade, temperatura e fotoperíodo (Fleming et al., 1972; Taddei, 1976; Gustafson, 1979), e morcegos de hábitat temperado possuem reprodução sazonal, em que os animais apresentam adaptações para o período de hibernação durante o inverno (Anand-Kumar, 1965; Racey, 1979; Rasweiler, 1993; Crichton e Krutzsch, 2000; Encarnação et al., 2004; Sharifi et al., 2004;). Dentre essas adaptações, podemos citar a regressão testicular, em que machos de espécies hibernantes cessam a produção de espermatozoides durante a hibernação (Racey, 1974; Gustafson, 1979; Jolly e Blackshaw, 1984).

O processo de regressão testicular é também observado em algumas espécies de morcegos não-hibernantes de clima tropical, tais como *Corynorhinus mexicanus* (León-Galván et al., 2005), *Eptesicus furinalis* (Bueno et al., 2014), *Lasiurus ega* (Myers, 1977), *Myotis nigricans* (Beguelini et al., 2013), *Nycticeius schlieffenii* (van der Merwe e Rautenbach, 1987), *Pipistrellus rusticus* (van der Merwe e Rautenbach, 1990), *Scotophilus heathi* (Krishna e Singh, 1997) e *S. wroughtoni* (Gopalakrishna, 1948). A presença desse processo em espécies de morcegos não hibernantes é interessante, uma vez que muitas espécies tropicais exibem atividade espermatogênica contínua durante todo o ano (Bronson, 1988; Beguelini et al., 2009).

Como a atividade espermatogênica está sob controle dos hormônios hipofisários FSH e LH, bem como dos andrógenos e estrógenos produzidos pelas células testiculares (O'Donnell et al., 2001; Hess, 2003; Kawamoto, 2003; Krishna e Bhatnagar, 2010), é esperado que a regressão testicular esteja ligada, principalmente, à mudanças na expressão e ativação desses receptores hormonais (Beguelini et al., 2013).

Eptesicus furinalis é uma espécie insetívora exclusivamente neotropical (Mies et al., 1996), com importante papel ecológico no controle populacional de insetos (Aguiar e Antonini, 2008). Essa espécie é um exemplo de espécie tropical que apresenta pelo menos um período de regressão testicular em seu ciclo reprodutivo anual e a razão dessa regressão testicular ocorrer em espécies de morcegos tropicais ainda não foi elucidada (Bueno et al., 2014). Entretanto, não há dados sobre a influência dos receptores hormonais e suas vias de sinalização no processo de regressão testicular da espécie. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi analisar a variação morfológica, bem como

a variação de receptores hormonais nos testículos de *E. furinalis* durante o processo de regressão testicular, a fim de contribuir com o conhecimento da reprodução de morcegos e, em especial, morcegos neotropicais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

a. Design amostral, coletas e licenças

Eptesicus furinalis (d'Orbigny e Gervais, 1847) é uma espécie de vespertilionídeo que não está listada como ameaçada de extinção na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da International Union for Conservation of Nature (IUCN). Essa espécie utiliza abrigos específicos, em geral de difícil acesso, e organiza-se na forma de haréns (com um macho para múltiplas fêmeas). Assim, as coletas foram realizadas sempre no período noturno, com o uso de redes de neblina armadas estrategicamente próximas a saídas de abrigos e/ou em possíveis rotas de voo, e o número de animais utilizados para o estudo foi um balanço entre o número mínimo de espécimes necessários para a realização de análises significativas, e número máximo de espécimes machos que poderiam ser coletados sem causar maiores distúrbios nas respectivas colônias.

As capturas dos animais foram autorizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente – IBAMA (Licença número: 21707-1; Sisbio: 59765825-13/04/2010), e os procedimentos com os animais foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso Animal – CEUA do IBILCE/UNESP (Processo102/2014-CEUA). Todos os espécimes estão depositados na Coleção de Chiroptera do Departamento de Zoologia de Botânica do IBILCE/UNESP.

Foram coletados 12 machos adultos na região urbana de São José do Rio Preto – São Paulo – Brasil (20°49'11''S, 49°22'45''W) durante os anos de 2013 a 2014, representados por três espécimes em cada uma das quatro fases reprodutivas testiculares descritas para a espécie, ou seja, fase ativa (setembro/2013), fase em regressão (outubro/2013), fase regredida (novembro/2013) e fase de recrudescência (dezembro/2013). As fases testiculares foram reconhecidas baseando-se na morfologia e nas células espermato gênicas presentes nos túbulos seminíferos, como descrito por Beguelini et al. (2013a, b) e Bueno et al. (2014).

Os animais foram classificados como adultos de acordo com o peso corporal, a completa ossificação das articulações metacarpo-falangeanas, o grau de desgaste

dentário (Kunz e Anthony, 1982; de Knecht et al., 2005) e a presença de espermatozoides no epidídimo (Beguelini et al., 2013a, b).

b. Preparação dos tecidos e análise do material

Os animais foram eutanasiados por anestesia profunda, pela aplicação de uma mistura de ketamina (370 mg/kg; Dopalen-Vertebrands, Paulínia, SP, Brazil) e xilazina (16 mg/kg; Rompun-Bayer S.A., São Paulo, SP, Brazil) aplicada subcutaneamente na quantidade de 0,1 ml para cada 50 g de peso corporal.

Os animais foram pesados e os testículos de cada animal foram retirados cuidadosamente, pesados e fixados em solução fixadora de metanol: clorofórmio: ácido acético (6:3:1) por 3 horas a 4°C, desidratados em álcool, clarificados em xilol e incluídos em parafina (Histosec – Merck, Darmstadt, Germany). Cortes de 5µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo e submetidos à coloração de Hematoxilina e Eosina - HE (Ribeiro e Lima, 2000) e às reações imunoistoquímicas.

Todos os resultados foram analisados e fotodocumentados com o uso do microscópio Olympus BX60 (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) do Laboratório de Microscopia e Microanálise do IBILCE/UNESP.

c. Análises morfométricas e estereológicas

As análises morfométricas e estereológicas foram aplicadas nos cortes dos testículos corados com HE, para os quais foram avaliadas a área dos túbulos seminíferos e a porcentagem relativa dos componentes do parênquima testicular (epitélio, lúmen e tecido intersticial). As medidas foram realizadas com a utilização do software Image Pro-Plus-Media Cybernetics versão 6.1 para Windows.

A área dos túbulos seminíferos foi medida em 30 cortes transversais dos túbulos seminíferos por animal, em aumento de 400x, utilizando a ferramenta “Create polygon feature” do Software Image, por meio da qual o túbulo seminífero é circundado e o valor da área é exibido.

A proporção relativa de epitélio, lúmen e tecido intersticial foi estimada de acordo com o método proposto por Weibel et al. (1978) e modificado por Gobbo et al. (2012), sendo a frequência relativa calculada através do Sistema-Teste de arranjo triangular M42, com 168 pontos no sistema, utilizando 20 campos aleatoriamente selecionados para cada animal. Essa frequência foi calculada de acordo com os pontos do Sistema-Teste que tocam os componentes analisados, ou seja, epitélio, lúmen e

tecido intersticial. Após obtenção das frequências (%), essas foram calibradas em relação ao peso testicular do animal, seguindo a fórmula $\% \text{ Compartimento} \times \text{Peso dos testículos} / 100 \times 1000$.

O Índice Gonadosomático (IGS) foi calculado para cada animal, utilizando a fórmula: $\text{IGS} = P_T/P_A \times 1000$, onde P_T é o valor do peso de ambos os testículos e P_A é o valor do peso do animal.

d. Imunoistoquímica

Os cortes histológicos foram desparafinizados, submetidos à recuperação antigênica com Tampão Citrato (pH 6,0) à 92°C, seguida pelo bloqueio de peroxidases endógenas, em solução de Peróxido de Hidrogênio a 10% em Metanol, e do bloqueio de ligações inespecíficas em BSA a 3%. Após esses processos, os cortes foram incubados *overnight* a 4°C com os anticorpos primários contra receptores de andrógenos (anti-AR: AR- rabbit polyclonal IgG, N-20, Santa Cruz Biotechnology, EUA, 1:50), contra receptores de hormônio luteinizante (anti-LHR:LHR - rabbit polyclonal IgG sc-25828, Santa Cruz Biotechnology, EUA, 1:75) e ao marcador nuclear de proliferação celular (PCNA – monoclonal anti-mouse, PC10 sc-56, Santa Cruz Biotechnology, EUA, 1:100). Os anticorpos primários foram então ligados a anticorpos secundários e amplificados através do Complexo Avidina-Biotina (ABC Staining System sc-2018, Santa Cruz Biotechnology, EUA). Os cortes foram submetidos à reação com diaminobenzidina (DAB) e posteriormente contra corados com Hematoxilina de Harris. Controles negativos foram feitos omitindo-se a incubação com o anticorpo primário.

A incidência de células positivas para o AR e PCNA foi estimada de acordo com o método proposto por Dadhich et al. (2010) com modificações, calculando a média das células positivas por μm^2 de túbulo seminífero, seguindo a fórmula:

$$X = C_{TS}/A_{TS} \times 1000$$

Onde C_{TS} é o número de células positivas por seção de túbulo seminífero e A_{TS} é a área da seção do túbulo seminífero (em μm^2).

e. Análises estatísticas

Médias e erro padrão foram calculados para todos os dados. A normalidade foi verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov e as diferenças entre os grupos foram calculadas através do teste Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn para múltiplas comparações, utilizando o valor de $p \leq 0,05$ para a diferença significativa entre os

grupos. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prisma versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA, www.graphpad.com).

3. RESULTADOS

Os espécimes analisados contemplaram as quatro fases observadas no testículo durante o ciclo reprodutivo de machos adultos (ativamente reprodutivos) de *E. furinalis*. As condições dos espécimes e testículos foram: três machos na fase ativa coletados em Setembro, três machos na fase em regressão coletados em Outubro, três machos na fase regredida coletados em Janeiro e três machos na fase de recrudescência coletados em Agosto.

Na **Figura 1** estão representadas as condições que caracterizam cada uma das fases. A fase ativa (**Figura 1A**) é caracterizada pela presença de toda a linhagem espermatogênica no interior dos túbulos seminíferos; na fase em regressão (**Figura 1B**), há uma predominância de túbulos onde não há a presença de espermatócitos, apenas espermatídes finalizando o processo espermatogênico; na fase regredida (**Figura 1C**), há apenas a presença de espermatogônias e células de Sertoli, e, na fase de recrudescência (**Figura 1D**), além das células de Sertoli e espermatogônias, há novamente a presença de espermatócitos e a reativação do processo espermatogênico na maioria dos túbulos seminíferos.

3.1. Peso dos animais, peso dos testículos e índice gonadossomático (IGS)

O peso corporal dos animais não apresentou diferença significativa em nenhuma das quatro fases (**Figura 2A**): fase ativa - $7,04 \text{ g} \pm 0,11$; fase em regressão - $6,79 \text{ g} \pm 0,34$; fase regredida - $6,34 \text{ g} \pm 0,19$; e fase de recrudescência - $5,81 \text{ g} \pm 0,25$. A média geral dos pesos de todos os animais foi de $6,50 \text{ g} \pm 0,17$.

O peso médio dos testículos (**Figura 2B**) não apresentou diferenças significativas entre as fases ativa ($86,28 \text{ mg} \pm 8,84$) e em regressão ($86,22 \text{ mg} \pm 9,74$) e entre as fases regredida ($14,25 \text{ mg} \pm 0,88$) e recrudescência ($23,82 \text{ mg} \pm 2,32$), mas foi significativamente diferente entre os subconjuntos das outras fases (ativa x regredida; ativa x recrudescência; em regressão x regredida e em regressão x recrudescência). Resultados semelhantes foram observados para o IGS: fase ativa - 12,25%; fase em regressão 12,69%; fase regredida 2,25% e fase de recrudescência 4,10% (**Figura 2C**).

3.2. Morfometria e proporção dos compartimentos testiculares

A área dos túbulos seminíferos foi similar entre as fases ativa ($28,80 \text{ mm}^2 \pm 0,732$) e em regressão ($29,31 \text{ mm}^2 \pm 1,03$). No entanto, há uma diminuição estatisticamente significativa da área na fase regredida ($6,30 \text{ mm}^2 \pm 0,193$), seguida por um aumento significativo na fase em recrudescência ($13,37 \text{ mm}^2 \pm 0,368$) (**Figura 3**).

A **Figura 4** apresenta o gráfico representativo dos valores das médias da porcentagem relativa dos componentes do parênquima testicular em relação ao peso dos testículos nas diferentes fases da regressão testicular.

Nota-se que a média da proporção dos componentes do parênquima testicular em relação ao peso do testículo também apresentou variação entre as diferentes fases testiculares: fase ativa (epitélio – $71,91 \pm 0,70$; lúmen – $4,76 \pm 0,43$; tecido intersticial – $9,34 \pm 0,71$); fase em regressão (epitélio – $73,91 \pm 0,70$; lúmen – $7,15 \pm 0,68$; tecido intersticial – $5,02 \pm 0,30$); fase regredida (epitélio – $11,35 \pm 0,1098$; lúmen – $0,013 \pm 0,0084$; tecido intersticial – $2,87 \pm 0,109$) e fase de recrudescência (epitélio – $20,17 \pm 0,16$; lúmen – $0,83 \pm 0,071$; tecido intersticial – $2,82 \pm 0,180$).

O epitélio apresentou diferença significativa entre as fases ativa e regredida e entre as fases em regressão e regredida; o lúmen apresentou diferença significativa entre todas as fases, exceto entre as fases ativa e em regressão, e entre as fases regredida e em recrudescência; já o tecido intersticial apresentou diferença significativa entre as fases ativa e regredida e entre as fases ativa e em recrudescência.

3.3. Imunoistoquímica

3.3.1. PCNA

Espermatogônias em divisão e espermatócitos primários em estágios iniciais (pré-leptóteno, leptóteno e zigóteno) foram os únicos tipos celulares que apresentaram marcação positiva para o PCNA e, portanto, foram inseridos na contagem. O valor das médias das células positivas por μm^2 nas diferentes fases reprodutivas do testículo de *E. furinalis* variaram entre as diferentes fases: fase ativa - $2,18 \pm 0,20$; fase em regressão - $0,95 \pm 0,08$; fase regredida - $0,77 \pm 0,07$ e fase em recrudescência - $5,47 \pm 0,75$.

Os valores das médias de células positivas por μm^2 nas diferentes fases reprodutivas do testículo estão representados no gráfico da **Figura 5**. É possível notar que existiu uma quantidade decrescente de proliferação celular entre os períodos ativo, regredindo e regredido, entretanto, o período em reativação mostrou a maior

proliferação celular entre todas as fases. Além disso, as diferentes fases apresentaram uma diferença significativa na proliferação celular entre elas, exceto entre as fases em regressão e regredida.

3.3.2. Receptores do Hormônio Luteinizante (LHR)

A reação imunoistoquímica para receptores do hormônio luteinizante demonstrou marcações positivas apenas no citoplasma das células de Leydig, as quais apresentaram ampla variação na intensidade de marcação entre as diferentes fases reprodutivas testiculares analisadas (**Figura 6**). A avaliação demonstrou que houve uma diminuição gradativa da imunomarcação de LHR da fase ativa (**Figura 6A**) para fase em regressão (**Figura 6B**), e posteriormente para a fase regredida (**Figura 6C**), a qual apresentou o menor padrão de imunomarcação. Por outro lado, a fase em recrudescência (**Figura 6D**) apresentou intensidade de imunomarcação semelhante à marcação da fase ativa, demonstrando um acentuado aumento na imunorreatividade dos receptores de LH.

3.3.3. Receptores de Andrógenos (AR)

A marcação positiva para os receptores de andrógenos (AR) foi restrita às células de Sertoli e algumas células mióides e células de Leydig, sendo as duas primeiras os únicos tipos celulares incluídos nas contagens. Os valores das médias de células positivas por μm^2 nas diferentes fases reprodutivas testiculares foram: fase ativa - $0,65 \pm 0,04$; fase em regressão - $0,32 \pm 0,50$; fase regredida - $0,49 \pm 0,60$ e fase em recrudescência - $2,07 \pm 0,15$.

É possível notar que a fase em recrudescência do testículo apresentou a maior concentração de receptores de andrógenos. Todas as fases apresentaram diferença significativa entre elas, exceto quando comparadas as fases ativa e em regressão, e as fases em regressão e regredida (**Figura 7**).

4. DISCUSSÃO

Vespertilionidae é a família de morcego que apresenta a maior diversidade de espécies e a maior distribuição geográfica (Krutzsch 1979; Simmons 2005). A maioria das espécies de vespertilionídeos habita regiões temperadas e, portanto, são espécies geralmente monoéstricas, que apresentam o período de cópula e produção de espermatozoides ocorrendo no verão e, no inverno, ocorre um período de hibernação (Gustafson, 1979; Krishna e Singh, 1997; Krutzsch, 1979). Durante o período de

hibernação, os machos apresentam o volume testicular reduzido e podem armazenar espermatozoides na cauda do epidídimo, enquanto que as fêmeas podem armazenar espermatozoides no útero ou tubas uterinas (Gustafson, 1979; Kruttsch, 1979; Crichton e Kruttsch, 2000).

Já os vespertilionídeos de regiões tropicais não hibernam e são geralmente poliétricos, podendo apresentar dois ou mais períodos reprodutivos ao longo do ano (Kruttsch, 1979). Normalmente, o período de parto de morcegos insetívoros tropicais coincide com a época chuvosa e consequente abundância de insetos (Racey e Entwistle, 2001).

Eptesicus furinalis é uma espécie de vespertilionídeo insetívora amplamente distribuída na América Latina (Mies et al. 1996; Davis e Gardner, 2007), porém, os dados literários sobre a reprodução da espécie são controversos. Alguns autores acreditam que a espécie pode se reproduzir durante todo o ano (Davis, 1966), enquanto outros acreditam, através de dados ecológicos, em um padrão reprodutivo bimodal para a espécie (Myers, 1977; Barquez et al., 1999; Gonzalez, 2001). Assim como outras espécies da família (Gerell e Lundberg, 1985; McCracken e Wilkinson, 2001), *E. furinalis* apresenta um sistema de acasalamento poligínico, com um macho dominante protegendo uma estrutura de harém com diversas fêmeas. Portanto, a captura de machos da espécie é complicada, não apenas pela baixa frequência de machos nas colônias, mas também pela preocupação em não causar maiores distúrbios pela retirada dos machos dominantes. Portanto, esses fatos somados, dificultam a amostragem dos animais.

A amostragem do presente estudo foi de três machos para cada fase reprodutiva testicular, ou seja, fase ativa no mês de Setembro/2013; fase em regressão em Outubro/2013, fase regredida, em Janeiro/2014, e em recrudescência, em Agosto/2014. Portanto, no mês de Setembro, os machos de *E. furinalis* apresentam atividade espermatogênica, enquanto que de Outubro a Janeiro, os testículos se encontram em processo de regressão testicular.

O intervalo de sete meses entre a regressão e a recrudescência testicular (Janeiro a Setembro) permitiu-nos inferir que a espécie provavelmente apresenta dois períodos de regressão testicular ao ano, exibindo, portanto, um padrão bimodal no ciclo reprodutivo, reforçando dados da literatura para esta mesma espécie (Myers, 1977; Barquez et al., 1999; Gonzalez, 2001).

A ocorrência de regressão testicular duas vezes ao ano já foi descrita em outra espécie de vespertilionídeo neotropical, *Myotis nigricans*, a qual é simpátrica com *E.*

furinalis (Beguelini et al., 2013). *Myotis nigricans* apresenta dois picos de atividade espermatogênica no ano, em Abril e em Setembro, apresentando regressão testicular em Novembro e Maio (Beguelini et al., 2013). Com o que foi observado nesse estudo, podemos inferir que o ciclo reprodutivo de *E. furinalis* é similar ao ciclo de *M. nigricans*, uma vez que *E. furinalis* apresenta recrudescência testicular em Agosto, e em Junho/Julho o testículo provavelmente também estaria na fase reprodutiva testicular regredida, somado à fase regredida em Janeiro, como observado nesse estudo.

As médias dos pesos dos testículos e o IGS não apresentaram diferenças significativas entre as fases ativa e em regressão, nem entre as fases regredida e em recrudescência. Entretanto, a fase regredida apresentou valores menores do que a fase em recrudescência, enquanto que fase em regressão apresentou praticamente os mesmos valores da fase ativa. Acreditamos que a ausência de diferença significativa entre essas duas últimas fases e os valores similares das médias ocorreu porque os animais de Janeiro (fase regredida) estavam em um período inicial de recrudescência testicular, enquanto que os animais de Outubro (fase em regressão) estavam em um período inicial de regressão testicular.

O início da regressão dos animais de Outubro se confirma também na área dos túbulos seminíferos, uma vez que todas as fases apresentaram diferença significativa entre elas, exceto entre as fases ativa e em regressão, as quais apresentaram os valores das médias similares. Entretanto, entre as fases ativas e em regressão e a fase regredida, há uma diminuição da área dos túbulos seminíferos, devido à ausência da atividade espermatogênica nos testículos durante a fase regredida. Na fase em recrudescência, podemos observar um aumento da área dos túbulos seminíferos, uma vez que a atividade espermatogênica se reinicia. Além disso, na fase regredida, a porcentagem relativa do tecido intersticial foi maior do que nas outras fases. Portanto, observamos que, no processo de regressão testicular, a área do túbulo seminífero diminui e o tecido intersticial fica abundante, devido à ausência da atividade espermatogênica.

No período em recrudescência, além do aumento da área do túbulo seminífero, e da porcentagem relativa do epitélio e lúmen, a proliferação celular também aumenta significativamente em relação às outras fases, devido ao reinício da atividade espermatogênica, onde há a produção de novos espermatócitos.

A atividade espermatogênica envolve uma complexa série de fatores endócrinos e parácrinos (Walker e Cheng, 2005). O controle hormonal da espermatogênese começa no hipotálamo, com a liberação do Hormônio Liberador de Gonadotropinas (GnRH), o

qual age na hipófise anterior que, por sua vez, libera o Hormônio Luteinizante (LH) e o Hormônio Folículo Estimulante (FSH). O LH age nas células de Leydig, estimulando as mesmas a liberarem os hormônios andrógenos, como a testosterona. A testosterona e o FSH, por sua vez, agem nas células de Sertoli, localizadas dentro dos túbulos seminíferos (Walker e Cheng, 2005). As células de Sertoli são células somáticas cruciais para a manutenção do processo espermatogênico, uma vez que produzem fatores de crescimento e nutrientes que auxiliam no desenvolvimento das células germinativas, além de formar a barreira hematotesticular, fornecendo um ambiente de proteção para as células germinativas (Sharpe, 1994; Griswold, 1998, Mruk e Cheng, 2004).

Em *E. furinalis*, os receptores de LH nas células de Leydig apresentaram maior imunomarcagem nas fases ativas e em recrudescência, indicando que essas células estavam ativas e, conseqüentemente, produzindo testosterona requerida para a atividade espermatogênica presente. Concomitantemente, os receptores de andrógenos (AR) nas células de Sertoli exibiram a maior quantidade de células positivas durante o período de reativação da espermatogênese, seguido da fase reprodutiva ativa do testículo. Como consequência, o processo espermatogênico é mantido, portanto, a imunomarcagem para o PCNA está presente com um número maior de células positivas em ambas as fases, indicando um aumento da divisão celular, sendo maior na fase de recrudescência testicular. Durante o processo de regressão, há uma diminuição/interrupção da imunorreatividade dos receptores de LH, desativando assim a produção de testosterona na célula de Leydig, enquanto que os receptores de andrógenos (AR) apresentam menor imunomarcagem para os receptores de andrógenos nas fases regredida e em regressão. Assim sendo, o processo espermatogênico não é mantido, e a proliferação celular (PCNA) diminui, desencadeando assim, uma regressão no testículo. Portanto, assim como esperado, os receptores de andrógenos são cruciais tanto para o processo espermatogênico (Lindzey et al., 1994, Holdcraft e Braun, 2004), quanto para o processo de reativação da espermatogênese em *E. furinalis*.

De maneira geral, a sazonalidade reprodutiva em alguns mamíferos está relacionada ao fotoperíodo (Bronson, 1989). A relação entre o fotoperíodo e a reprodução está ligada à glândula pineal e seu principal produto, a melatonina. A melatonina interfere na reprodução agindo no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, porém, a forma exata dessa interferência ainda é desconhecida (Reiter, 1991). Alguns autores acreditam que a melatonina diminui a secreção de LH e FSH pela pituitária (Martin e

Sattler, 1982; Lang et al., 1984; Esquifino, Villanúa e Agrasal, 1987), atuando na liberação do GnRH (Maywood et al., 1996; Morgan et al., 1994), enquanto outros acreditam que a melatonina interfere nos receptores de outros hormônios ligados à reprodução (Izzo et al., 2010).

Em morcegos, os efeitos que o fotoperíodo e a melatonina exercem na reprodução de espécies sazonais ainda são controversos (Anthony, 2001). Em algumas espécies, o fotoperíodo parece não afetar a reprodução, como no caso de *Anoura geoffroyi* (Heideman et al., 1992), *Myotis nigricans* (Beguelini et al., 2013), *Pteropus poliocephalus* (O'Brien et al., 1993), *Pteropus rodricensis* (West, 1985; Carroll, 1988), enquanto que em outras, o fotoperíodo afeta a reprodução de machos, induzindo a regressão testicular dos mesmos, como é o caso de *Antrozous pallidus* (Beasley e Zucker, 1984) e *Scotophilus heathii* (Singh e Krishna, 1995). Na espécie *Myotis lucifugus*, receptores de melatonina foram encontrados na *pars tubularis* da hipófise e no núcleo supraquiasmático do hipotálamo (Bittman, 1993), podendo ser uma indicação da interferência da melatonina na reprodução dessa espécie.

Nas espécies de morcegos insetívoros sazonais em que a melatonina aparentemente não exerce influência na regressão das gônadas, acredita-se que o controle reprodutivo está associado a outros fatores abióticos, como a pluviosidade e/ou temperatura, as quais estão intimamente relacionadas à disponibilidade de alimento no ambiente (McWilliam, 1988; Racey e Entwistle, 2001). Portanto, as espécies provavelmente sincronizam a época reprodutiva com a época de abundância de alimentos no ambiente natural, podendo regular indiretamente a atividade espermatogênica de machos, através da sincronia com o período reprodutivo das fêmeas, nas quais o período de parto e lactação está relacionado ao período de abundância de alimento (McWilliam, 1988; Racey e Entwistle, 2001).

Na espécie neotropical *E. furinalis*, a regressão testicular aparentemente está ligada ao controle hormonal de andrógenos, sendo este controle exercido através da atividade dos receptores de andrógenos nas células de Sertoli e do hormônio luteinizante nas células de Leydig. Os fatores que regulam esse controle hormonal da regressão testicular na espécie ainda são desconhecidos, porém na espécie simpátrica *M. nigricans*, o fotoperíodo parece não afetar a regressão testicular, e os autores acreditam que o processo da regressão testicular ocorre em sincronia com o ciclo reprodutivo das fêmeas (Beguelini et al., 2013).

5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que o processo de regressão testicular de *Eptesicus furinalis* está submetido ao controle dos hormônios hipofisários, principalmente o LH, e de andrógenos, sendo que este controle é exercido através da ativação dos receptores de andrógenos nas células de Sertoli e dos receptores de hormônio luteinizante nas células de Leydig. Assim, na fase de regressão testicular a imunomarcagem de LHR e AR tendem a diminuir ou cessar, o que causa a desativação da espermatogênese, e por outro lado, em recrudescência testicular ocorre uma massiva imunomarcagem de LHR e AR, os quais reativam a espermatogênese.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o suporte técnico fornecido por Luiz Roberto Falleiros Junior e a ajuda nas coletas dos animais por Manuela Tosi Comelis. Agradecemos a bolsa de estudos concedida a Larissa Mayumi Bueno pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, L.M., Antonini, Y., 2011. Descriptive ecology of bat flies (Diptera: Hippoboscoidea) associated with vampire bats (Chiroptera: Phyllostomidae) in the cerrado of Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 106(2), 170-176.
- Anand-Kumar, T.C., 1965. Reproduction in the rat-tailed bat *Rhinopoma kinneari*. *J Zool*. 147, 147-155.
- Anthony, E.L.P., 2000. Endocrinology of Reproduction in Bats: Central Control. In: Crichton e Krutzsch (Eds.). *Reproductive biology of bats*. Academic Press, London, 1-22.
- Araújo, R.A., Amaro, B.D., Talamoni, S.A., Godinho, H.P., 2013. Seasonal reproduction of yellowish myotis, *Myotis levis* (Chiroptera: Vespertilionidae), from a Neotropical highland. *J Morphol*. 274(11), 1230-1238.
- Barquez, R.M., Mares, M.A., BRAUN, J.K. The Bats of Argentina. *Spec Publ Tex Tech Univ Mus, Lubbock*. 42, 1-275, 1999.
- Beasley, L.J., Pelz, K.M., Zucker, I., 1984. Circannual rhythms of body weight in pallid bats. *Am J Physiol*. 246(6), 955-958.

Beguelini, M.R., Moreira, P.R.L., Faria, K.C., Marchesin, S.R.C., Morielle-Versute, E., 2009. Morphological Characterization of the Testicular Cells and Seminiferous Epithelium Cycle in Six Species of Neotropical Bats. *J Morph.* 270, 943-953.

Beguelini, M.R., Góes, R.M., Taboga, S.R., Morielle-Versute, E., 2013. Two periods of total testicular regression are peculiar events of the annual reproductive cycle of the black Myotis bat, *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Reprod Fertil Dev.* 26(6), 834-846.

Bittman, E.L., 1993. The sites and consequences of melatonin binding in mammals. *Amer Zool.* 33, 200-211

Bronson, F.H., 1988. Mammalian reproductive strategies: genes, photoperiod and latitude. *Reprod Nutr Develop.* 28(2B), 335-347.

Bronson, F.H., 1989. Mammalian reproductive biology. University Chicago Press, Chicago.

Bueno, L.M., Beguelini, M.R., Comelis, M.T., Taboga, S.R., Morielle-Versute, E., 2014. Ultrastructure of spermatogenesis, spermatozoon and processes of testicular regression and recrudescence in *Eptesicus furinalis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Anim Reprod Sci.* 148, 228-244.

Carroll, J.B., 1988. Conservation programme for the Rodrigues fruit bat, *Pteropus rodricensis*. In *Proceedings of the 5th World Conference on Breeding Endangered Species in Captivity*, Cincinnati, Ohio. 457-475.

Crichton, E.G., Krutzsch, P.H., 2000. Reproductive biology of bats. Academic Press, London, United Kingdom.

Dadhich, R.K., Real, F.M., Zurita, F., Barrionuevo, F.J., Burgos, M., Jiménez, R., 2010. Role of apoptosis and cell proliferation in the testicular dynamics of seasonal breeding mammals: a study in the Iberian mole, *Talpa occidentalis*. *Biol Reprod.* 83(1), 83-91.

Davis, W.B., Gardner, A.L., 2007. Genus *Eptesicus* Rafinesque, In: Gardner, A.L. (Ed.) *Mammals of South America, Volume 1, Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats*. The University of Chicago Press. 440-450.

Davis, W., 1966. Review of South American bats of the genus *Eptesicus*. *Southwest. Nat.* 11, 245-274.

De Knegt, L.V., Silva, J.A., Moreira, E.C., Sales, G.L., 2005. Morcegos capturados no município de Belo Horizonte, 1999-2003. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 57, 576-583.

Encarnação, J.A., Dietz, M., Kierdorf, U., 2004. Reproductive condition and activity pattern of male Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*) in the summer habitat. *Mamm Biol.* 69, 163-172.

Esquifino, A.I., Villanúa, M.A., Agrasal, C., 1987. Effect of neonatal melatonin administration on sexual development in the rat. *J Steroid Biochem.* 27(4-6), 1089-1093.

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.

Gerell, R., Lundberg, K., 1985. Social organization in the bat *Pipistrellus pipistrellus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 16, 177-184.

Gobbo, M.G., Taboga, S.R., Ribeiro, D.L., Goes, R.M., 2012. Short-term stromal alterations in the rat ventral prostate following alloxan-induced diabetes and the influence of insulin replacement. *Micron.* 4, 326-333.

González, E.M., 2001. Guía de Campo de los Mamíferos de Uruguay. Montevideo: Vida Silvestre, Sociedade Uruguaya para la Conservación de la Naturaleza.

Gopalakrishna, A., 1948. Studies on the embryology of microchiroptera. Part II. Reproduction in the male vespertilionida bat *Scotophilus wroughtoni* (Thomas). *Proceed. Indian Acad. Sci. B.* 27, 137-151.

Griswold, M.D., 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 9(4), 411-416.

Gustafson, A.W., 1979. Male reproductive patterns in hibernating bats. *J Reprod Fertil.* 56(1), 317-331.

Heideman, P.D., Deoraj, P., Bronson, F.H., 1992. Seasonal reproduction of a tropical bat, *Anoura geoffroyi*, in relation to photoperiod. *J Reprod Fertil.* 96(2), 765-773.

Hess, R.A., 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reprod Biol Endocrinol.* 1(52).

Holdcraft, R.W., Braun, R.E., 2004. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl.* 27, 335-342.

Izzo, G., Francesco, A., Ferrara, D., Campitiello, M.R., Serino, I., Minucci, S., d'Istria, M., 2010. Expression of melatonin (MT1, MT2) and melatonin-related receptors in the adult rat testes and during development. *Zygote.* 18(3), 257-264.

Jolly, S.E., Blackshaw, A.W., 1988. Testicular migration, spermatogenesis, temperature regulation and environment of the sheath-tail bat, *Taphozous georgianus*. J Reprod Fertil. 84, 447-455.

Kawamoto, K., 2003. Endocrine control of the reproductive activity in hibernating bats. Zool Sci. 20, 1057-1069.

Krishna, A., Bhatnagar, K.P., 2010. Hormones and Reproductive Cycles in Bats. In: Hormones and Reproduction of Vertebrates, Vol. 5: Mammals. Norris, D.O., Lopez, K.H. (Eds). Academic Press.

Krishna, A., Singh, K., 1997. The relationship between testicular activity, accessory sex glands, and circulating steroid concentration during the reproductive cycle in a male Indian vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. Can J Zool. 75, 1042-1050.

Krutzsch, P.H., 1979. Male reproductive patterns in nonhibernating bats. J Reprod Fertil. 56, 333-344.

Kunz T.H., Anthony, E.L.P., 1982. Age estimation and post-natal growth in the bat *Myotis lucifugus*. J. Mammal. 63, 23-32.

Lang, U., Aubert, M.L., Rivest, R.W., Vinas-Bradtke, J.C., Sizonenko, P.C., 1984. Daily afternoon administration of melatonin does not irreversibly inhibit sexual maturation in the male rat. Endocrinology. 115(6), 2303-2310.

León-galván, M.A., López-Wilchis, R., Hernández-Pérez, O., Arenas-Ríos, E., Rosado, A., 2005. Male reproductive cycle of Mexican big-eared bats, *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). Southwest Nature. 50(4), 453-460.

Lindzey, J., Kumar, M.V., Grossman, M., Young, C., Tindall, D.J., 1994. Molecular mechanisms of androgen action. Vitam Horm. 49, 383-432.

Martin, J.E., Sattler, C., 1982. Selectivity of melatonin pituitary inhibition for luteinizing hormone-releasing hormone. Neuroendocrinology. 34(2), 112-116.

Maywood, E.S., Bittman, E.L., Hastings, M.H., 1996. Lesions of the melatonin and androgen responsive tissue of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus block the gonadal response of male Syrian hamsters to programmed infusions of melatonin. Biol Reprod. 54(2), 470-477.

McCracken, G.F., Wilkinson, G.S., 2001. Reproductive Biology of Bats. In: Crichton, E.G., Krutzsch, P.H (Eds.). Academic Press, 321-357.

- McWilliam, A.N., 1988. The reproductive cycle of male longfingered bats, *Miniopterus minor* (Chiroptera: Vespertilionidae), in a seasonal environment of the African tropics. J Zool (Lond). 216, 119-129.
- Mies, R., Kurta, A.; King, D.G., 1996. *Eptesicus furinalis*. Mamm Species. 526, 1-7.
- Morgan, P.J., Barrett, P., Howell, H.E., Helliwell, R. 1994. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. Neurochem Int. 24, 101-146.
- Mruk, D.D., Cheng, C.Y., 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. Endocr Rev. 25(5), 747-806.
- Myers, P., 1977. Patterns of reproduction of four species of vespertilionid bats in Paraguay. Univ Calif Publ Zool. 107, 1-41.
- O'Brien, G.M., Curlewis, J.D., Martin, L., 1991. Unusual reproductive photoresponsiveness of male greyheaded flying foxes (*Pteropus poliocephalus*). P Aust Soc Reprod Bio. 23, 160.
- O'Donnell, L., Robertson, K.M., Jones, M.E., Simpson, E.R., 2001. Estrogen and spermatogenesis. Endocr Rev. 22, 289-318.
- Onyango, D.W., Gachoka, G.E., Otianga'a-Owiti, G.E., Hendrickx, A.G., 1995. Seasonally dependent testicular apoptosis in the tropical Long-fingered bat (*Miniopterus inflatus*). Z. für Säugetierkunde, Internat J Mammal Biol. 60, 206-214.
- Racey, P.A., Entwistle, A.C., 2000. Life-history and reproductive strategies of bats. In: Reproductive Biology of Bats, Crichton, E.G., Krutzsch, P. H. (Eds.). Academic Press: London. 363-414.
- Racey, P.A., 1974. The reproductive cycle in male noctule bats, *Nyctalus noctula*. J Reprod Fertil. 41, 169-182.
- Racey, P.A., 1979. The prolonged storage and survival of spermatozoa in Chiroptera. J Reprod Fertil. 56, 391-402.
- Rasweiler IV, J.J., 1993. Pregnancy in Chiroptera. J Exp Zool. 266, 495-513.
- Reiter, R.J., 1991. Pineal gland: Interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. Trends Endocrinol Metab. 2, 13-19.

- Sharifi, M., Ghorbani, R., Akmal, V., 2004. Reproductive cycle in *Pipistrellus kuhlii* (Chiroptera, Vespertilionidae) in western Iran. *Mammalia*. 68, 323-327.
- Sharpe, R.M., 1994. Regulation of Spermatogenesis. In: The Physiology of Reproduction, Knobil, E., Neill, J.D. (Eds). Raven Press, New York.
- Simmons, N.B., 2005. Order Chiroptera. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds). *Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Baltimore: Johns Hopkins University Press. 312-529.
- Singh, U.P., Krishna, A., 2000. Seasonal Changes in Circulating Testosterone and Androstenedione Concentration and Their Correlation with the Anomalous Reproductive Pattern in the Male Indian Sheath-Tailed Bat, *Taphozous longimanus*. *J Exp Zool*. 287, 54-61.
- Taddei, V.A., 1976. The reproduction of some Phyllostomidae (Chiroptera) from the northwestern region of the State of São Paulo. *Bol Zool Universidade de São Paulo*. 1, 313-330.
- 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(2), 537-42.
- Van der Merwe, M., Rautenbach, I.L., 1987. Reproduction in Schlieffen's bat *Nycticeius* in the eastern Transvaal lowveld, South Africa. *J Reprod Fertil*. 81, 41-50.
- Walker, W.H., Cheng, J., 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*. 130, 15-28.
- Weibel, E.R., 1978. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest*. 12, 131-155.
- West, C.C., 1985. Reproductive biology of *Pteropus rodricensis*. *Myotis*, 23/24, 137-141.
- Wickler, W., Seibt, U., 1976. Field studies on the African fruit bat *Epomophorus walhbergi* (Sunderall) with special reference to male calling. *Zeitschrift für Tierpsychologie*. 40, 345-376.
- Zhang, L., Han, X.K., Qi, Y.Y., Liu, Y., Chen, Q.S., 2008. Seasonal effects on apoptosis and proliferation of germ cells in the testes of the Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*. *Theriogenology*. 69, 1148-1158.

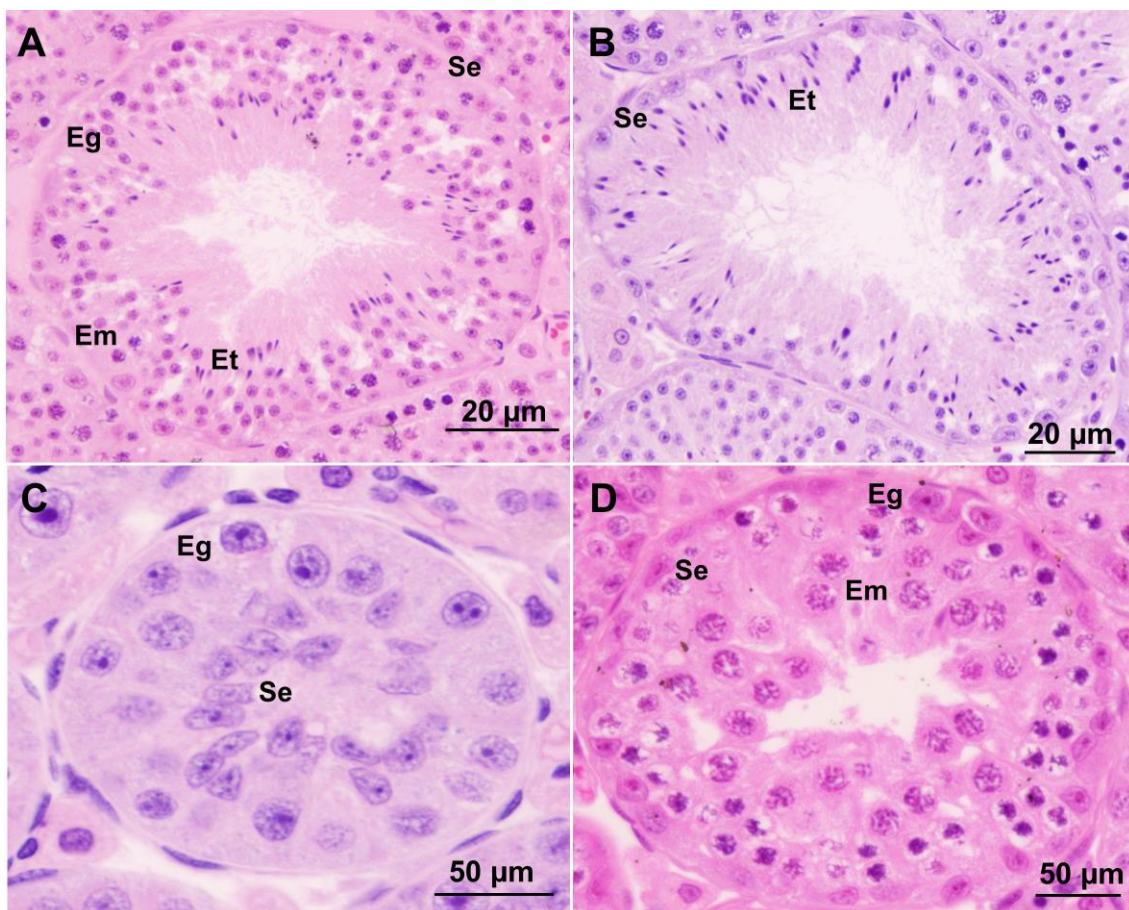


Figura 1. Cortes transversais dos túbulos seminíferos de *Eptesicus furinalis* demonstrando a atividade espermatogênica nas quatro diferentes fases da regressão testicular. **A.** Fase ativa, onde toda a linhagem espermatogênia está presente. **B.** Fase em regressão, onde não há a produção de novos espermatócitos. **C.** Fase regredida, em que não há atividade espermatogênica. **D.** Fase de recrudescência, onde há a retomada da atividade espermatogênica. (Se = Célula de Sertoli; Eg = Espermatogônia; Em = Espermatócito; Et = Espermátide). Coloração em Hematoxilina-Eosina.

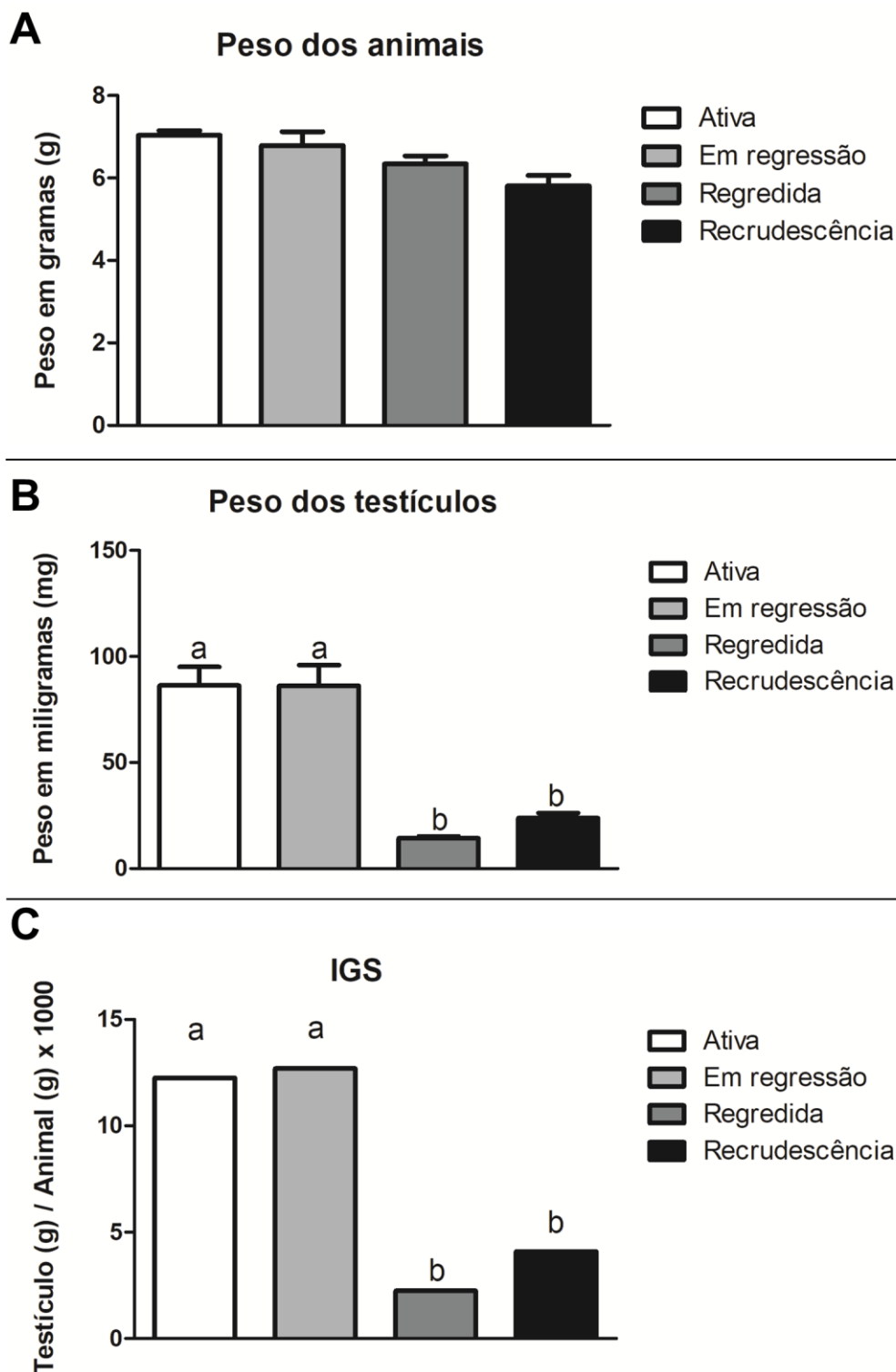


Figura 2. Média dos pesos corporais e testiculares e índice gonadosomático nas quatro diferentes fases da regressão testicular de *Eptesicus furinalis*: ativa, em regressão, regredida e recrudescência. A. Peso corporal. B. Peso dos testículos. C. Índice Gonadosomático (IGS). ^{a,b} Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

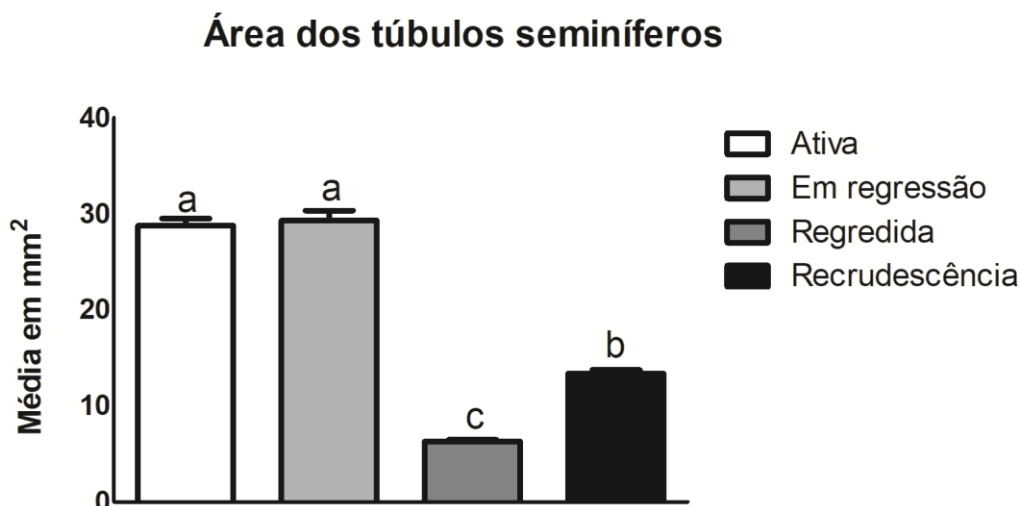


Figura 3. Média da área dos túbulos seminíferos nas diferentes fases da regressão testicular: fase ativa, fase em regressão, fase regredida e fase de recrudescência. ^{a,b,c} Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

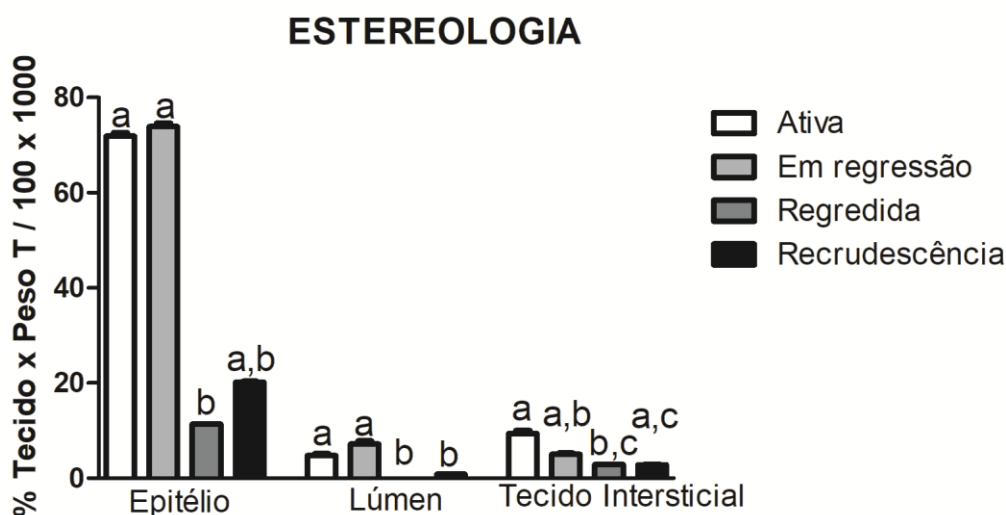


Figura 4. Porcentagem relativa do epitélio, lúmen e estroma nas diferentes fases reprodutivas testiculares de *Eptesicus furinalis*: ativa, em regressão, regredida e em recrudescência. Note-se que o epitélio nas fases ativa e regredindo possui os maiores valores percentuais, relativo às outras fases. O lúmen na fase regredida apresentou a porcentagem relativa próxima de zero. ^{a,b,c} Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

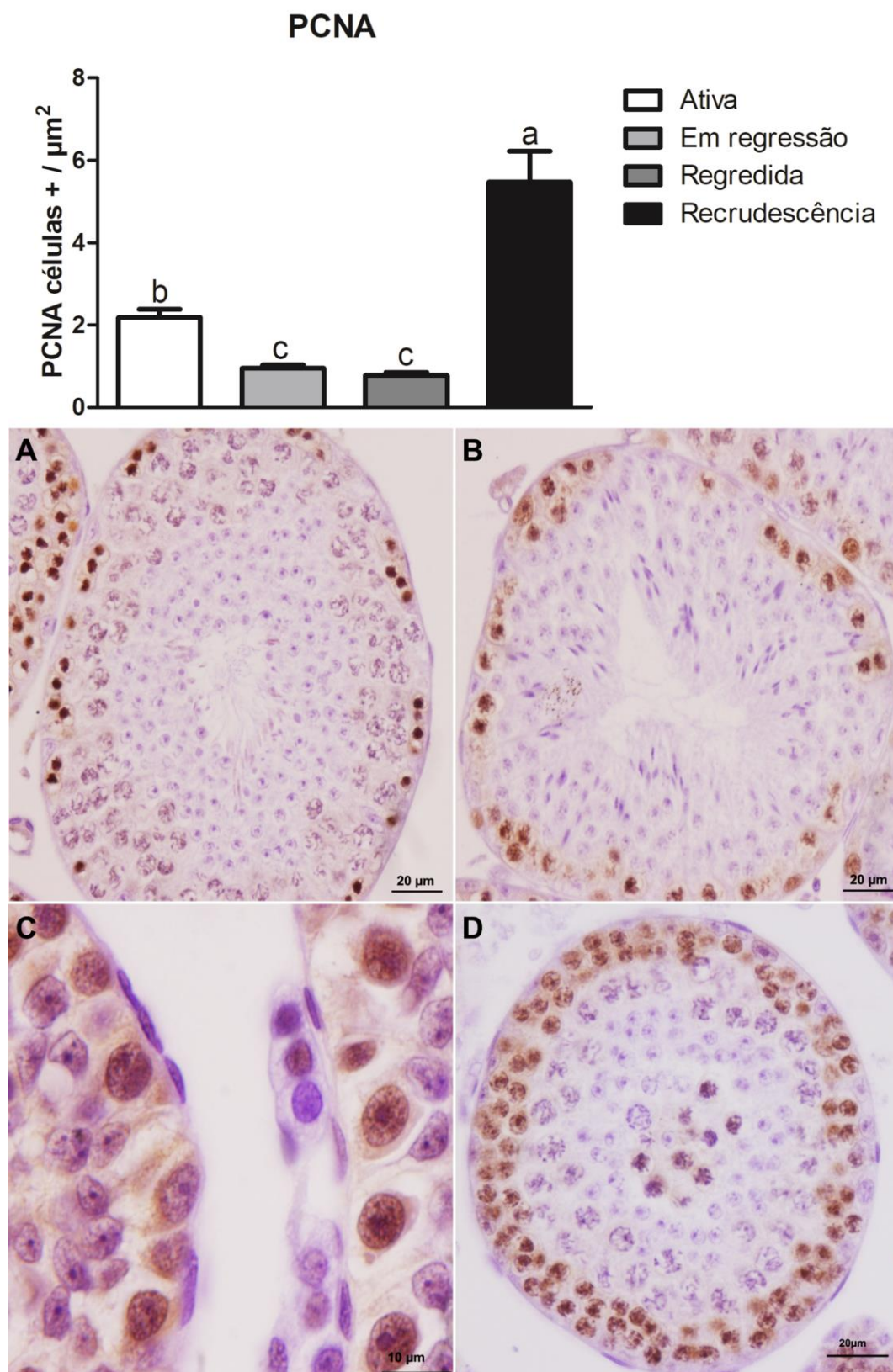


Figura 5. Índice da porcentagem de marcação positiva e imagens da proliferação celular (PCNA) do testículo de *Eptesicus furinalis* nas diferentes fases da regressão testicular: **A.** Fase ativa, **B.** Fase em regressão **C.** Fase regredida e **D.** Fase em recrudescência. É possível notar que a fase em recrudescência foi a que apresentou a maior quantidade de proliferação celular. ^{a,b,c} Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

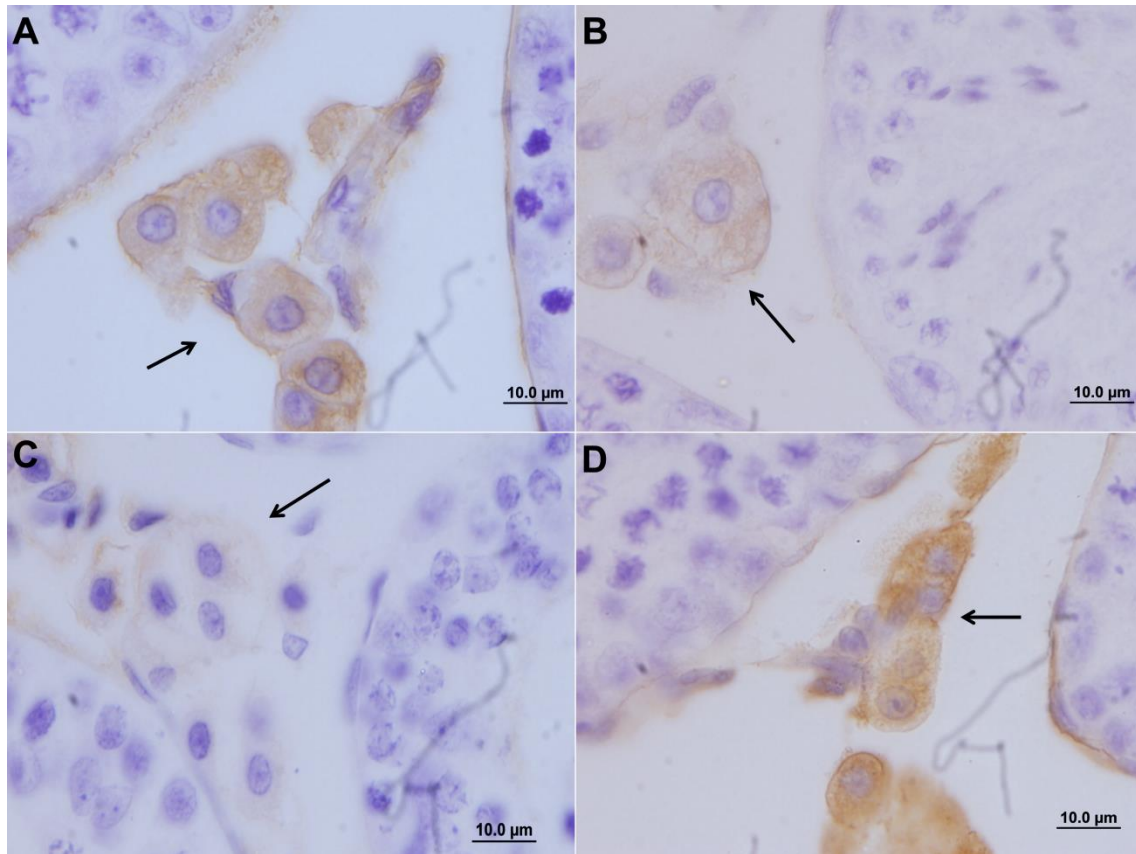


Figura 6. Padrão de expressão dos receptores de hormônio luteinizante (LHR) nas células de Leydig (setas) de *Eptesicus furinalis*, nas diferentes fases da regressão testicular. **A.** Fase ativa. **B.** Fase em regressão. **C.** Fase regredida. **D.** Fase em recrudescência. É possível notar uma intensidade decrescente de marcação positiva entre as fases ativa, em regressão e regredida, enquanto que na fase em recrudescência, a intensidade de marcação positiva é similar à fase ativa.

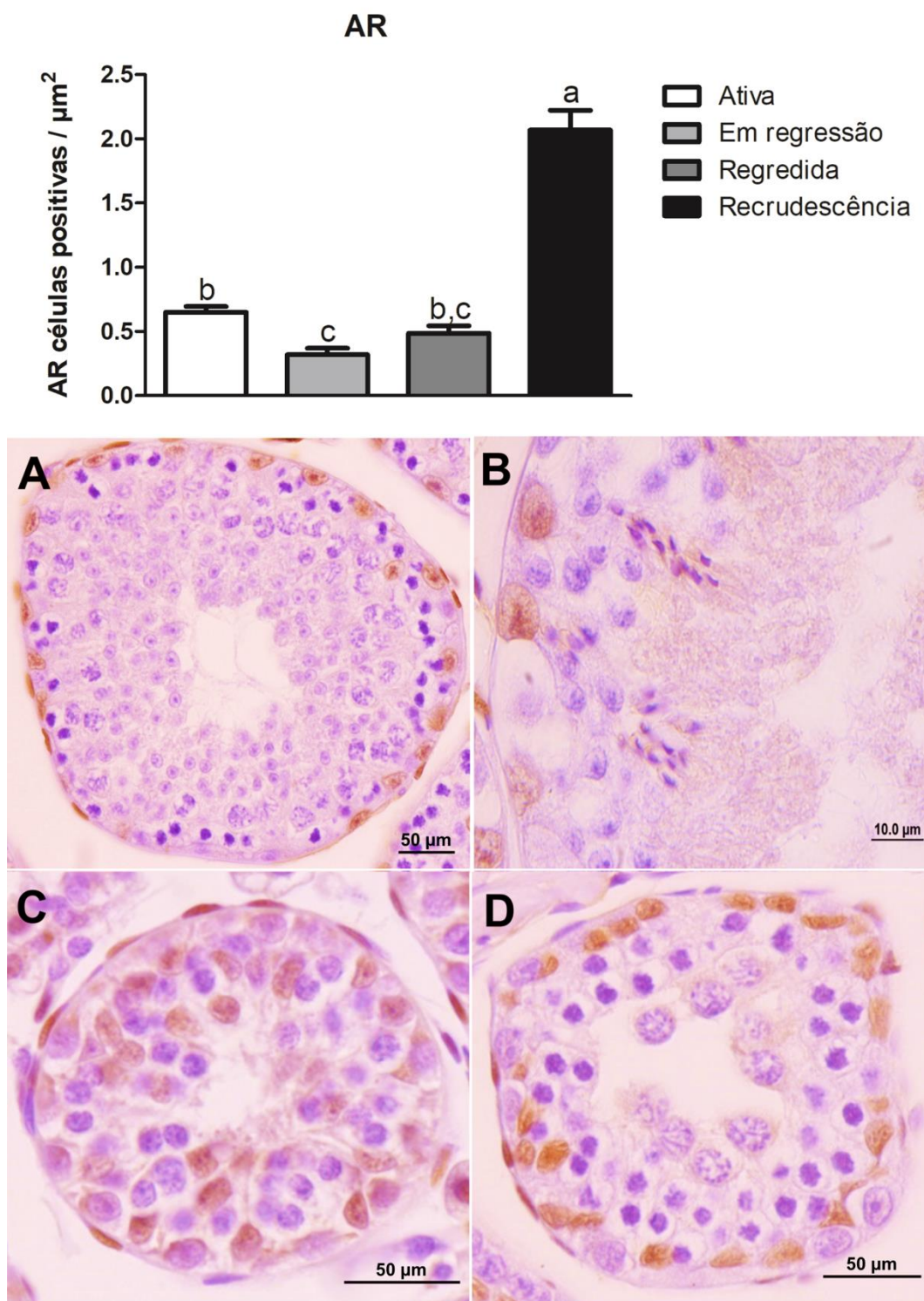


Figura 7. Índice da porcentagem de marcação positiva e imagens da marcação positiva para os receptores de andrógenos (AR) por μm^2 do testículo de *Eptesicus furinalis* entre as diferentes fases reprodutivas testiculares: fase ativa (**A**), fase em regressão (**B**), fase regredida (**C**) e fase em recrudescência (**D**). É possível notar que a fase em recrudescência foi a que apresentou a maior quantidade de receptores de andrógenos. ^{a,b,c} Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

Capítulo 2

Morfologia do epidídimo de *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae: Chiroptera) durante o processo de regressão testicular

Artigo a ser submetido para publicação na revista “Journal of Morphology”

Morfologia do epidídimo de *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae: Chiroptera) durante o processo de regressão testicular

Larissa Mayumi Bueno^a, Fernando Henrique Cornacini^a, Mateus Rodrigues Beguelini^b, Sebastião Roberto Taboga^c, Eliana Morielle-Versute^a.

^a Departamento de Zoologia e Botânica, UNESP – Univ. Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil;

^b Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, UFOB – Univ. Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, Bahia, Brasil.

^c Departamento de Biologia, UNESP – Univ. Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil;

*Autor Correspondente: morielle@ibilce.unesp.br (E. Morielle-Versute).

RESUMO

Eptesicus furinalis é um morcego neotropical que apresenta um processo de regressão testicular durante seu ciclo reprodutivo anual, no qual é possível notar quatro fases reprodutivas testiculares distintas, a fase ativa, fase em regressão, fase regredida e fase de recrudescência. O epidídimo é parte importante no sucesso reprodutivo das espécies de morcegos, especialmente porque tem as funções de maturação e armazenamento de espermatozoides. Entretanto, nenhuma investigação na morfologia do epidídimo durante o processo de regressão testicular foi realizada para a espécie. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar a morfologia do epidídimo de *E. furinalis* nas quatro fases do processo de regressão testicular. As análises foram feitas em 15 machos adultos representantes das diferentes fases reprodutivas testiculares. O epidídimo é dividido em cabeça, corpo e cauda, e o epitélio é composto por células principais, basais, apicais, halo, claras e estreitas. As análises morfométricas mostraram que a altura do epitélio e a proporção relativa do epitélio, lúmen e estroma do epidídimo variam de acordo com a região e com a fase reprodutiva testicular, com o epitélio apresentando maiores médias de altura e porcentagem relativa de tecido durante a fase ativa, enquanto que o lúmen e o estroma apresentaram maiores valores da porcentagem relativa de tecido durante a fase regredida.

Palavras-chave: regressão testicular, epidídimo, morfologia, *Eptesicus furinalis*.

1. INTRODUÇÃO

Os morcegos, pertencentes à segunda maior ordem de mamíferos, possuem a maior diversidade de estratégias reprodutivas dentro de Mammalia (Crichton e Kruttsch, 2000). Espécies de morcegos de regiões temperadas e regiões tropicais podem diferir nas estratégias reprodutivas, sendo que essas diferenças estão principalmente relacionadas ao clima e hábitat em que as espécies vivem (Fleming et al., 1972; Gustafson, 1979; Kruttsch, 1979). Entretanto, morcegos que habitam tanto as regiões tropicais, quanto as regiões temperadas, podem apresentar estratégias reprodutivas similares, como um processo de regressão testicular, em que a atividade espermatogênica é interrompida temporariamente em períodos específicos do ano (Gustafson, 1979; Begueliniet al., 2015; Bueno et al., 2014), e também, o armazenamento de espermatozoides na cauda do epidídimo, muitas vezes por períodos de mais de três meses (Crichton, 2000).

O epidídimo nos mamíferos geralmente é dividido em três regiões, a cabeça, o corpo e a cauda, e seu epitélio é composto por distintos tipos celulares (Robaire et al., 2006). As diferentes regiões do epidídimo e a composição do seu epitélio estão relacionadas, principalmente, com as funções do órgão, tais como a maturação, motilidade e armazenamento dos espermatozoides (Arrotéia et al., 2012).

O local de armazenamento dos espermatozoides varia entre diferentes táxons, porém, nos morcegos, ele geralmente ocorre na cauda do epidídimo, pois essa região possui características que favorecem o armazenamento de espermatozoides, como ser a porção mais alongada do epidídimo e possuir uma posição permanente perante a região escrotal (Jones, 2004; Begueliniet al., 2010, 2015). Além disso, nos epidídimos são encontrados microambientes formados por diferentes secreções do epitélio, e que por meio da absorção de restos celulares, da síntese de novas proteínas e de atividades metabólicas que acontecem nesses microambientes promovem a maturação do espermatozoide, tornando-se então capazes de fertilizar o ovócito (Jones, 2004).

As espécies de morcegos neotropicais *Eptesicus furinalis* (d'Orbigny e Gervais, 1847) e *Myotis nigricans* apresentam um processo de regressão testicular durante o seu ciclo reprodutivo anual (Bueno et al., 2014; Beguelini et al., 2015). Em *M. nigricans* esse processo, que é influenciado diretamente pela expressão de 17 beta hidroxisteroide desidrogenase (17 β -HSD), parece produzir algum efeito ou influenciar a morfofisiologia das células do epidídimo, bem como o funcionamento do mesmo (Beguelini et al., 2015). Para a espécie *E. furinalis* não há ainda nenhuma descrição

sobre a morfologia do epidídimo em si e nem sobre a influência da regressão testicular sobre a morfologia do mesmo. Portanto, nosso objetivo foi descrever a morfologia geral do epidídimo de *E. furinalis*, bem como as células constituintes de seu epitélio nas três regiões do epidídimo e nas quatro diferentes fases da regressão testicular na espécie.

2. METODOLOGIA

A. Espécie e coletados espécimes

Eptesicus furinalis não está listada como em ameaçada de extinção pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN - Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas). Os espécimes foram obtidos em coletas realizadas na região da cidade de São José do Rio Preto (20°49'12" S 49°22'44" O), São Paulo - Brasil, no período de 2009 a 2014, com Autorização do IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente - Processo: 21707-1; Sisbio: 59765825-13/04/2010), e todos os procedimentos foram autorizados pela Comissão de Ética no uso de Animais do IBILCE/UNESP (Processo nº 102/2014-CEUA).

Foram analisados 15 machos adultos, representando 04 machos na fase testicular ativa (Setembro/13), 04 machos na fase testicular em regressão (Maio/09 e Outubro/2013), 04 machos na fase testicular regredida (Maio/09 e Janeiro/2014) e 03 machos na fase testicular de recrudescência (Agosto/2014). A classificação da fase da regressão testicular seguiu Bueno et al. (2014). Os animais foram identificados de acordo com Bianconi e Pedro (2007) e a condição adulta verificada por meio do corporal, completa ossificação das epífises e o grau de desgaste dentário (Kunz e Anthony, 1982; de Kneget et al., 2005), bem como a presença de espermatozoides no epidídimo (Beguelini et al., 2015).

B. Obtenção, preparação e análises das amostras

Como padronização, na manhã seguinte à coleta, os animais foram pesados e, em seguida, anestesiados com uma mistura de ketamina e xilazina (0,08 ml de ketamina mais 0,02 ml de xilazina, aplicados 0,1 ml para cada 50 g de peso corporal do animal). Assim que a cavidade abdominal foi exposta, os testículos e epidídimos foram fotografados com estereomicroscópio Leica MZ16 acoplado com câmera digital Leica DFC295 e com auxílio do software Leica Application Suite – LAS, Versão 3.8. Posteriormente os testículos e epidídimos foram removidos cuidadosamente, pesados e

imersos em solução fixadora de metanol: clorofórmio: ácido acético (6:3:1) durante três horas a 4°C, desidratados em série graduada de etanol e incluídos em parafina. Após a retirada dos órgãos, os animais foram fixados em formol a 10% e depositados na Coleção de Chiroptera DZSJRP do IBILCE-UNESP.

O material foi seccionado em micrótomo rotativo, na espessura de 5µm, disposto sobre lâmina de vidro e então submetido à coloração de hematoxilina-eosina, azul de toluidina (Ribeiro e Lima), Masson Tushman's Blue (Delbès et al., 2004) e PAS – Periodic Acid-Schiff contracorado com hematoxilina (Behmer et al. 1976).

Após as colorações, as lâminas foram analisadas para a caracterização dos órgãos quanto ao arranjo e constituição dos compartimentos, e os resultados foram fotodocumentados em fotomicroscópio Zeiss-AxioImagerA2 com analisador de imagens Axiovision Rel. 4.8 e Scanner de imagens Olympus BX-VCB, com analisador de imagem VS-ASW.

C. Análise morfológica, morfométrica e estereológica

De cada animal foram medidas a altura do epitélio e a porcentagem relativa de compartimentos do epidídimo, ou seja, epitélio, lúmen e estroma (espaço peritubular), para cada região do epidídimo (cabeça, corpo e cauda). A identificação dos tipos celulares foi feita com base em Robaire et al., 2006.

A altura do epitélio foi avaliada usando o software para análise de imagens, Image-Pro-Plus, versão 6.0 (© Media Cybernetics) para Windows®, utilizando 540 seções transversais dos túbulos por animal a 400x.

As porcentagens relativas de epitélio, lúmen e estroma foram estimadas usando o software Image-Pro-Plus, versão 6.0 (© Media Cybernetics) para Windows®. A coleta dos dados para as avaliações estereológicas foi realizada no Sistema-Teste de arranjo triangular M42, segundo Weibele et al. (1978), com 130 pontos no sistema. Para esta análise, 60 campos a 200x de lâminas coradas em hematoxilina-eosina foram aleatoriamente selecionados para cada animal, sendo 20 campos para cada região do epidídimo, totalizando 720 campos de lâmina fotodocumentados e analisados. A frequência relativa foi calculada de acordo com os pontos do Sistema-Teste que tocam os componentes analisados, ou seja, epitélio, lúmen e estroma. A partir dos dados obtidos para cada campo analisado, foi realizado o cálculo da frequência relativa de cada compartimento.

D. Análises Estatísticas

Os valores das medidas e frequência relativa dos compartimentos foram expressos pelas médias e erro padrão, a normalidade foi verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov e as diferenças entre as regiões foram calculadas pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn para múltiplas comparações. Foi utilizado o valor de $p \leq 0,05$ para a diferença significativa entre os grupos. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o uso do software Prisma versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA, www.graphpad.com).

3. RESULTADOS

A. Análise Morfológica

Os epidídimos de *E. furinalis* estão situados anexos aos testículos, e podem ser anatomicamente divididos em três regiões distintas: cabeça, corpo e a cauda (**Figura 1A e 1B**). A posição anatômica dos testículos e epidídimos é permanentemente fora da cavidade abdominal (permanentemente escrotado), e é mantida pela presença de um ligamento suspenso de tecido conectivo que liga e mantém o prolongamento da cauda do epidídimo justaposta às vértebras caudais anteriores do animal (**Figura 1B**).

Histologicamente, o epidídimo consiste em um longo túbulo enovelado no qual se reconhece as três regiões correspondentes às regiões anatômicas, a cabeça, o corpo e a cauda (**Figura 2A e 2B**), sendo que cada região é subdividida em lóbulos por septos de tecido conjuntivo (**Figura 2C**). O túbulo é composto por um epitélio pseudoestratificado e pelo lúmen, e as células do epitélio podem conter estereocílios (**Figura 3B**) em direção ao lúmen.

Foram identificados seis tipos celulares compondo o epitélio do epidídimo, as células principais, apicais, basais, estreitas, halo e claras, além das células mióides circundando o túbulo (**Figura 3A**), porém os detalhes da morfologia de cada tipo celular foram restritos às técnicas de microscopia de luz. As células principais possuem o formato colunar, se estendendo da região da lâmina basal até ao lúmen, apresentando um núcleo arredondado localizado na região basal da célula, com um ou dois nucléolos e alguns pontos de heterocromatina (**Figura 3A**). O citoplasma apresenta a região apical mais fracamente corada na coloração por azul de toluidina (**Figura 3B**), e uma reação positiva para o PAS no citoplasma e na região dos estereocílios (**Figura 3C**). As células apicais estão localizadas na região apical do epitélio, próximas ao lúmen, e o contato

com a membrana basal não é visível na microscopia de luz. O núcleo possui formato redondo, com pontos de heterocromatina e um nucléolo bem evidente (**Figura 3D**). O citoplasma apresentou-se fracamente corado pelo azul de toluidina (**Figura 3B**), e nenhuma reação positiva para o PAS (**Figura 3C**).

As células basais estão localizadas na região basal do epitélio, adjacente à membrana basal, sem se estender até o lúmen. O núcleo é alongado com um nucléolo evidente e alguns pontos de heterocromatina (**Figura 3A**). Na coloração por azul de toluidina, o citoplasma aparece fracamente corado (**Figura 3B**) e nenhuma reação positiva para o PAS foi observada (**Figura 3C**). As células halo ficam localizadas adjacentes à lâmina basal. Possuem o núcleo com formato irregular e fortemente corado, enquanto que o citoplasma é fracamente corado. Nenhuma projeção citoplasmática foi observada com a microscopia de luz (**Figura 4A e 4B**). As células claras se estendem da lâmina basal até o lúmen e, quando presentes, intercalam as células principais. Seu citoplasma é claro, com um núcleo arredondado situado na porção mediana do epitélio, e apresenta pontos de cromatina condensada na região periférica e nucléolo bem evidente (**Figuras 4C e 4D**). As células estreitas são células com formato alongado e, quando presentes, intercalam as células principais. O núcleo é alongado e fica mais próximo à região apical da célula, possuindo um nucléolo evidente (**Figura 4E e 4F**).

B. Análise Morfométrica

B1. Altura do Epitélio

A região da cabeça (**Figura 5A**) apresentou a maior média da altura do epitélio na fase reprodutiva testicular ativa, com $23,74 \mu\text{m} \pm 0,59$, seguido das fases reprodutivas em regressão e em recrudescência, com $20,19 \mu\text{m} \pm 1,22$ e $16,33 \mu\text{m} \pm 0,51$, respectivamente, enquanto que a fase regredida apresentou um decréscimo significativo, com média de $9,691 \mu\text{m} \pm 0,3465$. Semelhante à região da cabeça, o corpo (**Figura 5B**) apresentou a maior média da altura do epitélio na fase ativa, com média de $21,78 \mu\text{m} \pm 0,38$, seguida pelas fases em regressão e em recrudescência, com $17,62 \mu\text{m} \pm 0,53$ e $15,41 \mu\text{m} \pm 0,48$, respectivamente, enquanto que a fase regredida apresentou uma média de $8,15 \mu\text{m} \pm 0,31$. Por fim, na região da cauda (**Figura 5C**), as fases de recrudescência, ativa e em regressão não apresentaram uma diferença significativa na altura do epitélio, apresentando médias de $13,58 \mu\text{m} \pm 0,64$; $12,57 \mu\text{m} \pm 0,89$ e $12,12$

$\mu\text{m} \pm 0,57$, respectivamente. Entretanto, a fase regredida apresentou um decréscimo significativo, com média de $8,96 \mu\text{m} \pm 0,32$.

B2. Frequência dos Compartimentos do Epidídimo

B.2.1. Epitélio

A frequência relativa do compartimento epitelial (**Figura 5D**) apresentou correspondência com as médias da altura do epitélio na região da cabeça, sendo que a fase reprodutiva testicular ativa exibiu a maior proporção de epitélio ($68,04 \% \pm 0,65$), seguida pelas fases em regressão e em recrudescência ($56,89 \% \pm 1,80$ e $54,74 \% \pm 1,70$, respectivamente). Já na fase regredida, houve um decréscimo significativo, com uma proporção média de $40,53 \% \pm 1,38$. Na região do corpo do epidídimo (**Figura 5E**), as fases ativa e em regressão apresentaram valores similares ($57,63 \% \pm 1,07$ e $56,45 \% \pm 1,03$, respectivamente); enquanto que na fase de recrudescência, houve um decréscimo para $44,74 \% \pm 1,29$ e, na fase regredida, houve um decréscimo significativo para $24,53 \% \pm 1,45$. Na região da cauda (**Figura 5F**), o epitélio apresentou valores decrescentes entre as fases ativa, de recrudescência, em regressão e regredida, com suas respectivas médias de $38,43 \% \pm 2,46$; $36,37 \% \pm 1,67$; $35,94 \% \pm 2,31$ e $32,35 \% \pm 1,36$. No entanto, não houve diferenças significativas entre elas.

B.2.2. Lúmen

Na região da cabeça, o lúmen apresentou uma maior proporção na fase em regressão, com $21,52 \% \pm 1,15$, seguida pelas fases ativa e em recrudescência, com valores de $13,44 \% \pm 0,58$ e $11,35 \% \pm 0,68$, respectivamente. Na fase regredida ocorreu um decréscimo significativo, com valor de $5,98 \% \pm 0,36$. Já na região do corpo, o lúmen apresentou a maior proporção na fase em regressão, com média de $21,74 \% \pm 0,58$, seguida pela fase ativa, com média de $19,43 \% \pm 1,10$. No período de recrudescência, houve um decréscimo para $12,81 \% \pm 0,55$, seguido de um decréscimo significativo na fase regredida com média de $7,18 \% \pm 0,56$. Na região da cauda, o lúmen apresentou o maior valor na fase em regressão, com valor de $45,27 \% \pm 2,97$, seguido de um decréscimo significativo para as fases de recrudescência ($27,88 \% \pm 1,75$), ativa ($27 \% \pm 2,05$) e regredida ($20,02 \% \pm 1,22$).

B.2.3. Estroma

Na região da cabeça, o estroma apresentou a maior proporção na fase regredida, com $53,49 \% \pm 1,30$, seguido por um decréscimo nas fases de recrudescência ($33,54 \% \pm 2,12$), em regressão ($21,59 \% \pm 1,05$) e ativa ($18,52 \% \pm 0,62$). Na região do corpo, o estroma representou a maior proporção na fase regredida, com média de $68,28 \% \pm 1,21$, seguida por um decréscimo na fase de recrudescência, com $42,45 \% \pm 1,40$, e ocorreu um decréscimo significativo nas fases ativa e em regressão, com médias de $22,94 \% \pm 1,11$ e $21,81 \% \pm 1,24$, respectivamente. Por fim, as proporções de estroma na região da cauda apresentaram o maior valor na fase regredida, com $47,63 \% \pm 1,55$, seguida pelas fases de recrudescência e ativa com $35,75 \% \pm 1,56$ e $34,57 \% \pm 2,02$, respectivamente. Na fase em regressão, ocorreu um decréscimo significativo, com média de $18,79 \% \pm 1,11$.

4. DISCUSSÃO

A estrutura morfológica e bioquímica do epidídimo é de uma maneira geral, conservada entre os mamíferos (Alsun e Hunter, 1978; Axner et al., 1999 e Ahmed et al., 2009). Até o momento, em todos os mamíferos estudados as regiões (ou segmentos) do epidídimo são subdivididas em lóbulos por septos de tecido conjuntivo (Turner et al., 2003; Robaire et al., 2006). A separação em lóbulos permite que ocorra uma expressão de genes e proteínas específicas para cada lóbulo (Turner et al., 2003), e que eles atuem de forma independente entre si (Takano, 2007; Arrotéia et al., 2012), formando diferentes microambientes com distintas funções ao longo do epidídimo.

Entretanto, o número de regiões ou segmentos em que o epidídimo é dividido varia entre as diferentes espécies, sendo essa diferença específica ou decorrente do método utilizado na identificação das diferentes morfologias entre as regiões ou segmentos (Robaire et al., 2006). Em algumas espécies são reconhecidos quatro segmentos do epidídimo, o segmento inicial, a cabeça, o corpo e a cauda, como o caso do roedor *Lagostomus maximus* (Aguilera-Merlo et al., 2005), enquanto que no roedor *Cavia porcellus*, são reconhecidos sete segmentos no epidídimo (Greenberg e Forssmann, 1983). Em ambos as análises basearam-se na altura do epitélio entre as diferentes regiões ou segmentos.

Assim como existe variação no número de regiões ou segmentos do epidídimo, os tipos celulares também podem apresentar variação entre diferentes espécies (Robaire et al., 2006; Beguelini et al., 2010). Em camundongos foram observados os mesmos seis

tipos celulares encontrados em *E. furinalis*, as células principais, apicais, basais, claras, estreitas e halo (Robaire et al., 2006), em *L. maximus*, também um roedor, não foram identificadas células apicais (Aguilera-Merlo et al., 2005), e na espécie de morcego hematófago *Desmodus rotundus*, foram descritas somente as células principais, basais e claras (Castro et al., 2017).

Outra condição variável nos tipos celulares refere-se à distribuição e frequência das células entre as regiões ou segmentos do epidídimo (Robaire et al., 2006; Beguelini et al., 2010). Variações na distribuição e frequência dos tipos celulares em cada região ou segmento do epidídimo são responsáveis pela formação de microambientes ao longo do órgão, modificando, portanto, a fisiologia do epidídimo (Alkafafyet al., 2012; Arrighi et al., 2014), uma vez que os tipos celulares tem funções específicas.

As células principais são responsáveis pela produção e liberação da maioria das proteínas no lúmen, além de participarem da reabsorção de bicarbonato na região da cabeça (Robaire et al., 2006; Da Silva, et al., 2007). As células claras são responsáveis pelo bombeamento de prótons, aumentando a acidez da região interna do ducto do epidídimo (Da Silva et al., 2007; Belleannée et al., 2010), sendo que a acidificação do lúmen ocorre pela presença de ATPase na membrana apical das células claras, responsáveis pelo bombeamento de próton vacuolar (V-ATPase) e prótons H^+ (Breton et al., 1996; Da Silva et al., 2007; Belleannée et al., 2010). A ATPase na membrana apical também foi observada nas células apicais, halo e estreitas, inferindo que essas células também podem ser responsáveis pela acidificação do lúmen (Breton et al., 1996; Pastor-Soler et al., 2005; Da Silva et al., 2007; Belleannée et al., 2010). Além disso, as células halo podem atuar como células de defesa, tendo a função de proteção do epitélio do epidídimo (Arrighiet al., 2014).

Eptesicus furinalis é um morcego neotropical que apresenta pelo menos um período de regressão testicular no ano, no qual os testículos apresentam quatro fases reprodutivas: a fase ativa, a fase em regressão, a fase regredida e a fase em recrudescência (Bueno et al., 2014). Como observado nesse estudo, a morfologia do epidídimo também apresenta alterações com as fases reprodutivas testiculares.

A altura e a porcentagem relativa do epitélio apresentaram médias decrescentes das fases testiculares ativa, em regressão e regredida, e um aumento na fase de recrudescência nas três regiões do epidídimo, provavelmente pelo fato da atividade das células do epidídimo ser maior durante a fase testicular ativa. Além disso, quando os testículos estão regredidos, o epidídimo apresenta a maior porcentagem relativa de

estroma nas três regiões, sendo que essa alteração morfológica é similar à observada no testículo, onde a fase de regressão apresenta uma maior frequência relativa de tecido intersticial (Capítulo 1).

Durante o período regredido, a porcentagem relativa do lúmen na região da cauda foi maior quando comparado com as demais regiões. Essa característica pode estar associada com o fato de *E. furinalis* provavelmente armazenar espermatozoides na cauda do epidídimo. O armazenamento de espermatozoides na cauda do epidídimo já foi relatado para alguns mamíferos (Pastor-Soler et al., 2005; Robaire et al., 2006), porém é uma ocorrência característica de algumas espécies da família Vespertilionidae, em que algumas espécies podem armazenar espermatozoides na cauda do epidídimo por mais de três meses (Crinchton, 2000).

Variações na morfologia do epidídimo associadas à ocorrência de regressão testicular já foi observada em outras espécies de mamíferos (Aguilera-Merlo et al., 2005; Alkafafy et al., 2012) e também de morcego (Beguelini et al., 2015). Em *E. furinalis*, durante a fase testicular regredida há uma menor expressão de receptores de andrógenos nas células de Sertoli e de hormônios luteinizantes nas células de Leydig, indicando uma menor produção e atuação de hormônios andrógenos. Em contraposição, na fase testicular ativa, há uma maior expressão de AR nas células de Sertoli e de LH nas células de Leydig (Bueno, 2018). Tendo em vista que o desenvolvimento do epitélio do epidídimo depende de hormônios andrógenos, bem como de fatores provenientes do lúmen do testículo (Rodriguez et al., 2002) é possível inferir que o processo de regressão testicular em morcegos interfira na morfologia do epidídimo, influenciando principalmente na formação do epitélio do mesmo, por meio das diferenças na concentração de hormônios andrógenos.

5. CONCLUSÃO

Eptesicus furinalis apresenta o epidídimo dividido em cabeça, corpo e cauda, e seu epitélio é composto por células principais, apicais, basais, estreitas, claras e halo. O processo de regressão testicular no ciclo reprodutivo da espécie influencia na morfologia do epidídimo, principalmente em relação à altura do epitélio e à porcentagem relativa do lúmen e do estroma, sendo que essa influência pode estar relacionada a fatores hormonais, como os hormônios andrógenos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o suporte técnico fornecido por Luiz Roberto Falleiros Junior e a ajuda nas coletas dos animais por Manuela Tosi Comelis. Agradecemos a bolsa de estudos concedida a Larissa Mayumi Bueno pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilera-Merlo, C.; Muñoz, E.; Dominguez, S.; Scardapane, L.; Piezzi, R. (2005). Epididymis of Viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): Morphological Changes During the Annual Reproductive Cycle. *The Anatomical Record*, 282, 83-92.

Ahmed, M.H.; Sabry, S.M.; Zaki, S.M.; El-Sadik, A.O. (2009). Histological, immunohistochemical and ultrastructural study of the epididymis in the adult albino rat. *Australian Journal of Basic and Applied Science*, 3(3), 2278-2289.

Alkafafy, M.; Ebada, S.; Rashed, R.; Attia, H. (2012). Comparative morphometric and glycohistochemical studies on the epididymal duct in the donkey (*Equus asinus*) and dromedary (*Camelus dromedarius*). *Acta Histochemica*, 114, 434-447.

Alsun, D.J.; Hunter, A.G. (1978). Regional histology and histochemistry of the ductus epididymis in the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Biology of Reproduction*, 19, 1063-1069.

Arrighi, S. (2014). Are the basal cells of the mammalian epididymis still an enigma? *Reproduction, Fertility and Development*, 26, 1061-1071.

Arrotéia, K.F.; Garcia, P.V.; Barbieri, M.F.; Justino, M.L.; Pereira, L.A.V. (2012). The epididymis: embryology, structure, function and its role in fertilization and infertility. In: Pereira, L.A.V. (Ed): *Embryology – Updates and Highlights on Classic Topics*, (Croatia).

Axnér, E.; Malmqvist, M.; Linde-Forsberg, C.; Rodriguez-Martinez, H. Regional histology of the ductus epididymis in the domestic cat. (1999). *Journal of Reproduction and Development*, 45, 151-160.

Beguelini, M.R.; Sergio, B.F.S.; Leme, F.L.J.; Taboga, S.R.; Morielle-Versute, E. (2010). Morphological and morphometric characteristics of the epididymis in the Neotropical bats *Eumops glaucinus* and *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Chiroptera Neotropical*, 16(2), 769-779.

Beguelini, M.R.; Góes, R.M; Rahal, P.; Morielle-Versute, E.; Taboga, S.R. (2015). Impact of the Processes of Total Testicular Regression and Recrudescence on the

Epididymal Physiology of the Bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *PLoS ONE*, 10(6): e0128484.

Behmer, O.A.; Tolosa, E.M.C.; Freitas-Neto, A.G. (1976). Manual de técnicas para Histologia Normal e Patológica (Edart: São Paulo).

Belleannée, C.; Da Silva, N.; Shum, W.W.C.; Brown, D.; Breton, S. (2010). Role of purinergic signaling pathways in V-ATPase recruitment to apical membrane of acidifying epididymal clear cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 298, 817-830.

Breton, S.; Smith, P.J.S.; Lui, B.; Brown, D. (1996). Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H^+)-ATPase. *Nature Medicine*, 2(4), 470-472.

Bueno, L.M.; Beguelini, M.R.; Comelis, M.T.; Taboga, S.R.; Morielle-Versute, E. (2014). Ultrastructure of spermatogenesis, spermatozoon and processes of testicular regression and recrudescence in *Eptesicus furinalis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Animal Reproduction Science*, 148, 228-244.

Castro, M.M.; Gonçalves, W.G.; Teixeira, S.A.M.V.; Fialho, M.C.Q.; Santos, F.C.; Oliveira, J.M.; Serrão, J.E.; Machado-Neves, M. (2017). Ultrastructure and morphometric features of epididymal epithelium in *Desmodus rotundus*. *Micron*, 102, 35-43.

Crichton, E.G.; Krutsch, P.H. (2000). Reproductive biology of bats. (Academic Press: London).

Da Silva, N.; Shum, W.W.C.; Breton, S. (2007). Regulation of vacuolar proton pumping ATPase-dependent luminal acidification in the epididymis. *Asian Journal of Andrology*, 9(4), 476-482.

De Knecht, L.V.; Silva, J.A.; Moreira, E.C.; Sales, G.L. (2005). Bats found in the city of Belo Horizonte, MG, 1999-2003. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57(5), 576-583.

Delbes, G.; Levacher, C.; Pairault, C.; Racine, C.; Duquenne, C.; Krust, A.; Habert, R. (2004). Estrogen receptor beta mediated inhibition of male germ cell line development in mice by endogenous estrogens during perinatal life. *Endocrinology*, 145, 3395-3403.

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.

Greenberg, J.; Forssmann, W. (1983). Studies of the Guinea Pig Epididymis. *Anatomy and Embryology*, 168, 173-194.

Gustafon, A.W. (1979). Male reproductive patters in hibernation bats. *The Journal of the Society for Reproduction and Fertility*, 56 (1), 317-331.

Jones, R. (2004). Sperm SuvivalVersus Degradation in the Mammalian Epidiymis: A Hypotesis. *Biology of Reproduction*, 71, 1405-1411.

Krutzsch, P.H. (1979). Male reproductive patterns in nonhibernating bats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 56, 333-344.

Kunz, T.H.; Anthony, E.L.P. (1982). Age estimation and post-natal growth in the bat *Myotis lucifugus*. *Journal of Mammalogy*, 63, 23-32.

Pastor-Soler, N.; Piétrement, C.; Breton, S. (2005). Role of Acid/Base Transporters in the Male Reproductive Tract and Potential Consequences of Their Malfunction. *Physiology*, 20, 417-428.

Ribeiro, M.G.; Lima, S.R. (2000). Iniciação às técnicas de preparação de material para o estudo e pesquisa em morfologia. (Belo Horizonte: SEGRAC-Editora e Gráfica Limitada).

Robaire, B; Hinton, B.T. (2006). The Epididymis. In: Neill, J.D. (Ed) Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Academic Press).

Rodriguez, C.M.; Kirby, J.L.; Hinton, B.T. (2002). The development of the epididymis. In: Robaire, B.; Hinton, B.T. (Eds.), The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice, (Kluwer Academic/Plenum: New York).

Takano, H. (2007). Histological division of mouse epididymis based on regional differences. *Hirosika Medicine Journal*, 59, 292-301.

Turner, T.T.; Bomgardner, D.; Jacobs, J.P.; Nguyen, Q.A. (2003). Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction*, 125, 871-878.

Weibel, E.R. (1978). Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory Investigation*, 12, 131-155.

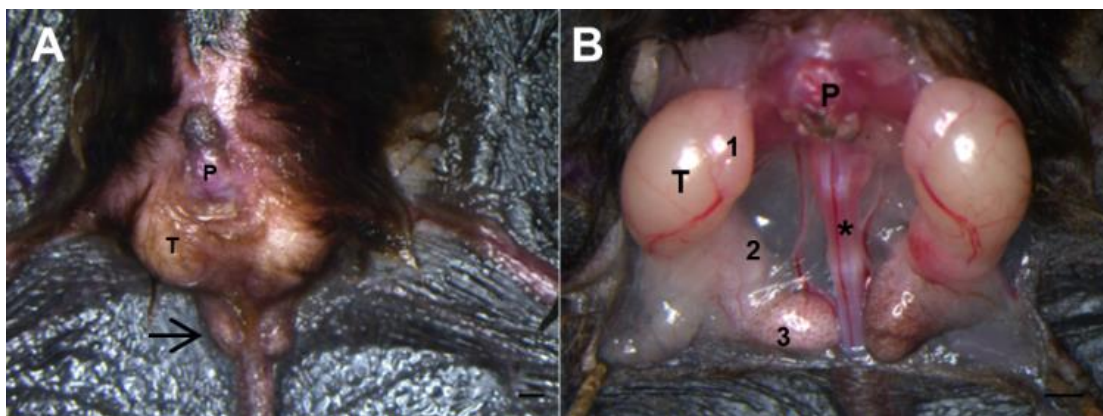


Figura 1. Anatomia dos testículos e epidídimos de *Eptesicus furinalis*. **A.** Posição dos testículos no animal adulto (permanentemente escrotado) e do prolongamento da cauda do epidídimo (seta) ligada às vertebrae caudais anteriores do animal. **B.** O epidídimo situa-se anexo ao testículo do animal, e pode ser dividido anatomicamente em três regiões distintas, a cabeça (1), o corpo (2) e a cauda (3), esta ligada à cauda do animal (*). **T:** testículo; **P:** pênis.

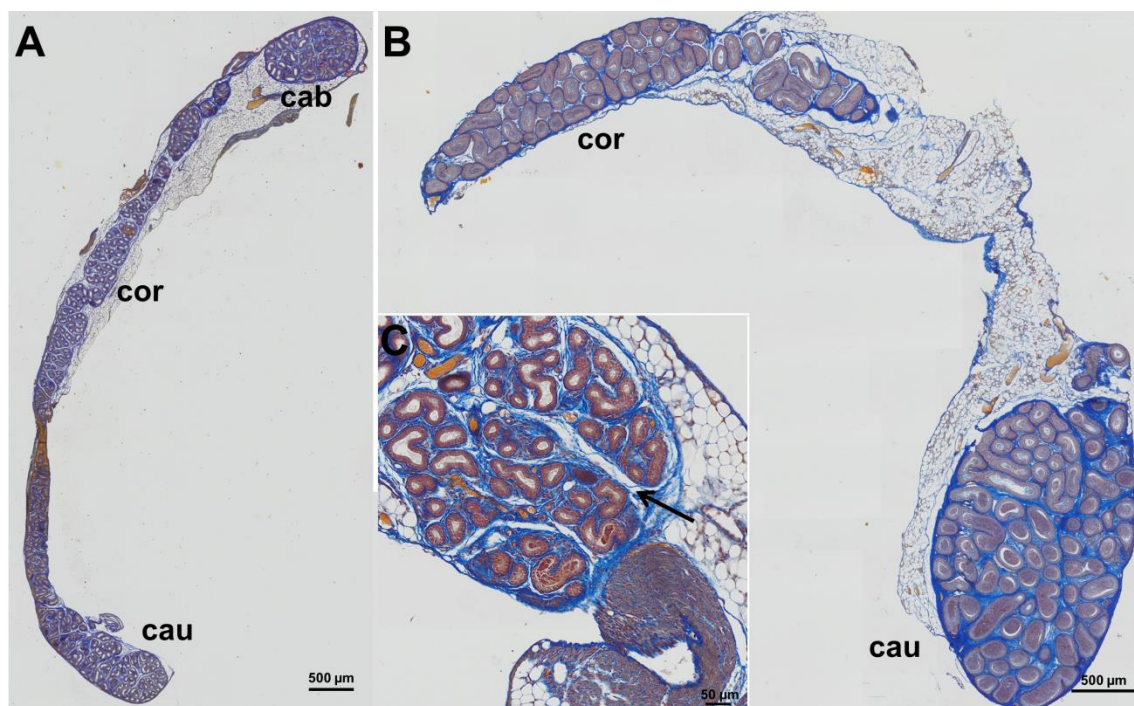


Figura 2. Histologia geral do epidídimo de *Eptesicus furinalis*. **A.** Epidídimo ilustrando as três regiões distintas a cabeça (**cab**), o corpo (**cor**) e a cauda (**cau**). **B.** Região do corpo (**cor**) e da cauda (**cau**) em maior aumento. **C.** Região parcial da cauda evidenciando os lóbulos separados por septos de tecido conjuntivo (seta). Coloração por Masson Tushman's Blue.

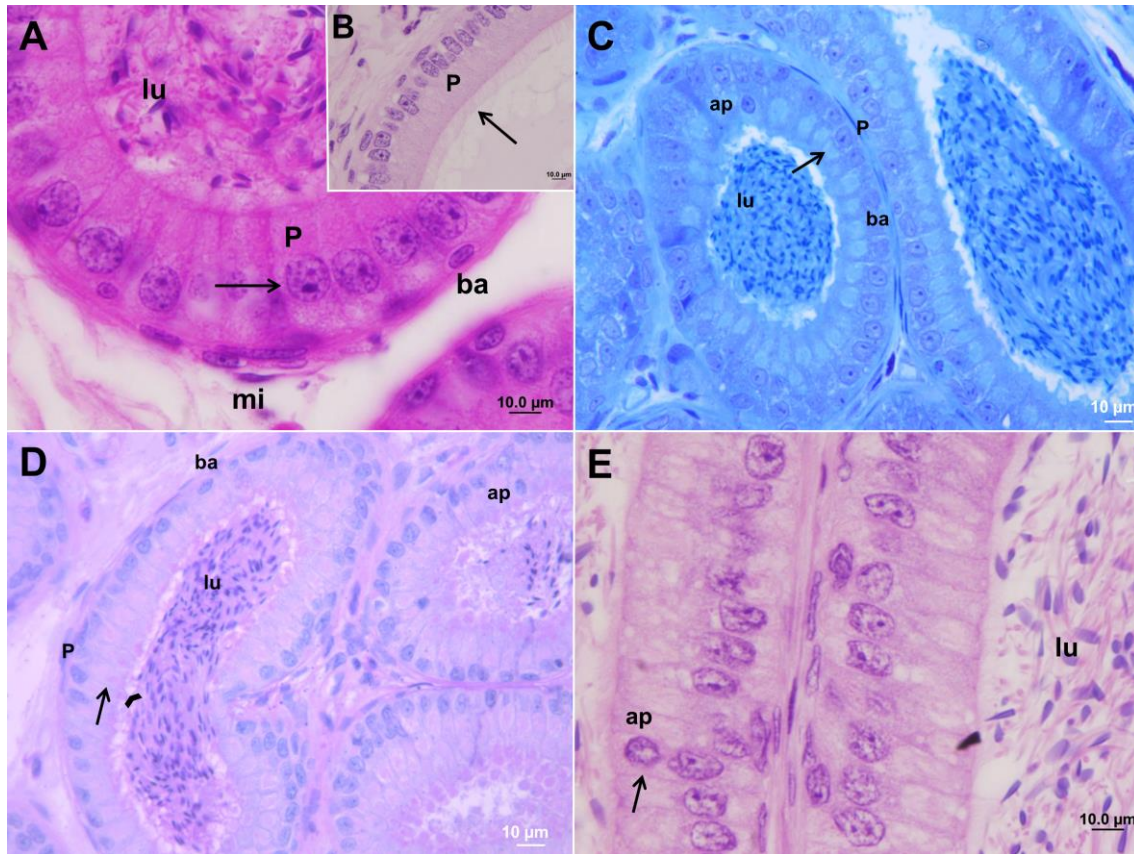


Figura 3. Tipos celulares encontrados no epitélio do epidídimo de *Eptesicus furinalis*. **A)** Célula principal (P) com núcleo arredondando (seta) na região basal da célula; célula basal (ba) adjacente à membrana basal; células mióides (mi) circundando o túbulo; coloração por hematoxilina-eosina. **B)** Células principais (P) com estereocílios (seta) na direção do lúmen. **C)** A célula principal apresenta a região apical fracamente corada; célula basal (ba) adjacente à membrana basal; célula apical (ap) na região apical do epitélio, sem contato com a membrana basal e apresenta um citoplasma fracamente corado; coloração por azul de toluidina. **D)** A célula basal (ba) e a célula apical (ap) não apresentam reação positiva do PAS; a célula principal apresenta grânulos de reação positiva do PAS no citoplasma (seta) e na região dos estereocílios (cabeça de seta); coloração por PAS contracorado com hematoxilina. **E)** Célula apical (ap) com núcleo arredondado (seta), sem contato com a membrana basal; coloração por hematoxilina-eosina. lu: lúmen do epidídimo.

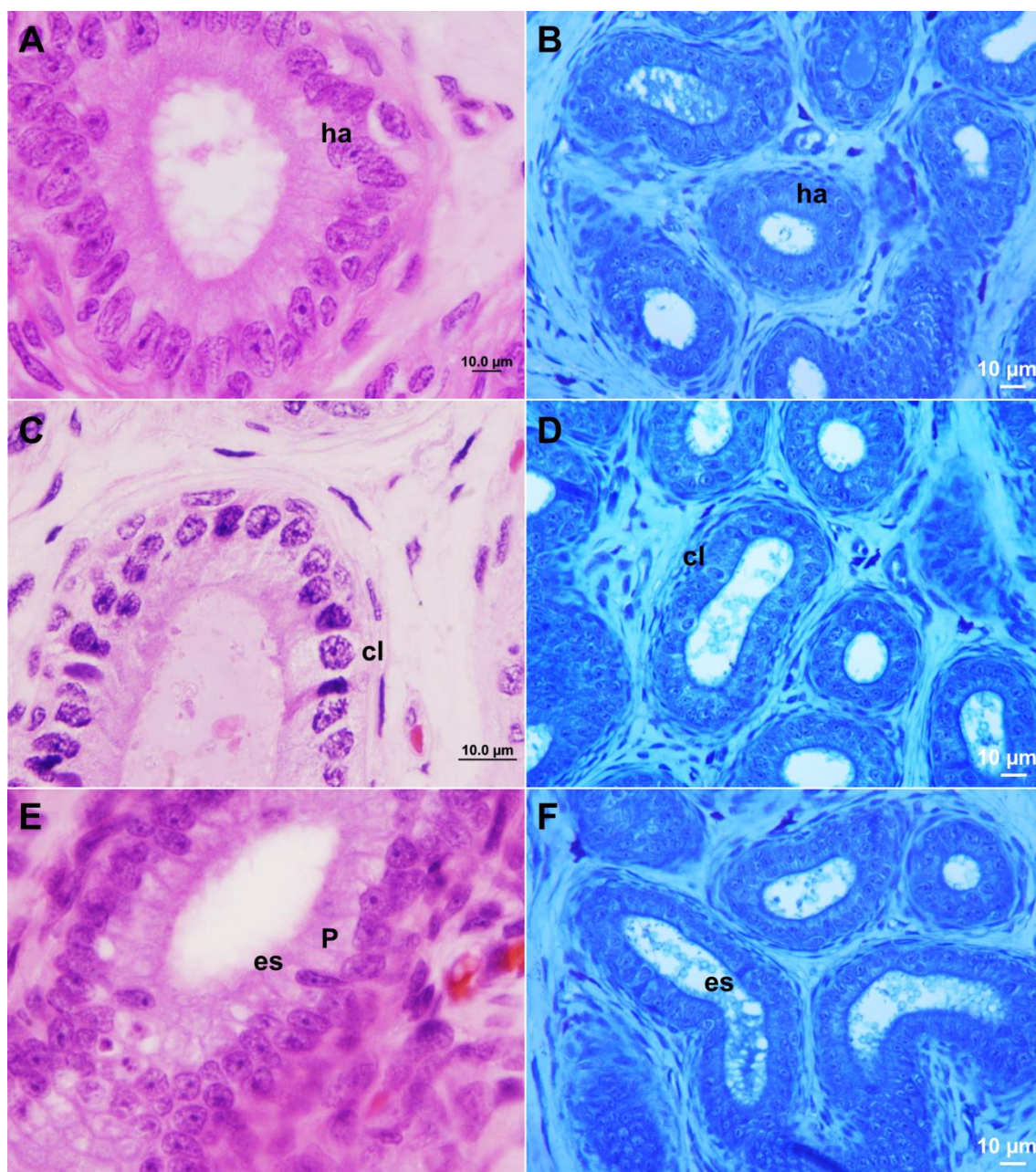


Figura 4. Tipos celulares encontrados no epitélio do epidídimo de *Eptesicus furinalis*. **A.** Célula halo (**ha**), adjacente à membrana basal e com citoplasma fracamente corado, coloração por hematoxilina-eosina. **B.** Célula halo (**ha**), coloração por azul de toluidina. **C.** Célula clara (**cl**), se estendendo da membrana basal à região do lúmen, e apresenta o citoplasma fracamente corado, coloração por hematoxilina-eosina. **D.** Célula clara (**cl**), coloração por azul de toluidina. **E.** Célula estreita (**es**), a qual apresenta o núcleo alongado e fortemente corado, intercalando as células principais (**P**), coloração por hematoxilina-eosina, **F.** Célula estreita (**es**), coloração por azul de toluidina.

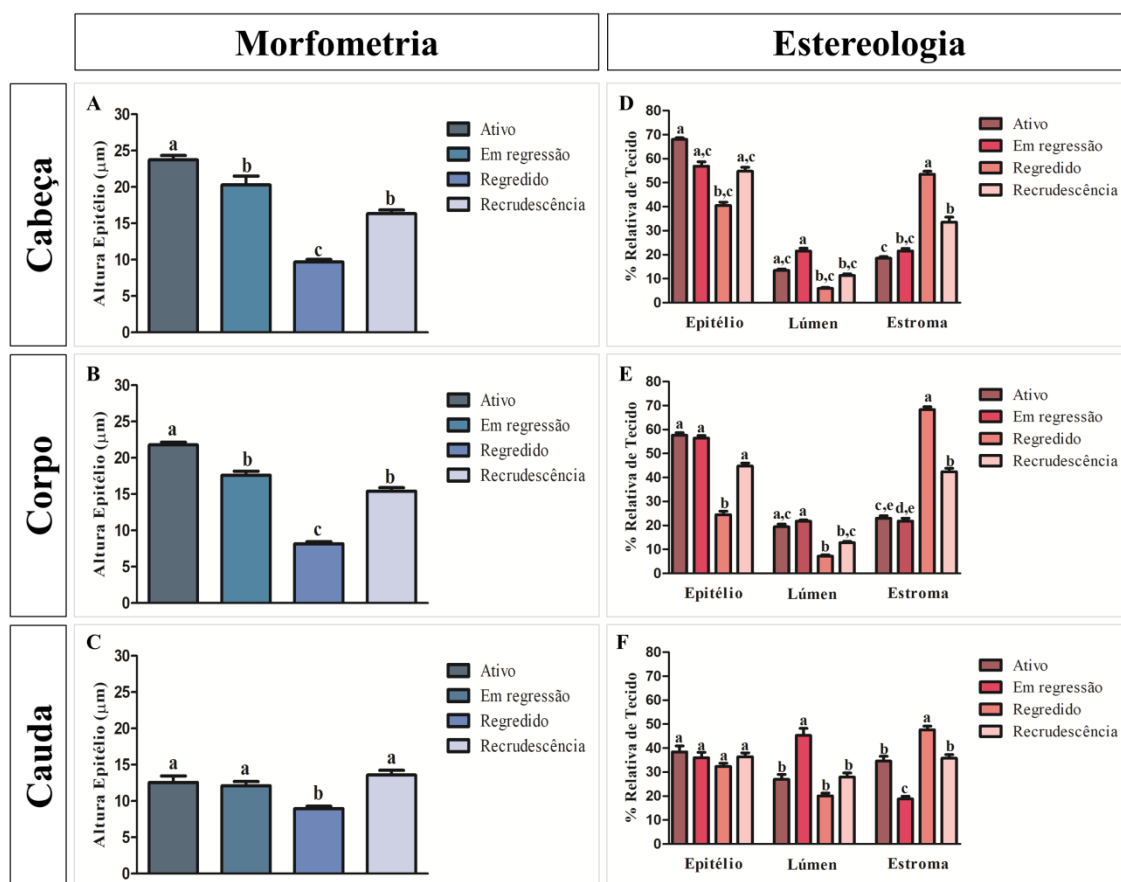


Figura 5. Representações gráficas da altura média do epitélio e da porcentagem da composição tecidual do epidídimo de *Eptesicus furinalis* durante as quatro fases reprodutivas testiculares: ativo, regredindo, regredido e reativando. **A.** Média da altura do epitélio da região da cabeça **B.** Média da altura do epitélio da região do corpo. **C.** Média da altura do epitélio da região da cauda **D.** Variação tecidual entre epitélio, lúmen e estroma da região da cabeça **E.** Variação tecidual entre epitélio, lúmen e estroma da região do corpo **F.** Variação tecidual entre epitélio, lúmen e estroma da região da cauda. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

Capítulo 3

Morfologia do útero de *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae: Chiroptera) em diferentes fases do ciclo reprodutivo

Artigo a ser submetido para publicação na revista “Journal of Morphology”

Morfologia do útero de *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae: Chiroptera) em diferentes fases do ciclo reprodutivo

Larissa Mayumi Bueno^a; Mateus Rodrigues Beguelini^b; Sebastião Roberto Taboga^c; Eliana Morielle-Versute^a.

^a Departamento de Zoologia e Botânica, UNESP – Univ. Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil;

^b Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, UFOB – Univ. Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, Bahia, Brasil.

^c Departamento de Biologia, UNESP – Univ. Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil;

*Autor Correspondente: morielle@ibilce.unesp.br (E. Morielle-Versute).

RESUMO

Os morcegos apresentam a maior diversidade de estratégias reprodutivas e a maior diversidade de morfologia uterina dentre todos os mamíferos. *Eptesicus furinalis* é um morcego neotropical em que a morfologia ovariana sugere a ocorrência de poliovulação e estro pós-parto, porém, a morfologia detalhada do útero, até o momento, é desconhecida. Portanto, nossos objetivos foram descrever a morfologia do útero de *E. furinalis*, bem como avaliar as mudanças morfológicas do órgão ao longo do ano, de acordo com o estado reprodutivo das fêmeas. Analisamos a histologia do útero de 53 fêmeas coletadas ao longo do ano na região noroeste do estado de São Paulo - Brasil. Observamos a presença de espermatozoides no útero nos meses de Maio a Julho, e a ocorrência de fêmeas grávidas e/ou lactantes durante os meses de Agosto a Outubro, e fêmeas lactantes em Novembro e Dezembro, sendo que uma fêmea grávida foi observada também em Dezembro. O útero de *E. furinalis* é do tipo bicórneo, sendo que os dois cornos uterinos fundem-se na região mais caudal do útero, formando um único corpo uterino. A implantação pode ocorrer em ambos os cornos uterinos, sendo que até quatro embriões podem ser implantados (dois em cada corno uterino), porém apenas um embrião em cada corno terá o desenvolvimento completado. Portanto, a presença de fêmeas grávidas de Agosto a Outubro e também em Dezembro, indica a ocorrência de estro pós-parto na espécie, sendo que cada fêmea pode então produzir de um a quatro filhotes por ano.

Palavras-chave: implantação, estro pós-parto, armazenamento de espermatozoides.

1. INTRODUÇÃO

Os morcegos, pertencentes à ordem Chiroptera, compõem cerca de 20% do total do número de espécies de mamíferos, exibindo atualmente 1.300 espécies amplamente distribuídas no mundo (Fenton e Simmons, 2015). Por esta razão apresentam também grande diversidade de estratégias reprodutivas (Crichton e Krutzsch, 2000). Nos trópicos, fatores abióticos como a temperatura, a precipitação e o fotoperíodo tem influência direta nesses animais, que desenvolveram padrões reprodutivos monoéstricos, poliéstricos ou com reprodução contínua ao longo do ano (Reis, 1980; Taddei, 1980; Fazzolari-Corrêa, 1995; Zortéa, 2003).

Os morcegos machos de clima tropical podem apresentar espermatogênese contínua durante todo o ano (Crichton e Krutzsch, 2000; Beguelini et al., 2009; Moraes et al., 2012; 2013), ou podem apresentar um período de regressão testicular, em que a atividade espermatogênica é temporariamente interrompida (Araújo et al., 2013; Beguelini et al., 2013, Bueno et al., 2014). Além disso, algumas espécies podem apresentar armazenamento de espermatozoides na cauda do epidídimo (Crichton, 2000).

As fêmeas de morcegos apresentam a maior diversidade de morfologia uterina dentre todos os mamíferos (Luckett, 1980), podendo exibir úteros duplos, bipartidos, bicórneos e simples (Rasweiler e Badwaik, 2000). Nas espécies tropicais ocorre menstruação verdadeira (Rasweiler, 1991; Rasweiler e Bonilla, 1992; Komar et al., 2007; Wang et al., 2008; Rasweiler et al., 2010); ovários polarizados (Komar et al., 2007); diferentes padrões de ovulação, podendo ser preferencial, alternada ou dupla (Crichton e Krutzsch, 2000); casos de ovulação tardia (Abhilasha e Krishna, 1996) e até mesmo desenvolvimento embrionário tardio (Fleming, 1971; Rasweiler e Badwaik, 1997).

Eptesicus furinalis (Vespertilionidae) é um morcego exclusivo da região neotropical (Mies, Kurta e King, 1996, Bianconi e Pedro, 2007), e tem hábito alimentar insetívoro, o que lhe confere um papel ecológico fundamental no controle populacional de insetos (Aguiar e Antonini, 2008). Análises das estruturas reprodutivas de machos da espécie detectaram um processo de regressão testicular, e nas fêmeas, a partir da análise dos ovários verificou-se a ocorrência de poliovulação e estro pós-parto (Capítulo 4). Com significativa importância no sucesso da fecundação/reprodução está a morfologia uterina, para o qual não há informações detalhadas o que facilitaria o entendimento de como a reprodução se processa nesta espécie. Portanto, os objetivos do presente estudo foram descrever a morfologia do útero de *E. furinalis*, bem como avaliar as mudanças

morfológicas do órgão ao longo do ano, durante diferentes fases do estado reprodutivo das fêmeas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área, método e licença de coleta

As fêmeas foram coletadas na região urbana de São José do Rio Preto, na região noroeste do estado de São Paulo (20°49'11'' S, 49°22'45''W), com o auxílio de redes de neblina armadas no período noturno em locais estratégicos, como trilhas, áreas de vegetação e saídas de abrigos, no período de Setembro de 2013 a Julho de 2017.

As coletas foram realizadas no período de 2013 a 2016, e foram autorizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente – IBAMA (Licença número: 21707-1; Sisbio: 59765825-13/04/2010), e os procedimentos com os animais foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso Animal – CEUA do IBILCE/UNESP (Processo102/2014-CEUA). Os animais foram tratados de acordo com as recomendações do Comitê no Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Institute of Laboratory Animal Resources, Conselho Nacional de Pesquisas, "Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório". Após a captura, os animais foram mantidos em gaiolas individuais (40 x 20 x 20 cm) com água *ad libitum*, até a manhã seguinte à coleta, quando foram eutanasiados e processados.

2.2. Espécimes analisados

Foram utilizadas 53 fêmeas adultas (Tabela 1) de *Eptesicus furinalis*, identificadas de acordo com Bianconi e Pedro, 2007. A condição adulta de cada animal foi determinada considerando-se o peso corporal, a completa ossificação das articulações metacarpo-falangeanas e o grau de desgaste dentário (Kunz e Anthony, 1982; de Knecht et al., 2005).

As fêmeas foram separadas de acordo com o estado reprodutivo que apresentavam: fêmeas não ativas reprodutivamente (não estavam grávidas e nem lactantes), fêmeas grávidas (apresentavam embriões/fetos no útero), ou fêmeas lactantes (exibiram glândulas mamárias e mamilos evidentes, com secreção de leite após leve compressão das mamas).

Tabela 1. Número de fêmeas coletadas em cada mês e a respectiva condição reprodutiva.

Mês	n (amostra)	Condição reprodutiva
Janeiro (2014)	05	Não reprodutivas
Fevereiro (2017)	04	Não reprodutivas
Março (2014)	05	Não reprodutivas
Abril (2014)	05	Não reprodutivas
Mai (2016)	05	Não reprodutivas
Junho (2017)	05	Não reprodutivas
Julho (2017)	05	Não reprodutivas
Agosto (2014)	05	Grávidas
Setembro (2013)	03	Grávidas e lactantes
Outubro (2013)	05	Grávidas e lactantes
Novembro (2013)	03	Lactantes
Dezembro (2013)	03	01 Grávida e lactante 02 Lactantes
Total 53 fêmeas		

2.3. Processamento dos animais

Os animais foram anestesiados com uma mistura de 80mg ketamina + 20mg de xilasina por quilograma do animal (0,1ml para cada 50g de peso corporal injetado subcutaneamente). Previamente à retirada do útero, com a região abdominal exposta, imagens do útero e ovários foram obtidas com estereomicroscópio Leica MZ16 acoplado com câmera digital Leica DFC295 e com auxílio do software Leica Application Suite – LAS, Versão 3.8. A seguir o útero foi cuidadosamente retirado e fixado em solução fixadora de metanol: clorofórmio: ácido acético (6:3:1), durante três horas a 4°C, desidratado em série graduada de etanol, clarificado em xilol, incluído em parafina, seccionado seriadamente (5 µm de espessura) e submetido à análises anatômicas e histológicas. Após a retirada das amostras, os animais foram fixados e depositados na Coleção de Chiroptera do IBILCE-UNESP (DZSJRP).

2.4. Análise histológica

Os cortes dos úteros foram corados com Hematoxilina-Eosina (Ribeiro e Lima, 2000) e as lâminas foram fotografadas em microscopia óptica (Scanner de imagens Olympus BX-VCB), com auxílio de software de captura e análise de imagem (*software* VS-ASW), para visualização completa do útero; e analisadas e fotodocumentadas em

fotomicroscópio Olympus BX60 para observação dos tecidos componentes da estrutura uterina.

3. RESULTADOS

3.1. Anatomia geral do útero

O útero de *Eptesicus furinalis* é do tipo bicórneo, o qual possui dois cornos uterinos laterais, que se unem na porção mais caudal do útero, formando então um único corpo uterino (**Figura 1A**). Os ovários se conectam ao útero através dos ovidutos, na porção cranial posterior de cada corno uterino.

3.2. Histologia geral do útero

A fusão dos cornos uterinos e de seus lumens pode ser observada na **Figura 1B**. A composição da parede dos cornos e do corpo uterino é similar, e compreende três camadas: o perimétrio, o miométrio e o endométrio.

O perimétrio (**Figura 1C**) é a camada serosa externa constituída de um mesotélio e uma camada de tecido conjuntivo frouxo, arranjada de forma longitudinal à extensão do órgão. O miométrio é a camada intermediária e também a mais espessa, e é composta por uma camada interna circular e uma camada externa longitudinal de tecido muscular liso (**Figura 1C e 1D**). O endométrio (**Figura 1C**) é a camada interna do útero e representa a mucosa uterina. Possui um epitélio simples colunar que se estende dentro do estroma do endométrio, formando glândulas tubulares com epitélio colunar simples, com um único núcleo de localização periférica (**Figura 2C**). O estroma endometrial também é composto por vasos sanguíneos e nervos em um tecido conjuntivo frouxo.

Na porção cranial de cada corno uterino é possível observar a extremidade intramural da tuba uterina (**Figura 2B**), que é o local onde ocorre a junção tubouterina, a qual é composta por células ciliadas.

3.3. Variação morfológica do útero

A morfologia do útero variou de acordo com o estado reprodutivo em que a fêmea se encontrava ao longo do ano, sendo que essa variação foi observada principalmente no endométrio e suas glândulas.

3.3.1. Fêmeas não reprodutivas

De acordo com a morfologia do útero, as fêmeas que não estavam grávidas e nem lactantes foram classificadas em duas categorias, a categoria A e a categoria B.

Na categoria A estão as fêmeas dos meses de Janeiro a Abril, em cujos úteros não se observou a presença de espermatozoides na luz (**Figura 2A**) ou na extremidade intramural (**Figura 2B**). Além disso, o endométrio aparentou ter uma menor espessura quando comparado com as fêmeas da categoria B.

Na categoria B estão as fêmeas dos meses de Maio a Julho, nas quais os úteros apresentaram-se hiperêmicos, e com uma maior espessura do endométrio (**Figura 2D**). Foram observados espermatozoides na luz do útero (**Figura 2D**) e na extremidade intramural (**Figura 2E**). As glândulas do endométrio apresentaram atividade mitótica, (**Figura 2F**) sendo observada a presença de algumas regiões de epitélio pseudoestratificado no endométrio (**Figura 2D**).

3.3.2. Fêmeas grávidas

No mês de Agosto as fêmeas estavam grávidas, porém sem as glândulas mamárias desenvolvidas. Já nos meses de Setembro e Outubro, as fêmeas além de grávidas, também estavam com as glândulas mamárias e mamilos desenvolvidos, portanto, estavam na condição de grávidas e lactantes. Em Dezembro, as fêmeas apresentaram fetos bem desenvolvidos no útero, e também exibiam glândulas mamárias e mamilos desenvolvidos, estando na condição grávidas e lactantes.

Em Agosto (três fêmeas) e em Setembro (duas fêmeas) apresentaram quatro embriões nos úteros, sendo dois em cada corno uterino (**Figura 3A**). O endométrio e a placenta nesse período estão bem desenvolvidos (**Figura 3C**), assim como as glândulas endometriais, as quais apresentam o lúmen bem desenvolvido (**Figura 3D**). Nas cinco fêmeas de Outubro, os úteros exibiram apenas dois embriões, sendo um em cada corno uterino. Já uma fêmea de Dezembro, apresentou apenas um feto no útero (**Figura 3B**), enquanto as outras não apresentaram fetos nos úteros, e estavam apenas na condição lactantes. Durante o período de gravidez, podemos observar que a camada do miométrio se apresenta com menor espessura (**Figuras 3A e 3B**), possivelmente devido à distensão da parede do útero resultante do crescimento do feto. Os resultados evidenciam que nas fêmeas de *E. furinalis* a implantação pode ocorrer em ambos os cornos uterinos.

3.3.3. Fêmeas lactantes

As fêmeas de Novembro e duas de Dezembro que estavam com a glândula mamária e os mamilos bem desenvolvidos, ou seja, na condição lactante, não exibiram fetos nos úteros (**Figura 3E**), e estes apresentaram as glândulas do endométrio pouco desenvolvidas (**Figura 3F**).

4. DISCUSSÃO

Quando fêmeas não reprodutivas foram comparadas com as fêmeas grávidas, as mudanças observadas na morfologia do útero de *E. furinalis* foram uma diminuição na espessura do miométrio devido à distensão da parede do útero, o aumento na espessura do endométrio e dos vasos sanguíneos, e o desenvolvimento das glândulas endometriais. Essas mudanças são consistentes e resultantes do desenvolvimento dos embriões no útero.

O útero de Mammalia é classificado de forma geral em quatro tipos, considerando-se sua morfologia; útero duplo, bipartido, bicórneo ou simples. O útero duplo exibe os cornos uterinos completamente separados, e é encontrado em monotremados, marsupiais (Kardong, 2010), alguns roedores (Martins et al., 2011) e alguns morcegos (Hood, 1989); o útero bipartido apresenta os cornos uterinos com uma pequena fusão, resultando em um único lúmen no corpo uterino, e é encontrado em carnívoros, ungulados e alguns morcegos (Weichert, 1966; Vicente et al., 2006); os cornos uterinos apresentam uma grande porção fusionada no útero bicórneo, sendo encontrado em mamíferos domésticos como ovelhas, nas baleias e na maioria dos morcegos (Weichert, 1966), e o útero simples contém uma única cavidade uterina decorrente da completa fusão dos cornos, sendo encontrado na maioria dos primatas (Weichert, 1966) e em alguns morcegos (Hood e Smith, 1983).

Na ordem Chiroptera os dados revelam extensa diversidade na morfologia uterina, com espécies apresentando útero duplo, como *Mormopterus planiceps* (Crichton e Krutzsch, 1987) e *Pteropus* sp. (Hood, 1989), útero bipartido em *Noctilio albiventris* (Vicente et al., 2006), útero bicórneo em *Molossus ater* (Rasweiler, 1990) e *Tadarida brasiliensis* (Stephens, 1962), e útero simples, como em *Artibeus planirostris* (Bueno, 2018). O útero bicórneo observado em *E. furinalis* é compartilhado com outras espécies de Vespertilionidae (Rasweiler e Badwaik, 2000), e é considerado uma característica ancestral dentro de Chiroptera (Carter e Mess, 2008). A condição derivada

do útero nos mamíferos em geral, apresenta uma fusão progressiva dos cornos uterinos resultando em um corpo uterino comum (Hood e Smith, 1982).

Dados da literatura reportam para morcegos vespertilionídeos, geralmente apenas um feto no interior do útero, entretanto, algumas espécies da família podem exibir dois ou mais embriões (Kurta e Kunz, 1987), como as do gênero *Lasiurus*, em que a fêmea pode parir de três a quatro filhotes (Reis et al., 2007).

O número de filhotes por parto em *E. furinalis* geralmente é de dois filhotes (Myers, 1977; Barquez et al., 1999). Porém, três fêmeas de Agosto e duas de Setembro apresentaram quatro embriões no útero (dois em cada corno uterino). Nas fêmeas de Outubro, apenas dois embriões foram observados no útero em estágio mais avançado, o que nos permitiu interpretar a ocorrência de uma provável absorção de embriões durante o processo da gravidez. A presença de um maior número de embriões implantados no útero do que o de filhotes no parto ocorre também em outras duas espécies de vespertilionídeos, *Pipistrellus subflavus* e *Eptesicus fuscus* (Wimsatt, 1945, Kunz, 1974). Em *P. subflavus*, quando o corno uterino apresenta dois embriões, o embrião que estiver implantando mais próximo ao corpo uterino é o embrião que geralmente é reabsorvido, e o mecanismo fisiológico mais provável para que isso ocorra, é que o suprimento do sangue materno seja insuficiente nas regiões mais distantes do corpo uterino (Rasweiler e Badwaik, 2000).

A observação de espermatozoides na luz do útero e na extremidade intramural da junção tubouterina nos meses de Maio, Junho e Julho, permite inferir que a cópula ocorreu nos meses de Maio a Julho. Um reforço para isso é que encontramos embriões implantados no útero somente a partir do mês de Agosto. A presença de espermatozoides no útero durante os três meses precedentes ao primeiro mês de gravidez da espécie é sugestiva de um possível armazenamento de espermatozoides no útero.

O armazenamento de espermatozoides no trato reprodutivo das fêmeas é uma característica comum em espécies de morcegos que habitam regiões temperadas pertencentes às famílias Vespertilionidae e Rhinolophidae, sendo que esse armazenamento está relacionado com o período de hibernação e a não sincronia entre a atividade reprodutiva dos machos e fêmeas (Racey, 1979; Crichton, 2000). Entretanto, algumas fêmeas de espécies de morcegos de regiões tropicais também apresentam armazenamento de espermatozoides, como *Scotophilus heathi* (Gopalakrishna e Madhavan, 1978; Krishna e Dominic, 1978), *Pipistrellus mimus* (Krishna, 1985),

Pipistrellus nanus (Bernard et al., 1997), *Lasiurus ega*, *Myotis albescens* (Myers, 1977), e até mesmo para espécimes de *E. furinalis* no Paraguai (Myers, 1977).

Geralmente os espermatozoides que estão sendo armazenados nas fêmeas de morcegos se encontram na junção tubouterina e no útero (Racey, 1979) onde ficam com a região da cabeça perpendicular ao epitélio dessas regiões (Crichton, 2000). Entretanto, somente a presença do espermatozóide não atesta a condição do armazenamento, que deve ser confirmada pela viabilidade do espermatozoide em conseguir fecundar o óvulo (Crichton, 2000). Embora nas fêmeas de *E. furinalis* analisadas no presente estudo os espermatozoides estavam com a região da cabeça perpendicular ao epitélio da luz uterina e da junção tubouterina, a viabilidade do espermatozoide não pode ser confirmada.

O local de implantação no útero varia entre os diferentes táxons de morcegos. Quando o útero é bicórneo, a implantação pode ocorrer preferencialmente no corno uterino direito, condição observada em *Pipistrellus pipistrellus* (Potts e Racey, 1971); preferencialmente no corno uterino esquerdo em *Mormoops megalophylla* (Rasweiler e Badwaik, 2000), ou em ambos os cornos uterinos em *S. heathi* (Krishna e Dominic, 1981) e *E. furinalis*, sendo esta última uma condição comum a muitas espécies da família Vespertilionidae (Rasweiler e Badwaik, 2000). A presença de regiões de epitélio pseudoestratificado no endométrio das fêmeas não reprodutivas de Maio a Julho pode ser indicativa dos possíveis locais de implantação, como ocorre na espécie *Eidolon helvum* (Odukoya et al., 2008)

A duração da gravidez de *E. furinalis* é de três meses, tendo sido relatado para ela e outros vespertilionídeos de regiões tropicais do Paraguai a ocorrência de estro pós-parto (Myers, 1977). A presença de fêmeas grávidas em Dezembro, bem como a ocorrência de fêmeas grávidas e lactantes concomitantemente confirmam a ocorrência de estro pós-parto na espécie. Com isso, as fêmeas de *E. furinalis* podem parir de um a quatro filhotes por ano, confirmando o padrão bimodal para a espécie, como previamente descrito (Myers, 1977; Barquez et al., 1999).

5. CONCLUSÃO

O útero de *Eptesicus furinalis* é do tipo bicórneo e a gravidez das fêmeas na região noroeste de São José do Rio Preto ocorre durante os meses de Agosto a Dezembro. A implantação pode ocorrer em ambos os cornos uterinos, com até dois embriões por corno, porém apenas um embrião em cada corno terá o desenvolvimento

completado até o momento do parto. A presença de espermatozoides nos três meses (Maio, Junho e Julho) precedentes ao primeiro mês de gravidez (Agosto), é sugestiva da ocorrência de armazenamento de espermatozoides no útero. A condição de estro pós-parto possibilita a produção pelas fêmeas de um a quatro filhotes por ano.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o suporte técnico fornecido por Luiz Roberto Falleiros Junior e a ajuda nas coletas dos animais por Manuela Tosi Comelis. Agradecemos a bolsa de estudos concedida a Larissa Mayumi Bueno pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abhilasha; Krishna, A. (1996). High androgen production by ovarian thecal interstitial cells: A mechanism for delayed ovulation in a tropical vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 106, 207–211.
- Aguiar, L.M.S.; Antonini, Y. (2008). Diet of two sympatric insectivores bats (Chiroptera: Vespertilionidae) in the Cerrado of Central Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 25(1), 28-31.
- Araújo, R.A.; Amaro, B.D.; Talamoni, S.A.; Godinho, H.P. (2013). Seasonal Reproduction of Yellowish *Myotis*, *Myotis levis* (Chiroptera: Vespertilionidae), from a Neotropical Highland. *Journal of Morphology*, 274(11), 1230-1238.
- Barquez, R.M.; Mares, M.A.; Braun, J.K. (1999). The Bats of Argentina. Lubbock: Special Publications of the Museum of Texas Tech University.
- Beguelini, M.R.; Moreira, P.R.L.; Faria, K.C.; Marchesin, S.R.C.; Morielle-Versute, E. (2009). Morphological Characterization of the Testicular Cells and Seminiferous Epithelium Cycle in Six Species of Neotropical Bats. *Journal of Morphology*, 270, 943-953.
- Beguelini, M.R.; Puga, C.C.I.; Martins, F.F.; Betoli, A.H.S.; Taboga, S.R.; Morielle-Versute, E. (2013). Morphological Variation of Primary Reproductive Structures in Males of Five Families of Neotropical Bats. *The Anatomical Record*, 296, 156-167.
- Bernard, R.T.F; Happold, D.C.D.; Happold, M. (1997). Sperm storage in a seasonally reproducing African vespertilionid, the banana bat (*Pipistrellus nanus*) from Malawi. *Journal of Zoology*, 241, 161-174.

Bianconi, G.V.; Pedro, W.A. (2007). Família Vespertilionidae. In: Reis, N.R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A.; Lima, I.P. (Eds.), *Morcegos do Brasil*. Londrina, 167-187.

Bueno, L.M.; Beguelini, M.R.; Comelis, M.T.; Taboga, S.R.; Morielle-Versute, E. (2014). Ultrastructure of spermatogenesis, spermatozoon and processes of testicular regression and recrudescence in *Eptesicus furinalis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Animal Reproduction Science*, 148, 228-244.

Carter, A.M.; Mess, A. (2008). Evolution of the Placenta and Associated Reproductive Characters in Bats. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)*, 310B, 428-449.

Crichton, E.G.; Krutzsch, P.H. (1987). Reproductive biology of the female little mastiff bat, *Mormopterus planiceps* (Chiroptera: Molossidae) in southeast Australia. *The American Journal of Anatomy*, 178, 369-386.

Crichton, E.G.; Krutzsch, P.H. (2000). Reproductive biology of bats. (London: Academic Press).

Crichton, E.G. (2000). Sperm Storage and Fertilization. In: Crichton, E.G.; Krutzsch, P.H. (Eds.), *Reproductive Biology of Bats*. London, Academic Press.

De Knegt, L.V.; Silva, J.A.; Moreira, E.C.; Sales, G.L. (2005). Morcegos capturados no município de Belo Horizonte, 1999–2003. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57, 576-583.

Fazzolari-Corrêa, S. (1995). Aspectos sistemáticos, ecológicos e reprodutivos de morcegos na Mata Atlântica. **Tese Doutorado**. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Fenton, M.B.; Simmons, N.B. (2014). Bats: a world of Science and mystery. (The University of Chicago Press).

Fleming, T.H. (1971). *Artibeus jamaicensis*: delayed embryonic development in a neotropical bat. *Science*, New Series, 171, 402-404.

Gopalakrishna, A.; Madhavan, A. (1978). Viability of inseminated spermatozoa in the Indian vespertilionid bat *Scotophilus heathi* (Horsefield). *Indian Journal of Experimental Biology*, 16, 852-854.

Hood, C.S.; Smith, J.D. (1982). Cladistical analysis of female reproductive histomorphology in phyllostomatid bats. *Systematic Zoology*, 31, 241-251.

- Hood, C.S.; Smith, J.D. (1983). Histomorphology of the female reproductive tract in phyllostomid bats. *Occasional Papers of the Museum of Texas Tech University*, 86, 1-38.
- Hood, C.S. (1989). Comparative morphology and evolution of the female reproductive tract in macroglossine bats (Mammalia, Chiroptera). *Journal of Morphology*, 199, 207-221.
- Kardong, K.V. (2010). Vertebrates: comparative anatomy, function e evolution. (New York: McGraw Hill).
- Komar, C.M.; Zacharachis-Jutz, F.; Cretekos, C.J.; Behringer, R.R.; Rasweiler IV, J.J. (2007). Polarized ovaries of the long-tongued bat, *Glossophaga soricina*: a novel model for studying ovarian development, folliculogenesis, and ovulation. *The Anatomical Record*, 290, 1439-1448.
- Krishna, A.; Dominic, C.J. (1978). Storage of spermatozoa in the female genital tract of the vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 319-321.
- Krishna, A.; Dominic, C.J. (1981). Reproduction in the vespertilionid bat, *Scotophilus heathi* Horsfield. *Archives de Biologie (Bruxelles)*, 92, 247-258.
- Krishna, A. (1985). Reproduction in the Indian pigmy pipistrelle bat, *Pipistrellus mimus*. *Journal of Zoology*, 206, 41-51.
- Kunz, T.H.; Anthony, E.L.P. (1982). Age estimation and post-natal growth in the bat *Myotis lucifugus*. *Journal of Mammalogy*, 63, 23-32.
- Kunz, T.H. (1974). Reproduction, growth, and mortality of the vespertilionid bat, *Eptesicus fuscus*, in Kansas. *Journal of Mammalogy*, 55, 1-13.
- Kurta, A.; Kunz, T.H. (1987). Size of bats at birth and maternal investment during pregnancy. *Symposia of the Zoological Society of London*, 57, 79-106.
- Luckett, W.P. (1974). Comparative development and evolution of the placenta in primates. *Contributions to Primatology*, 3, 142-234.
- Martins, L.L.; Biagioni, M.M.; Oliveira, F.S.; Toniollo, G.H.; Pacheco, M.R.; Machado, M.R.F. (2011). Morfologia do útero de cutias nulíparas e não nulíparas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63.
- Mies, R.; Kurta, A.; King, D.G. (1996). *Eptesicus furinalis*. *Mammalian species*, 526, 1-7.

Morais, D.B.; Paula, T.A.R.; Freitas, K.M.; Matta, S.L.P. (2012). Cycle of the seminiferous epithelium of the bat *Molossus molossus*, characterized by tubular morphology and acrosomal development. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 1(4), 303-307.

Morais, D.B.; Oliveira, L.C.; Cupertino, M.C.; Freitas, K.M.; Freitas, M.B.D.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P. (2013). Organization and Seasonal Quantification of the Intertubular Compartment in the Bat *Molossus molossus* (Pallas, 1776) Testis. *Microscopy Research and Technique*, 76, 94-101.

Myers, P. (1977). Patterns of reproduction of four species of vespertilionid bats in Paraguay. *University of California Publications in Zoology*, 107, 1-41.

Odukoya, S.A.; Adeeyo, O.A.; Ofusori, D.A.; Caxton-Martins, A.E.; Ayoka, O.A.; Oyewo, O.O.; Babatunde, L.S.; Yusuf, U.A.; Adegoke, A.A.; Ishola, O.O. (2008). Histological investigation of the pregnant and non pregnant uterine limbs of the frugivorous bat (*Eidolon helvum*). *International Journal of Integrative Biology*, 3(3), 169-174.

Potts, D.M.; Racey, P.A. (1971). A light and electron microscope study of early development in the bat *Pipistrellus pipistrellus*. *Micron*, 2, 322-348.

Racey, P.A. (1979). The prolonged storage and survival of spermatozoa in Chiroptera. *Journal of Reproduction and Fertility*, 56, 391-402.

Rasweiler IV, J.J.; Badwaik, N.K. (1997). Delayed development in the short-tailed fruit bat, *Carollia perspicillata*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 109, 7-20.

Rasweiler IV, J.J.; Badwaik, N.K. (2000). Anatomy and physiology of the female reproductive tract. In: Crichton, E.G.; Krutzsch, P.H (Eds.) *Reproductive biology of bats*. (Academic Press: New York).

Rasweiler IV, J.J.; Bonilla, H. (1992). Menstruation in short-tailed fruit bats (*Carollia* spp.). *Journal of Reproduction and Fertility*, 95, 231-248.

Rasweiler IV, J.J.; Badwaik, N.K.; Mechineni, K.V. (2010). Selectivity in the transport of spermatozoa to oviductal reservoirs in the menstruating fruit bat, *Carollia perspicillata*. *Reproduction*, 140, 743-757.

Rasweiler IV, J.J. (1990). Implantation, development of the fetal membranes and placentation in the captive black mastiff bat, *Molossus ater*. *The American Journal of Anatomy*, 187, 109-136.

Rasweiler IV, J.J. (1991). Spontaneous decidual reactions and menstruation in the black mastiff bat, *Molossus ater*. *The American Journal of Anatomy*, 191, 1-22.

Reis, N.R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A.; Lima, I.P. (2007). *Morcegos do Brasil*. (Londrina).

Reis, S.F. (1980). Biologia reprodutiva de *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Chiroptera, Phyllostomidae). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Ribeiro, M.G.; Lima, S.R. (2000). Iniciação às técnicas de preparação de material para o estudo e pesquisa em morfologia. (Belo Horizonte: SEGRAC-Editora e Gráfica Limitada).

Stephens, R.J. (1962). Histology and histochemistry of the placenta and fetal membranes in the bat, *Tadarida brasiliensis cynocephala* (with notes on maintaining pregnant bats in captivity). *The American Journal of Anatomy*, 111, 259-286.

Taddei, V.A. (1980). Biologia reprodutiva de Chiroptera: perspectivas e problemas. *Interfaces*, 6, 1-18.

Vicente, E.C.; Emiliani, V.C.; Oliveira, L.F.; Favero, S. (2006). Análise morfométrica e anatômica do útero em famílias de quirópteros (Mammalia) que ocorrem no Brasil. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, 10, 63-73.

Wang, Z.; Liang, B.; Racey, P.; Wang, Y.L.; Zhang, S.Y. (2008). Sperm storage, delayed ovulation and menstruation of the female Rickett's big-footed bat (*Myotis ricketti*). *Zoological Studies*, 47, 215-221.

Weichert, C.K. (1966). *Elementos de Anatomia de los Cordados*. (Madrid: Ediciones Castilla).

Wimsatt, W.A. (1945). Notes on breeding behaviour, pregnancy and parturition in some vespertilionid bats of the eastern United States. *Journal of Mammalogy*, 26, 23-33.

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

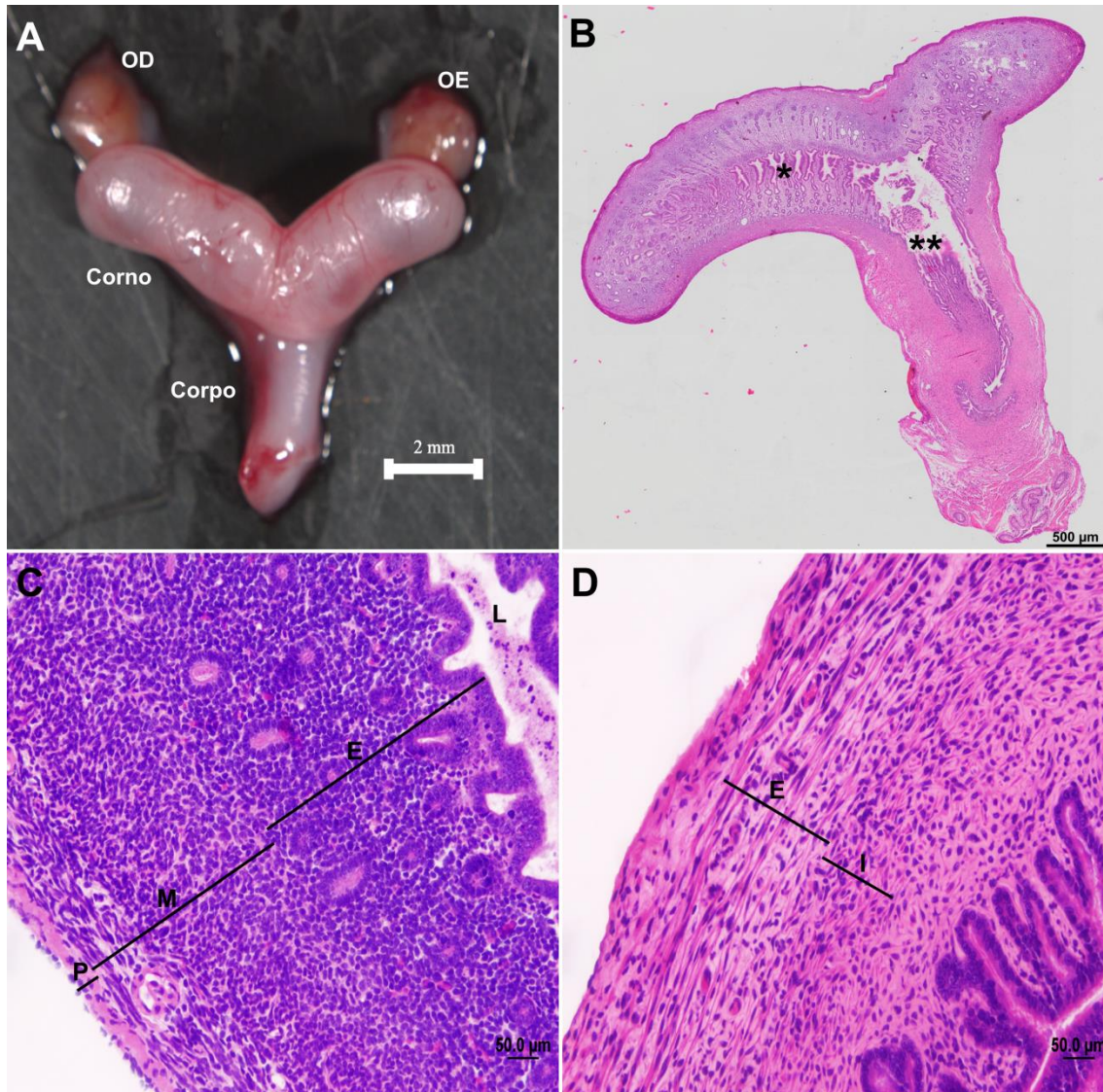


Figura 01. Anatomia e histologia geral do útero de *Eptesicus furinalis*. **A.** Anatomia geral do útero bicórneo. **B.** Histologia geral do útero bicórneo, onde os lúmens (*) dos cornos uterinos se fundem formando um único lúmen (**) do corpo uterino. **C.** A parede uterina é dividida em três camadas: a camada mais externa, o perimétrio (P); a camada muscular intermediária, o miométrio (M), e a camada mais interna, o endométrio (E). **D.** O miométrio é dividido em duas camadas, uma mais externa (E) com fibras musculares longitudinais e uma mais interna (I), com fibras musculares circulares. Cortes histológicos corados com Hematoxilina-eosina.

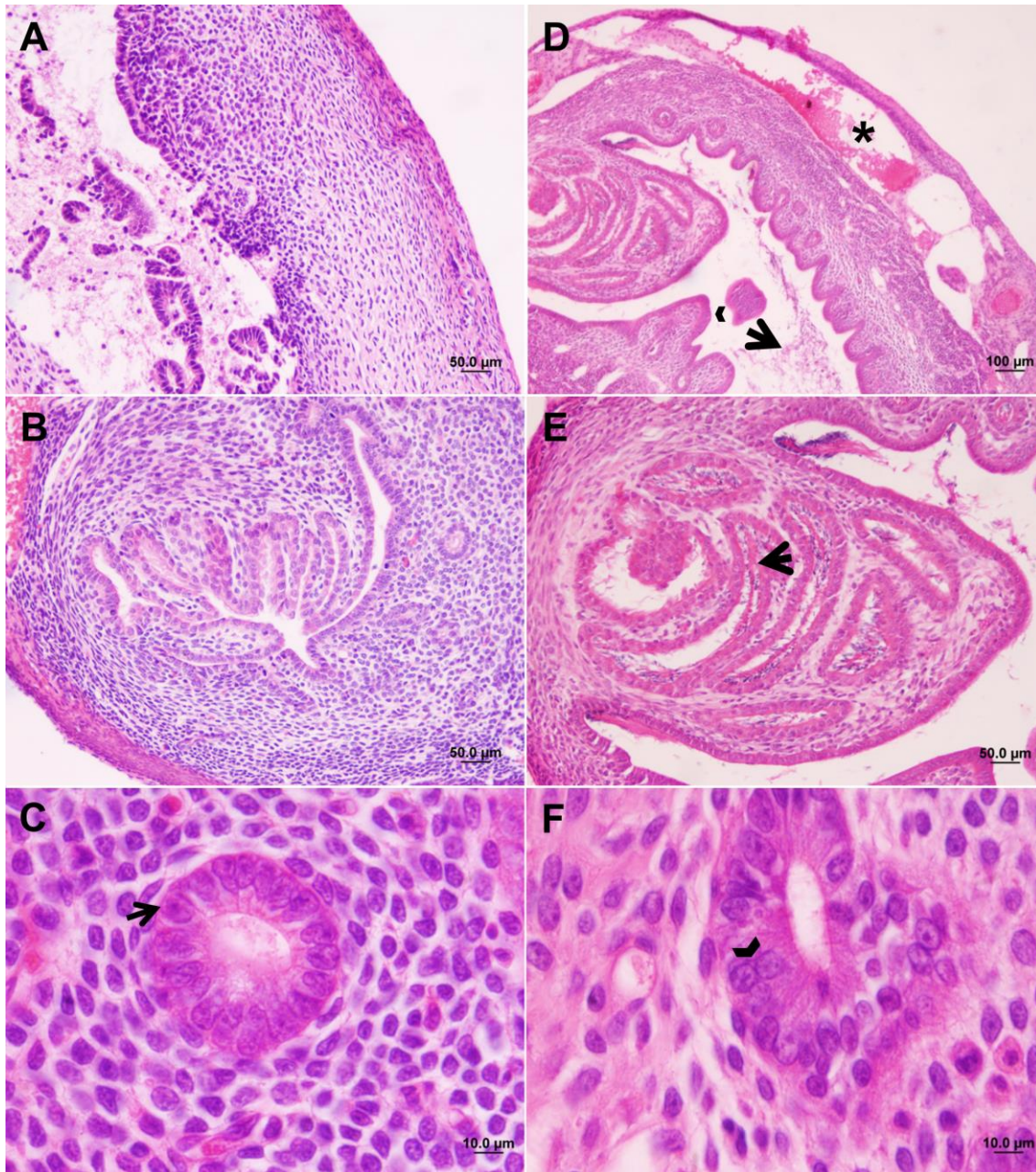


Figura 2. Morfologia do útero de fêmeas não reprodutivas. **Categoria A:** **A.** Morfologia do corno uterino, sem a presença de espermatozoides na luz uterina. **B.** Extremidade intramural da junção tubouterina sem a presença de espermatozoides. **C.** Glândulas do endométrio com epitélio simples colunar e o núcleo (**seta**) periférico. **Categoria B:** **D.** Morfologia geral do corno uterino com espermatozoides na luz uterina (**seta**), regiões onde o epitélio se encontra pseudoestratificado (**cabeça de seta**) e o útero se apresenta hiperêmico, ou seja, com alta vascularização (*). **E.** Extremidade intramural da junção tubouterina com espermatozoides (**seta**) em seu interior. **F.** Epitélio da glândula endometrial com atividade mitótica (**cabeça de seta**). Corado com Hematoxilina-eosina.

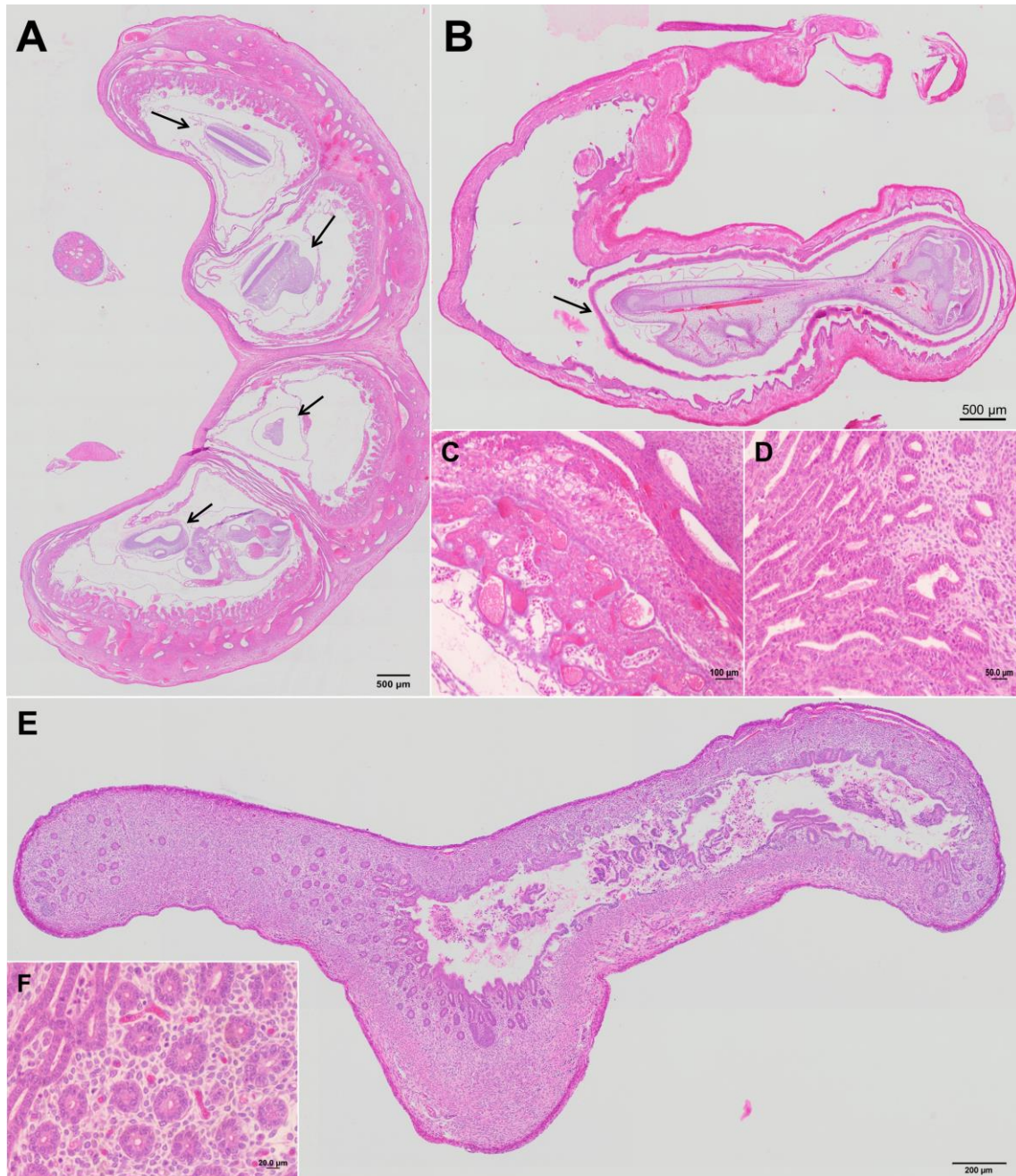


Figura 3. Morfologia do útero das fêmeas grávidas e das fêmeas lactantes. **A.** Útero contendo quatro embriões (*setas*), sendo dois em cada corno uterino, nos meses de Agosto e Setembro. **B.** Útero contendo apenas um feto no mês de Dezembro. **C.** Placenta desenvolvida no útero grávidico. **D.** Glândulas do endométrio com o lúmen desenvolvido no útero grávidico. **E.** Morfologia geral do útero de uma fêmea lactante de Novembro. **F.** Glândulas do endométrio sem o lúmen desenvolvido. Corado com Hematoxilina-eosina.

Capítulo 4

Variações morfológicas nos ovários de *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae: Chiroptera) durante o ciclo reprodutivo anual

Artigo a ser submetido para publicação na revista “Reproduction, Fertility and Development”.

Variações morfológicas nos ovários de *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae: Chiroptera) durante o ciclo reprodutivo anual

Larissa Mayumi Bueno^a; Mateus Rodrigues Beguelini^b; Sebastião Roberto Taboga^c; Eliana Morielle-Versute^a.

^a Departamento de Zoologia e Botânica, UNESP – Univ. Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil;

^b Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, UFOB – Univ. Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, Bahia, Brasil.

^c Departamento de Biologia, UNESP – Univ. Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil;

*Autor Correspondente: morielle@ibilce.unesp.br (E. Morielle-Versute).

RESUMO

Eptesicus furinalis é uma espécie neotropical de Vespertilionidae, a qual exhibe variação geográfica nos aspectos ecológicos reprodutivos. Nenhuma investigação mais detalhada sobre a morfofisiologia dos órgãos reprodutivos de fêmeas de *E. furinalis* foi feita até o momento. Portanto, nosso objetivo foi analisar e caracterizar as variações morfofisiológicas dos ovários e da concentração sérica de estradiol durante o ciclo reprodutivo anual das fêmeas da espécie, comparando-as com algumas variações ambientais (temperatura e pluviosidade). Nós analisamos a morfologia do ovário de 53 fêmeas adultas coletadas ao longo do ano na região noroeste do estado de São Paulo - Brasil. As variações na morfologia do ovário (peso, área, diâmetro e volume) não diferiram significativamente entre os ovários, bem como a quantidade de folículos, indicando atividade em ambos os ovários. A concentração sérica de estradiol variou durante os meses do ano, apresentando a maior concentração em Setembro. A espécie apresenta atividade reprodutiva de Agosto a Dezembro, onde foram observadas fêmeas grávidas e/ou lactantes, coincidindo com o período de maiores temperaturas e índice pluviométrico. A ocorrência de fêmea grávida e corpos lúteos nos ovários em Dezembro, bem como a variação na concentração de estradiol fornecem evidências da ocorrência de estro pós-parto na espécie.

Palavras-chave: estradiol, estro pós-parto, folículos ovarianos.

1. INTRODUÇÃO

Eptesicus furinalis (d'Orbigny e Gervais, 1847) é uma espécie neotropical de Vespertilionidae, a qual exibe uma grande dispersão geográfica, ocorrendo desde o México ao norte da Argentina, Paraguai, Bolívia, Brasil, Guianas e leste do Peru (Mies, Kurta e King, 1996; Simmons, 2005). Sua dieta é exclusivamente insetívora (LaVal e Fitch, 1977), tendo portanto, importante papel no controle populacional de insetos. Os machos dessa espécie apresentam um processo de regressão testicular, em que os testículos interrompem temporariamente a produção espermatogênica em, pelo menos, duas vezes ao longo do ano (Bueno *et al.*, 2014; Capítulo 1), apresentando um padrão reprodutivo bimodal.

Entretanto, alguns dados ecológicos apontam variação geográfica nos aspectos reprodutivos de *E. furinalis*, com reprodução contínua durante todo o ano (Davis, 1966) ou um padrão bimodal, com duas gestações por ano (Myers, 1977; McCarthy, 1980; González, 2001). Dados ecológicos para as fêmeas bimodais mostram que elas geralmente parem dois filhotes duas vezes ao ano, com partos em Maio e Julho-Agosto (McCarthy, 1980) em Belize, ou partos em Agosto e Janeiro (Myers, 1977) no Paraguai. A gestação tem duração de três meses e algumas fêmeas podem apresentar estro pós-parto (Myers, 1977; Barquez *et al.*, 1999).

Nenhuma investigação mais detalhada sobre a morfofisiologia dos órgãos reprodutivos de fêmeas de *E. furinalis* foi feita até o momento. Sabendo que a investigação apurada dos padrões reprodutivos anuais de uma espécie é ferramenta essencial para sua conservação, nosso objetivo foi analisar e caracterizar o ciclo reprodutivo anual das fêmeas de *E. furinalis*, investigando possíveis variações morfofisiológicas dos ovários e da concentração sérica de estradiol.

2. METODOLOGIA

2.1. Espécie, coletas, licenças e condições climáticas

Eptesicus furinalis não está listada como ameaçada de extinção na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da International Union for Conservation of Nature (IUCN).

Fêmeas adultas da espécie foram coletadas mensalmente na região de São José do Rio Preto - SP (20°49'11''S, 49°22'45''W) no período de Setembro de 2013 a Julho de 2017. As coletas foram realizadas no período noturno com o uso de redes de neblina

colocadas estrategicamente na rota de voo dos animais (Autorização de coleta: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente - IBAMA - Licença número: 21707-1; Sisbio: 59765825-13/04/2010). Após a captura e identificação dos animais (Bianconi e Pedro, 2007), as fêmeas foram devidamente acondicionadas em gaiolas individuais (40 x 20 x 20 cm) com água *ad libitum* e, como padronização, os procedimentos em laboratório ocorreram sempre na manhã seguinte à captura.

A amostra consistiu de 53 fêmeas adultas (Tabela 1 - anexo), condição verificada pelo peso corporal, completa ossificação das articulações metacarpo-falangeanas e grau de desgaste dentário (Kunz e Anthony, 1982; de Knecht *et al.*, 2005).

Todos os procedimentos foram devidamente autorizados pela Comissão de Ética no Uso Animal - CEUA do IBILCE/UNESP (Processo 102/2014-CEUA) e os espécimes foram depositados na Coleção de Chiroptera do Departamento de Zoologia e Botânica do IBILCE/UNESP.

Dados da variação média mensal da temperatura e da pluviosidade dos anos de 2013 a 2017 na região de São José do Rio Preto foram obtidos através do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO - <http://www.ciiagro.sp.gov.br>).

2.2. Preparação dos tecidos e análise do material

Os animais foram eutanasiados por anestesia profunda, com a aplicação de uma mistura de ketamina (370 mg/kg; Dopalen-Vertebrands, Paulínia, SP, Brazil) e xilazina (16 mg/kg; Rompun-Bayer S.A., São Paulo, SP, Brazil) aplicada subcutaneamente em uma quantidade de 0,1 ml para cada 50 gramas de peso corporal (0,08 ml de ketamina mais 0,02 ml de xilazina).

Após os animais serem pesados, o sangue foi retirado através da punção cardíaca, centrifugado e o plasma armazenado a -18°C. Posteriormente, os ovários foram cuidadosamente retirados, pesados e fixados em solução fixadora de metanol: clorofórmio: ácido acético (6:3:1) por 3 horas a 4°C, desidratados em álcool, clarificados em xilol e incluídos em parafina (Histosec – MERCK, Darmstadt, Germany). Cortes de 5µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo, submetidos à coloração de Hematoxilina e Eosina (Ribeiro e Lima, 2000) e analisados e fotodocumentados com o uso do Scanner de imagens Olympus BX-VCB, com auxílio de software de captura e análise de imagem VS-ASW do Laboratório de Microscopia e Microanálise do IBILCE/UNESP.

2.3. Análises morfométricas e quantificação folicular

Os diâmetros dos ovários direito e esquerdo foram medidos utilizando o software Image Pro-Plus-Media Cybernetics versão 6.1 para Windows. Como o ovário de *E. furinalis* apresenta o formato redondo-ovalado (Bueno, 2018), o diâmetro de cada ovário foi calculado através da equação proposta por Willians (1977):

$$\text{Diâmetro (D)} (\mu\text{m}) = \sqrt{ab}$$

Onde **a** corresponde a medida do diâmetro dos ovários e **b** ao diâmetro no ângulo de 90°, ambos na região mais central dos ovários.

Posteriormente, a média do diâmetro (D) foi calculada para cada ovário e então utilizada para o cálculo da área e do volume:

$$\text{Área do ovário/corpo lúteo (mm}^2\text{)} = 4\pi r^2, \text{ onde } r = \frac{D}{2}$$

$$\text{Volume do ovário/corpo lúteo (mm}^3\text{)} = \frac{4}{3}\pi r^3$$

Os folículos foram classificados em primordial, primário, secundário, terciário e antral de acordo com o descrito por Bueno et al., 2018, e a frequência dos estádios dos folículos, bem como dos folículos em atresia foi avaliada em cinco cortes para cada ovário por animal. Foram incluídos nas contagem apenas os folículos que apresentaram o núcleo do oócito no plano de corte. A frequência da quantificação folicular foi expressa como porcentagem da população total.

2.4. ELISA

A concentração de estradiol sérica foi dosada através do método ELISA, usando o kit comercial AccuBindMicroplate EIA Test System (Monobind Inc., Lake Forest, CA, USA - Código 4925-300), com sensibilidade de 8,2 pg/ml. As leituras foram realizadas em leitor EpochMicroplateSpectrophotometer (BiotekInstruments, Inc., VT, USA).

2.5. Análises estatísticas

Médias e erro padrão foram calculados para todos os dados. A normalidade foi verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov e as diferenças entre os grupos foram calculadas através do teste Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn para múltiplas comparações, utilizando o valor de $p \leq 0,05$ para a diferença significativa entre os grupos. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prisma versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA, www.graphpad.com).

3. RESULTADOS

3.1. Análises biométricas

O peso médio corporal das fêmeas entre todos os meses foi de 7,05 gramas $\pm$ 0,32 e diferiu significativamente apenas em Outubro, onde as fêmeas estavam grávidas e apresentaram um sobrepeso de 49% da média anual (**Figura 1A**).

Em relação aos ovários, não foi possível amostrar o peso desses no mês de Setembro, uma vez que os ovários não foram isolados dos úteros durante o processamento histológico, e os pesos individuais de cada órgão não foram obtidos. De uma forma geral, o peso do ovário direito (**Figura 1B**) foi maior que o peso do ovário esquerdo (**Figura 1C**) ao longo do ano. Apesar de cada ovário exibir variação nos pesos ao longo do ano, não foram encontradas diferenças significativas entre os meses.

3.2. Análises morfométricas

Os valores das médias do diâmetro, da área e o volume dos ovários direito e esquerdo estão apresentados na Tabela 2 no Anexo.

O ovário esquerdo apresentou um crescimento progressivo do diâmetro (**Figura 2A**), área (**Figura 2C**) e volume (**Figura 2E**) durante o ano até o mês de Julho. No ovário direito, o mês de Setembro apresentou maiores valores no diâmetro (**Figura 2B**), área (**Figura 2D**) e volume (**Figura 2F**) em relação aos outros meses do ano. Não houve nenhuma diferença significativa quando comparados o diâmetro, área e volume de cada mês entre os ovários direito e esquerdo.

3.3. Quantificação folicular

Os valores das porcentagens de cada folículo nos ovários direito e esquerdo estão apresentados Tabela 3 no Anexo.

As frequências nos ovários direito e esquerdo dos diferentes tipos de folículos (primordiais, primários, secundários, terciários e antrais), bem como as frequências de atresia nos ovários esquerdo e direito estão representadas nos gráficos das **Figuras 3 e 4**. De uma forma geral, a frequência de todos os folículos somados foi maior no ovário esquerdo (**Figura 4C**) do que no ovário direito (**Figura 4D**). Apesar da variação encontrada na quantidade folicular, não houve nenhuma diferença significativa entre os meses em ambos os ovários ao longo do ano.

3.4. Ciclo reprodutivo anual

A condição do estágio reprodutivo das fêmeas variou ao longo do ano. Fêmeas não reprodutivas, ou seja, que não estavam grávidas ou lactantes foram encontradas durante os meses de Janeiro a Julho. Em Agosto e Setembro foram encontradas fêmeas grávidas, em Outubro e Dezembro, grávidas e lactantes concomitantemente, e em Novembro, apenas fêmeas lactantes.

Em Janeiro (**Figura 5A e 5B**), os ovários esquerdo e direito apresentaram folículos primordiais, folículos primários, folículos secundários e alguns folículos em atresia, exceto por uma fêmea, que também exibiu folículos antrais em ambos os ovários. Nos meses de Fevereiro (**Figura 5C e 5D**) e Março (**Figura 5E e 5F**), além dos folículos primordiais, primários e secundários, os ovários esquerdo e direito também apresentaram folículos terciários iniciais, e alguns folículos em atresia. Os folículos terciários estão aparentemente maiores em Abril (**Figura 6A e 6B**) em ambos os ovários, que também possuem folículos primordiais, primários, secundários e alguns folículos atresícos.

Em Maio (**Figura 6C e 6D**) e Junho (**Figura 6E e 6F**), além dos folículos primordiais, primários, secundários e terciários, os ovários esquerdo e direito também apresentaram folículos antrais e folículos em atresia. Em Julho (**Figura 7A e 7B**), além dos folículos primordiais, primários, secundários e terciários, ambos os ovários apresentaram folículos antrais e folículos em atresia. As células estromais e glândulas intersticiais apresentaram pouco volume citoplasmático de Janeiro a Maio e, um maior volume citoplasmático e citoplasma com aspecto vacuolar em Junho e Julho. A presença de folículos antrais nos ovários de Maio a Julho indica uma pré-atividade reprodutiva das fêmeas.

Em Agosto (**Figura 7C e 7D**) foram encontrados desde folículos primordiais até folículos antrais, e também alguns folículos em atresia. Além disso, foram encontrados, em ambos os ovários, a formação inicial de um a dois corpos lúteos (luteinização das células foliculares). O volume citoplasmático das células do estroma e glândulas intersticiais voltou a diminuir a partir desse mês. Em Setembro (**Figura 7E e 7F**), foram encontrados desde folículos primordiais até folículos antrais e também alguns folículos em atresia, além disso, foram encontrados, nos dois ovários, de um a dois corpos lúteos. Em Outubro (**Figura 8A e 8B**) não foram observados nenhum corpo lúteo em ambos os ovários, que só apresentavam desde folículos primordiais até folículos secundários, com exceção de uma fêmea, a qual exibiu folículos terciários e folículos antrais. Entretanto,

em Outubro, tanto o ovário esquerdo quanto o ovário direito continham muitos folículos atresícos. Em Novembro (**Figura 8C e 8D**), os ovários apresentaram folículos primordiais até folículos antrais, alguns folículos em atresia, e algumas fêmeas exibiram corpo lúteo e corpo *albicans*. Em Dezembro (**Figura 8E e 8F**), os ovários de algumas fêmeas apresentaram corpo *albicans*, e desde folículos primordiais até folículos antrais, além de folículos em atresia. Uma fêmea que estava em gravidez avançada, apresentou também um corpo lúteo em cada ovário. As células do estroma e glândulas intersticiais apresentaram volume citoplasmático reduzido nesse período.

3.5. Variação anual na concentração de estradiol

A concentração de estradiol no plasma variou entre os meses do ano (**Figura 9**), porém de forma não significativa. Os meses de Março, Setembro, Outubro e Novembro apresentaram as maiores concentrações de estradiol no ano.

No período de Janeiro a Março, a concentração de estradiol permaneceu praticamente constante. Em Abril houve uma queda na concentração de estradiol, porém em Maio, a concentração alcançou valores próximos aos dos meses anteriores. Durante o período de Junho a Agosto, houve uma ligeira diminuição na concentração do estradiol e, durante o período de Setembro a Dezembro, a concentração do estradiol teve uma grande variação, com o maior valor da concentração do ano no mês de Setembro.

3.6. Temperatura e Pluviosidade

A temperatura média durante os anos de 2013 a 2017 foi de 24°C (**Figura 10**), sendo que os meses de Outubro a Março apresentaram as maiores médias de temperatura do ano, enquanto que os meses de Maio a Agosto apresentaram as menores médias de temperatura.

Em relação à pluviosidade, a média durante os anos de 2013 a 2017 foi de 88 mm (**Figura 10**). Os maiores valores das médias de pluviosidade ocorreram nos meses de Novembro a Março, enquanto que os menores valores de pluviosidade ocorreram de Abril a Agosto.

4. DISCUSSÃO

Os morcegos apresentam a maior variedade de estratégias reprodutivas dentre todos os mamíferos (Rasweiler e Badwaik, 2000). Dentre essa variedade, podemos citar os seis diferentes padrões relacionados à assimetria do trato reprodutivo das fêmeas,

descrito por Wimsatt (1979): 1) padrão “megaderma”, em que a ovulação ocorre predominantemente pelo ovário esquerdo; 2) padrão “molossídeo”, em que o ovário direito é o ovário dominante; 3) padrão “miniopterus”, em que ocorre uma dominância contra lateral, ou seja, a ovulação ocorre pelo ovário esquerdo e a implantação ocorre no corno uterino direito; 4) padrão “filostomídeo”, onde ocorre uma alternância de ovulação entre ambos os ovários; 5) padrão “myotis”, onde a ovulação ocorre por ambos os ovários e em igual frequência e 6) padrão “pteropodidae”, onde há uma alternância de ovulação não randômica entre os ovários direito e esquerdo.

Baseado em nossos resultados, observamos que *E. furinalis* está inserida no padrão “myotis”, uma vez que ambos os ovários apresentaram ovulação em igual frequência, e também pela ausência de diferença significativa entre os diâmetros dos ovários direito e esquerdo, uma vez que, de acordo com Rasweiler e Badwaik, 2000, quando a ovulação ocorre predominantemente pelo mesmo ovário, este apresenta um maior diâmetro, mesmo na ausência de folículos antrais e de corpo lúteo.

O ciclo reprodutivo anual de *E. furinalis* pode ser dividido em quatro períodos: i) quando as fêmeas se encontram não reprodutivas (de Janeiro a Junho), onde os ovários apresentam somente folículos primordiais, primários e secundários de Janeiro a Março, e a presença de folículos terciários e antrais a partir de Abril, indicando então, uma pré-atividade reprodutiva; ii) quando as fêmeas se encontram grávidas (Agosto), onde há a presença de corpos lúteos nos ovários; iii) quando as fêmeas se encontram grávidas e lactantes concomitantemente (Setembro, Outubro e Dezembro), onde os ovários apresentam corpos lúteos apenas em Setembro e Dezembro, e a ausência de corpo lúteo em Outubro provavelmente indica que o corpo lúteo não persiste durante todo o período de gravidez da espécie; iv) quando as fêmeas se encontram somente lactantes (Novembro), onde os ovários exibem de folículos primordiais até folículos antrais e alguns folículos em atresia, e algumas fêmeas exibem corpo lúteo e corpo albicans.

Dados reprodutivos ecológicos de *E. furinalis* no estado de Rio de Janeiro – Brasil apontam que a espécie apresenta atividade reprodutiva em Julho-Agosto e terminam a atividade reprodutiva em Fevereiro-Março, sendo que provavelmente a espécie apresenta o mesmo ciclo reprodutivo de outras espécies tropicais em mesma latitude (Luz *et al.*, 2011). Já no Paraguai, espermatozoides foram observados no útero de *E. furinalis* em Maio, e fêmeas grávidas foram observadas em Julho e Agosto. Além disso, logo após o parto em Setembro/Outubro, as fêmeas apresentaram novamente

espermatozoides no útero, demonstrando então a ocorrência de cópula e estro pós-parto, em que as fêmeas se encontravam grávidas e lactantes concomitantemente, sendo que a segunda gravidez teve menor duração, com o parto ocorrendo em Janeiro (Myers, 1977).

A duração da gestação na espécie é de três meses (Myers, 1977). No presente estudo fêmeas grávidas de *E. furinalis* foram obtidas em Agosto, Setembro, e também em Dezembro, sendo que a presença de fêmeas grávidas nesses períodos infere na existência de estro pós-parto na espécie. O estro pós-parto já foi relatado para outras espécies de morcegos (Badwaik e Rasweiler, 2001), inclusive para *E. furinalis* (Myers, 1977; Barquez *et al.*, 1999). O intervalo entre o parto e o estro pós-parto em diferentes espécies pode variar conforme a anatomia do trato reprodutivo das fêmeas, a duração da lactação, além da capacidade suporte dos fatores ambientais, como a temperatura e a disponibilidade de alimentos. A vantagem do estro pós-parto, principalmente nas áreas tropicais onde a capacidade suporte do ambiente é maior, seria o aumento do potencial reprodutivo anual do animal (Badwaik e Rasweiler, 2000).

Os fatores ambientais como a temperatura e a pluviosidade na região de São José do Rio Preto têm os maiores índices na primavera e no verão, compreendendo os meses de Setembro a Março. O período de gestação e lactação do ciclo reprodutivo anual de *E. furinalis* se concentra durante os meses de Agosto a Dezembro, coincidindo com o período de altas temperaturas e pluviosidade. A gestação e a lactação são eventos com alto custo energético para a fêmea, portanto, a sincronia entre esses eventos e os fatores ambientais favoráveis é esperada. *E. furinalis* é uma espécie exclusivamente insetívora (Laval e Fitch, 1977), e um índice pluviométrico elevado, somado a altas temperaturas, favorecem a proliferação de insetos (Wolda, 1988), sendo portanto, um recurso abundante para o período de gravidez e lactação e, até mesmo, possibilitando a ocorrência do estro pós-parto.

A variação da concentração anual de estradiol no plasma sanguíneo mostrou um aumento da concentração de estradiol no final do período (Maio) em que as fêmeas estavam não reprodutivas, e também um aumento da concentração de estradiol no mês de Setembro, quando as fêmeas estavam grávidas e lactantes. O ovário é o principal órgão em que o estradiol é produzido e contém receptores nas células do estroma, da teca e da granulosa (Alonso e Rosenfield, 2002). De forma geral, os estrógenos atuam no desenvolvimento, fertilidade e comportamento das fêmeas de mamíferos (DeCatanzaro, 2015). Em fêmeas adultas, uma das funções dos estrógenos é induzir a

receptividade sexual (DeCatanzaro, 2015) e a liberação de LH que, por sua vez, vai atuar no processo de ovulação (Meikle *et al.*, 2001). Portanto, o aumento da concentração de estradiol em Maio e Setembro provavelmente está relacionado com um evento de ovulação posterior.

As células das glândulas intersticiais do ovário são provavelmente secretoras hormonais, uma vez que possuem características de células secretoras de esteróides, como o complexo de Golgi bem desenvolvido e a presença de vesículas lipídicas no citoplasma (Guraya, 1978). A distribuição das glândulas intersticiais varia entre diferentes espécies e de acordo com o ciclo reprodutivo dentro da mesma espécie, refletindo respostas a diferentes estímulos hormonais durante o ciclo reprodutivo (Mossman e Duke, 1973; Guraya e Gupta, 1979).

Em geral, as glândulas intersticiais nos mamíferos se tornam mais diferenciadas durante o período pré-copulatório (Guraya, 1978), característica que foi observada também nos ovários de *E. furinalis*. Além disso, a presença e o número de vesículas lipídicas no citoplasma das células estromais e das glândulas intersticiais também variam de acordo com o ciclo reprodutivo (Guraya, 1978), sendo que fêmeas não grávidas apresentam acúmulo das vesículas lipídicas no citoplasma das células estromais, enquanto que as fêmeas grávidas não apresentam acúmulo das vesículas lipídicas (Guraya, 1967). Em *E. furinalis*, a presença de citoplasma das células estromais com aspecto vacuolar no período de Janeiro a Julho, podem refletir a presença de vesículas lipídicas, provavelmente relacionadas com a biossíntese de esteroides (Flint *et al.*, 1973) no período.

Outro fato interessante a ser destacado é que ao compararmos os resultados das fêmeas com os dados reprodutivos obtidos para machos (Capítulo 1), parece haver uma adaptação entre o ciclo reprodutivo anual das fêmeas e o dos machos de *E. furinalis*. Conforme observado nos machos, estes exibem testículos regredidos durante o período de Maio-Julho, período determinado pelos dados das fêmeas, como o provável da ocorrência de cópula na espécie. Situação similar foi relatada para a espécie congênica *E. fuscus*, em que a cópula ocorre durante o Outono, quando os testículos se apresentam com pequeno volume (Mendonça *et al.*, 1996). A adaptação entre o ciclo reprodutivo de fêmeas e machos é esperada para as espécies tropicais, inclusive espécies tropicais de Vespertilionidae (Crichton, 2000).

5. CONCLUSÃO

Nosso trabalho apresentou a variação morfológica dos ovários durante o ciclo reprodutivo de *E. furinalis*. A espécie apresenta, na região de São José do Rio Preto – SP – Brasil, atividade reprodutiva de Agosto a Dezembro, onde foram observadas fêmeas grávidas, coincidindo com o período de maiores temperaturas e índice pluviométrico. Além disso, a ocorrência de fêmea grávida e corpos lúteos nos ovários em Dezembro, bem como a variação na concentração de estradiol fornecem evidências da ocorrência de estro pós-parto na espécie.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o suporte técnico fornecido por Luiz Roberto Falleiros Junior e a ajuda nas coletas dos animais por Manuela Tosi Comelis. Agradecemos a bolsa de estudos concedida a Larissa Mayumi Bueno pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, L. C., and Rosenfield, R. L. (2002). Oestrogens and puberty. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **16**, 13-30.
- Badwaik, N. K., and Rasweiler, J. J. (2000). Pregnancy. In: ‘Reproductive Biology of Bats’. (Eds E. G. Crichton and P. H. Kruttsch.) pp. 221-281. (AcademicPress: London.)
- Barquez, R. M., Mares, M. A., and Braun, J. K. (1999). “The Bats of Argentina” (Special Publications of the Museum of Texas Tech University: Lubbock.)
- Bianconi, G. V., and Pedro, W. A. (2007). Familia Vespertilionidae. In: ‘Morcegos do Brasil Reis’ (Eds N. R. Reis, A. L. Peracchi, W. A. Pedro, and I. P. Lima.) pp. 167-187. (Londrina.)
- Bueno, L. M., Beguelini, M. R., Comelis, M. T., Taboga, S. R., and Morielle-Versute, E. (2014). Ultrastructure of spermatogenesis, spermatozoon and processes of testicular regression and recrudescence in *Eptesicus furinalis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Anim. Reprod. Sci.* **148**, 228-244.
- Bueno, L. M., Caun, D. L., Comelis, M. T., Beguelini, M. R., Taboga, S. R., and Morielle-Versute, E. (2018). Ovarian morphology and folliculogenesis and ovulation process in the flat-faced fruit-eating bat *Artibeus planirostris* and the Argentine brown bat *Eptesicus furinalis*: A comparative analysis. *Acta Zool.* 1-12.
- Crichton, E. G. (2000). Sperm Storage and Fertilization. In: ‘Reproductive Biology of Bats’ (Eds E. G. Crichton, P. H. Kruttsch.) pp. 295-312 (AcademicPress: London.)

Davis, W. (1966). Review of South American bats of the genus *Eptesicus*. *Southw. Nat.* **11**, 245-274.

DeKnegt, L. V., Silva, J. A., Moreira, E. C., and Sales, G. L. (2005). Morcegos capturados no município de Belo Horizonte, 1999-2003. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* **57**, 576-583.

DeCatanzaro, D. (2015). Sex steroids as pheromones in mammals: The exceptional role of estradiol. *Horm. Behav.* **68**, 103-116.

Flint, A. P., Grinwich, D. L., and Armstrong, D. T. (1973) Control of ovarian cholesterol ester biosynthesis. *Biochem. J.* **132(2)**, 313-321.

González, E. M. (2001). 'Guía de Campo de los Mamíferos de Uruguay' (Montevideo: Vida Silvestre, Sociedade Uruguaya para la Conservación de la Naturaleza).

Guraya, S. S., and Gupta, S. K. (1979). Morphology and histochemistry of ovarian changes in the field rat. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **93**, 959.

Guraya, S. S. (1967). Cytochemical observations concerning the formation, release and transport of lipids secretory products in their interstitial (thecal) gland cells of the rabbit ovary. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **83**, 187-95.

Guraya, S. S. (1978). Recent Advances in the Morphology, Histochemistry, Biochemistry, and Physiology of Interstitial Gland Cells of Mammalian Ovary. *Int. Rev. Cytol.* **55**, 171-240.

Kunz T. H., and Anthony, E. L. P. (1982). Age estimation and post-natal growth in the bat *Myotis lucifugus*. *J. Mammal.* **63**, 23-32.

LaVal, R. K., and Fitch, H. S. (1977). Structure, movements and reproduction in three Costa Rican bats communities. *Occ. Pap. Mus. Zool.* **6**, 1-28.

Luz, J. L., Jordão-Nogueira, T., Costa, L. M., and Esbérard, C. E. L. (2011). Observações sobre *Eptesicus furinalis* (d'Orbigny e Gervais, 1847) (Vespertilionidae) em forros no Estado do Rio de Janeiro, Brazil. *Chirop. Neot.* **17(1)**.

McCarthy, T. J. (1980). Aspects of Reproduction in *Roughessa tumida* and *Eptesicus furinalis* from Belize. In: 'Annual Meeting, American Society of Mammalogists'.

Meikle, A., Forsberg, M., Garófalo, E.G., Carlsson, M. A., Lundeheim, N., Rubiane, E. (2001). Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrus ewes after treatment with estradiol-17 β . *Anim. Reprod. Sci.* **67**, 79-90.

Mendonça, M. T., Chernetsky, S. D., Nester, K. E., Gardner, G. L. (1996). Effects of Gonadal Sex Steroids on Sexual Behavior in the Big Brown Bat, *Eptesicus fuscus*, Upon Arousal from Hibernation. *Horm. Behav.* **30**, 153-161.

Mies, R., Kurta, A., and King, D. G. (1996). *Eptesicus furinalis*. *Mammal. spec.* **526**, 1-7.

- Mossman, H. W., and Duke, K. L. (1973). Some comparative aspects of the mammalian ovary. *Handb. Physiol.* **1**, 389-402.
- Myers, P. (1977). Patterns of reproduction of four species of vespertilionid bats in Paraguay. *Univ. Calif. publ. zool.* **107**, 1-41.
- Rasweiler, J. J., and Badwaik, N. K. (2001). Anatomy and Physiology of the Female Reproductive Tract. In: 'Reproductive Biology of Bats' (Eds E. G. Crichton, and P. H. Krutzsch) pp. 157-208 (Academic Press: London.)
- Ribeiro, M. G., and 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)
- Simmons, N. B. (2005). Order Chiroptera. In: 'Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference' (Eds D. E. Wilson, D. M. Reeder) pp. 312-529 (Jonh Hopkins University Press: Baltimore.)
- Willians, M. A. (1977). 'Practical methods in electron microscopy: Part 2. Quantitative methods in biology'. (North-Holland Publishing Company.)
- Wimsatt, W. A. (1979). Reproductive asymmetry and unilateral pregnancy in Chiroptera. *J. Reprod. Fertil.* **56**, 345-357.
- Wolda, H. (1988). Insect Seasonality: why? *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **19**, 1-18.

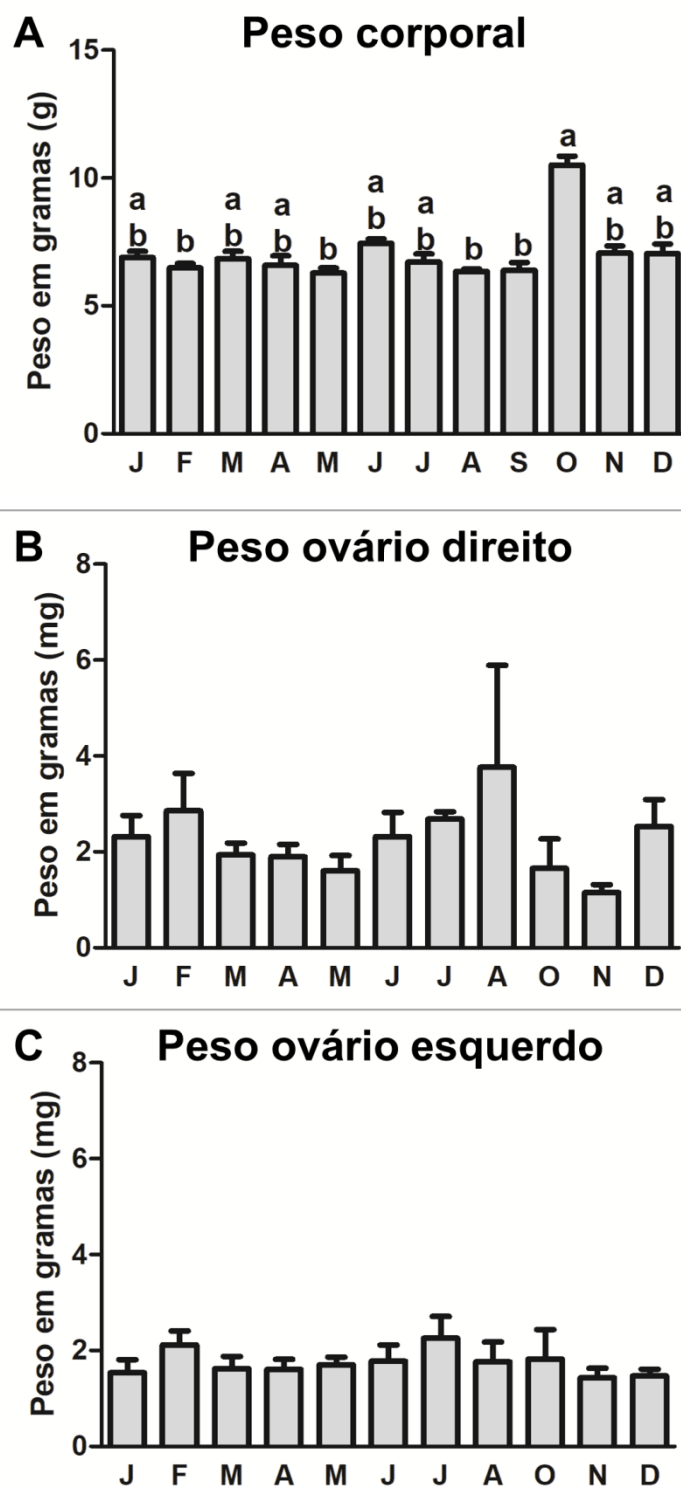


Figura 01. Representação gráfica das análises biométricas das fêmeas de *E. furinalis* ao longo de um ano. **A.** Média do peso corporal das fêmeas **B.** Média do peso do ovário direito. **C.** Média do peso do ovário esquerdo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

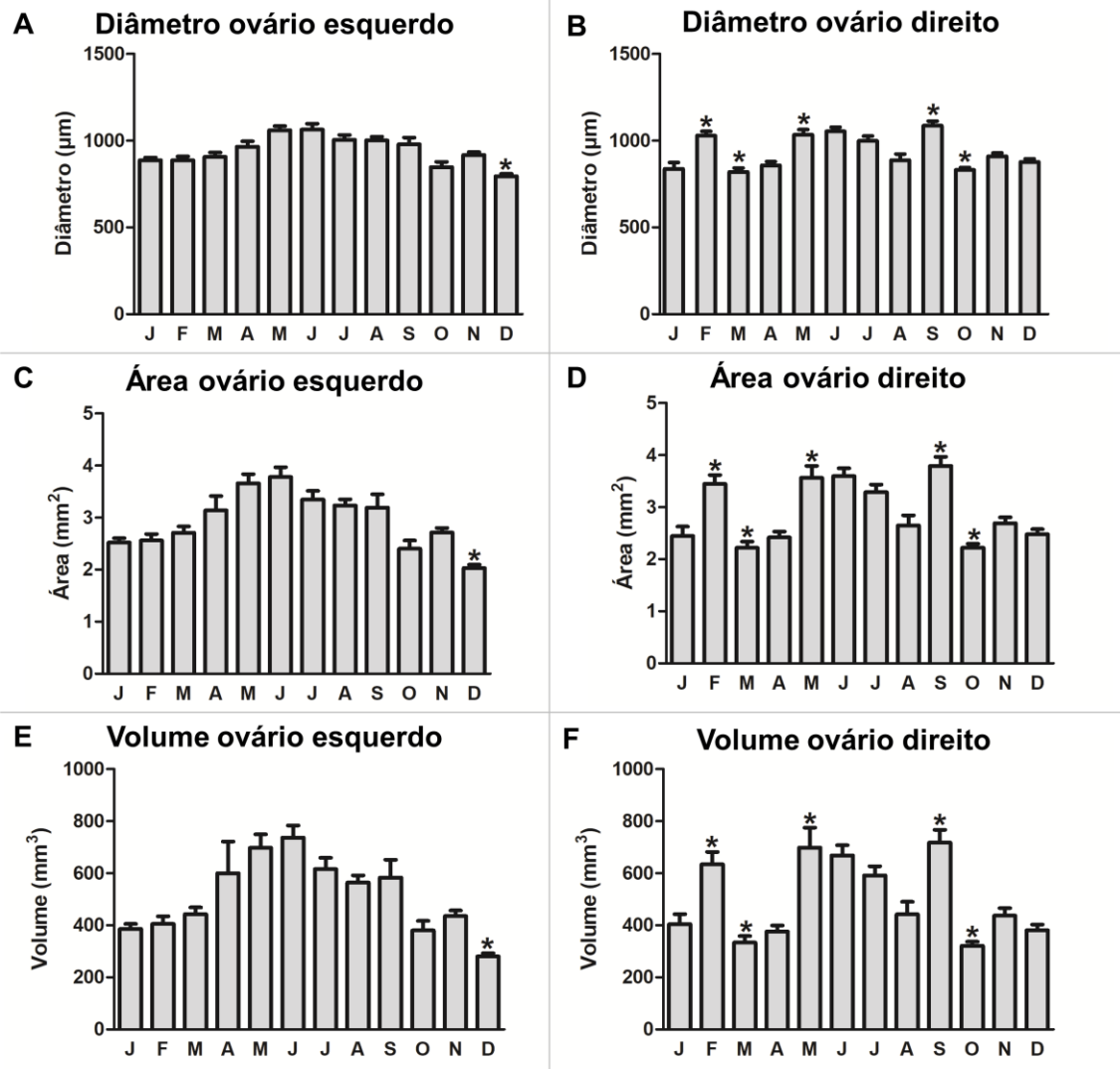


Figura 02. Representação gráfica das análises morfométricas nos ovários direito e esquerdo de *E. furinalis* ao longo de um ano. Médias do diâmetro (A), da área (C) e do volume (E) do ovário esquerdo. Médias do diâmetro (B), da área (D) e do volume (F) do ovário direito. Estrelas (*) indicam diferenças estatisticamente significantes relativo ao mês anterior ($p \leq 0,05$).

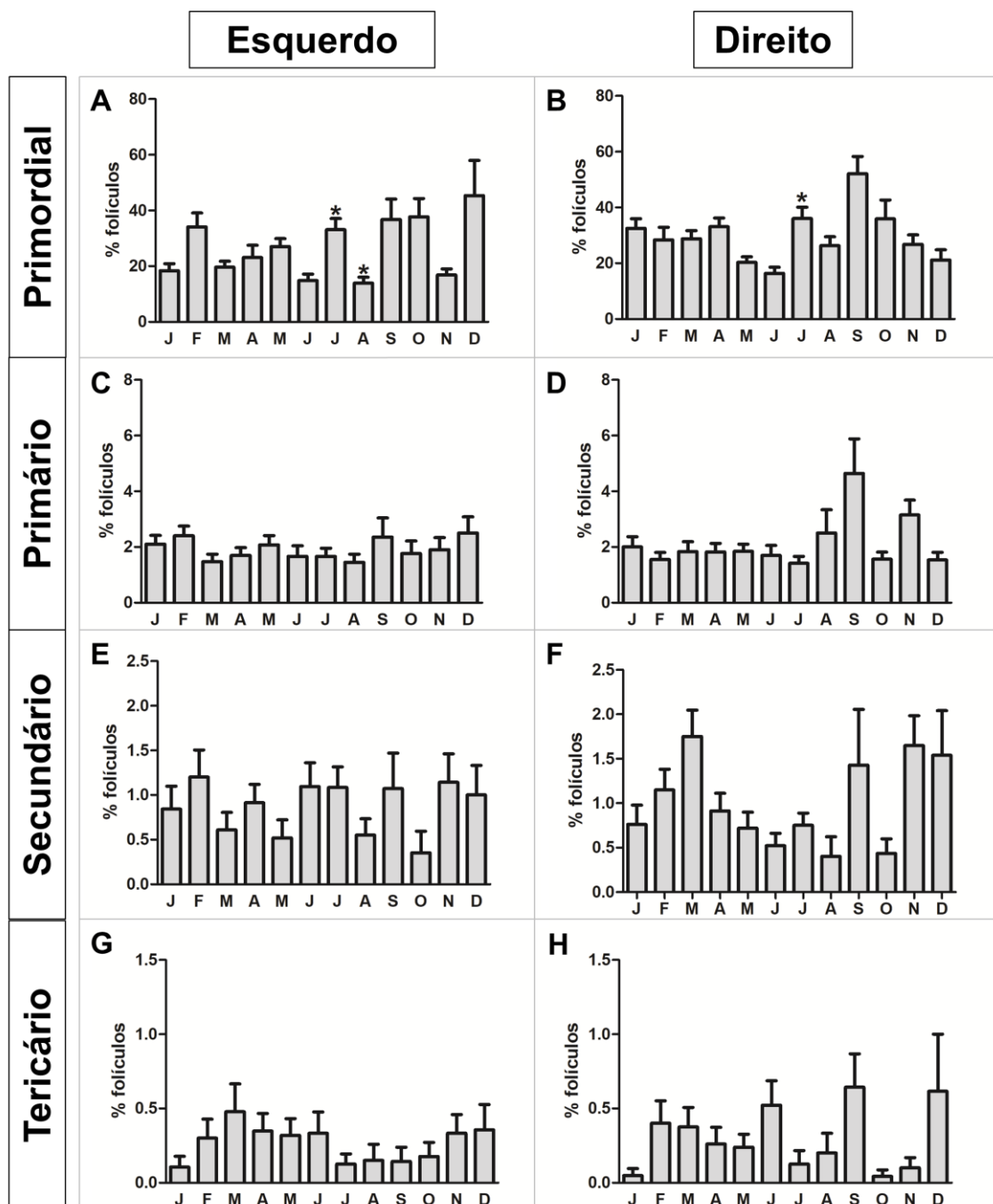


Figura 3. Quantificação folicular relativa nos ovários de *E. furinalis* ao longo do ano. Folículos primordiais no ovário esquerdo (**A**) e no ovário direito (**B**). Folículos primários no ovário esquerdo (**C**) e no ovário direito (**D**). Folículos secundários no ovário esquerdo (**E**) e no ovário direito (**F**). Folículos terciários no ovário esquerdo (**G**) e no ovário direito (**H**). Estrelas (*) indicam diferenças estatisticamente significantes relativo ao mês anterior ($p \leq 0,05$).

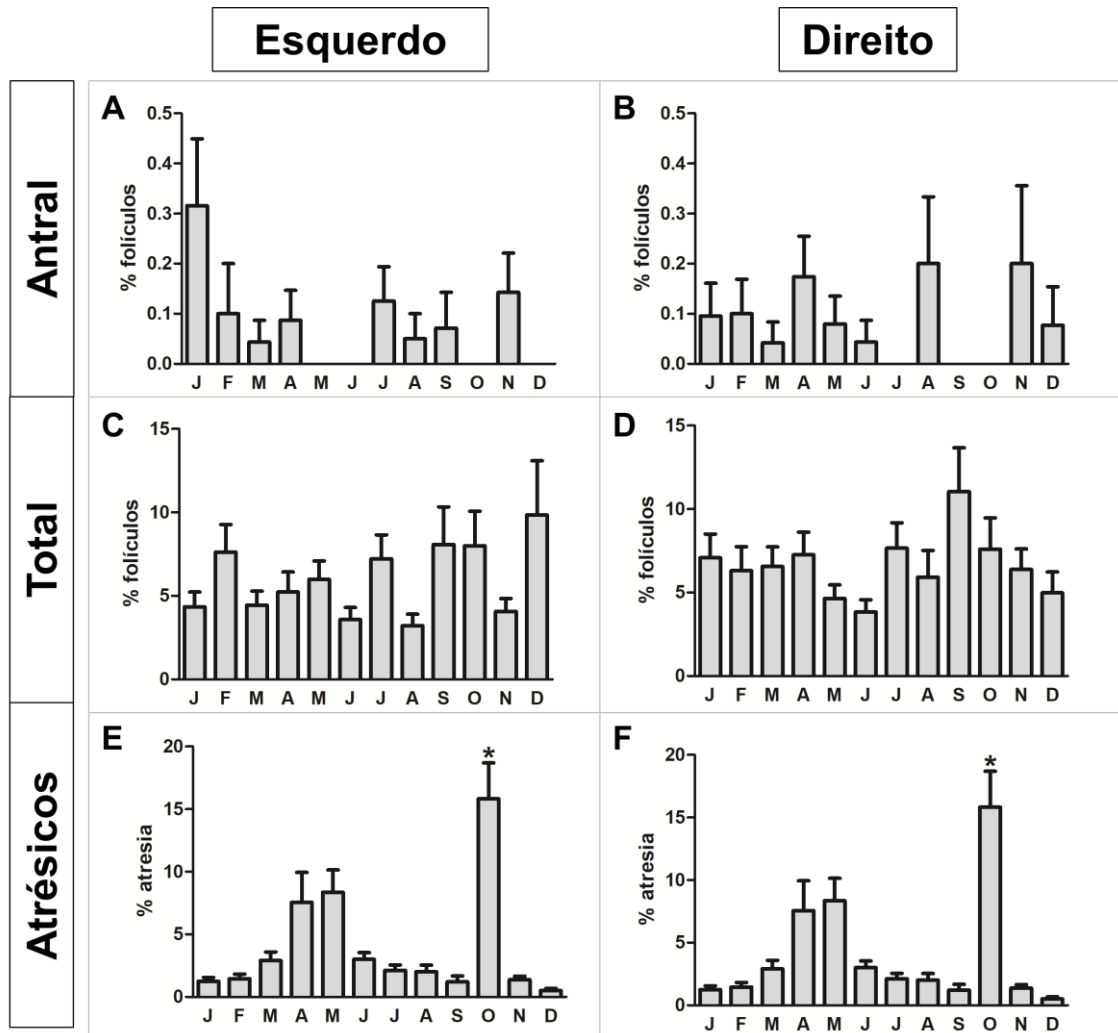


Figura 4. Quantificação folicular relativa nos ovários de *E. furinalis* ao longo do ano. Folículos antrais no ovário esquerdo (**A**) e no ovário direito (**B**). Quantidade total de folículos no ovário esquerdo (**C**) e no ovário direito (**D**). Folículos em atresia no ovário esquerdo (**E**) e no ovário direito (**F**). Estrelas (*) indicam diferenças estatisticamente significantes relativo ao mês anterior ($p \leq 0,05$).

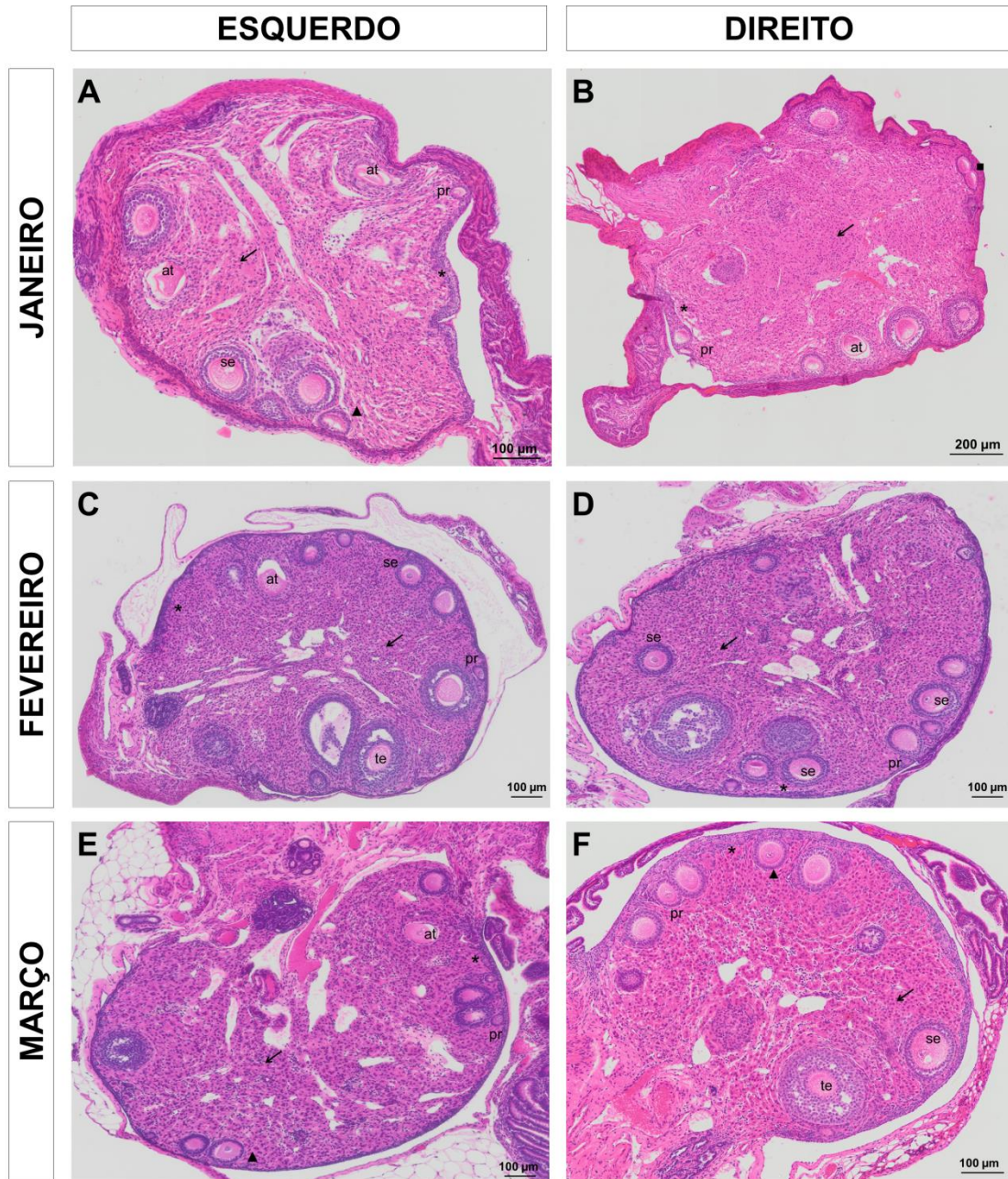


Figura 05. Cortes histológicos dos ovários de *E. furinalis* corados com hematoxilina-eosina. Ovário esquerdo nos meses de Janeiro (**A**), Fevereiro (**C**) e Março (**E**). Ovário direito nos meses de Janeiro (**B**), Fevereiro (**D**) e Março (**F**). É possível observar um desenvolvimento progressivo dos folículos de Janeiro a Março. (at: atresia; pr: folículo primário; se: folículo secundário; * folículos primordiais; ▲ transição entre folículo primário e secundário; ■ folículo primário biovular; setas: células do estroma).

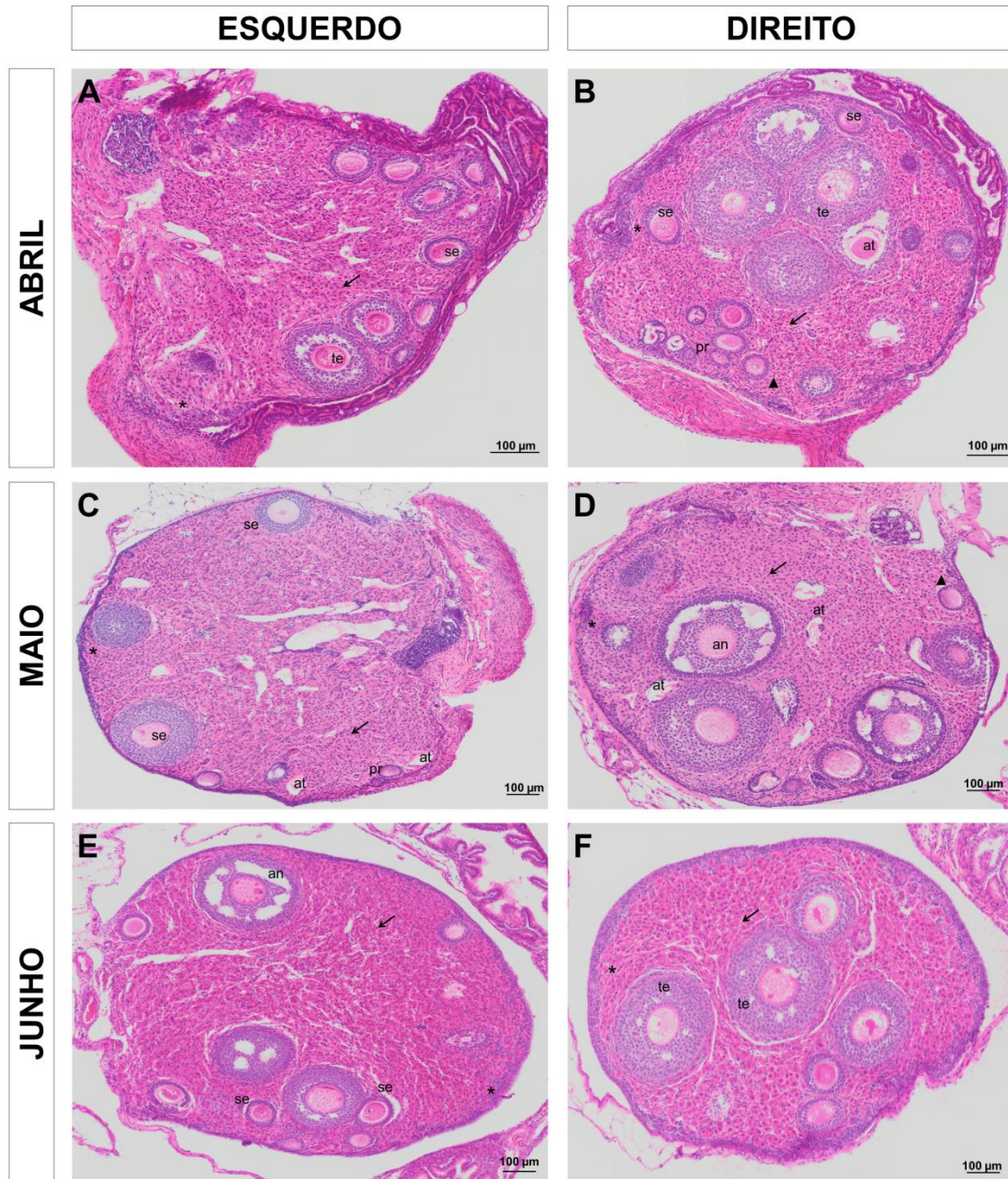


Figura 06. Cortes histológicos do ovário de *E. furinalis* corados com hematoxilina-eosina. Ovário esquerdo nos meses de Abril (**A**), Maio (**C**) e Junho (**E**). Ovário direito nos meses Abril (**B**), Maio (**D**) e Junho (**F**). Ocorre um aumento progressivo no desenvolvimento dos folículos no decorrer dos meses. Em Junho é possível observar um maior volume do citoplasma das células do estroma e glândulas intersticiais (**seta**). (**an**: folículo antral; **at**: atresia, **se**: folículo secundário, **te**: folículo terciário, * folículos primordiais, ▲ transição entre folículo primário e folículo secundário).

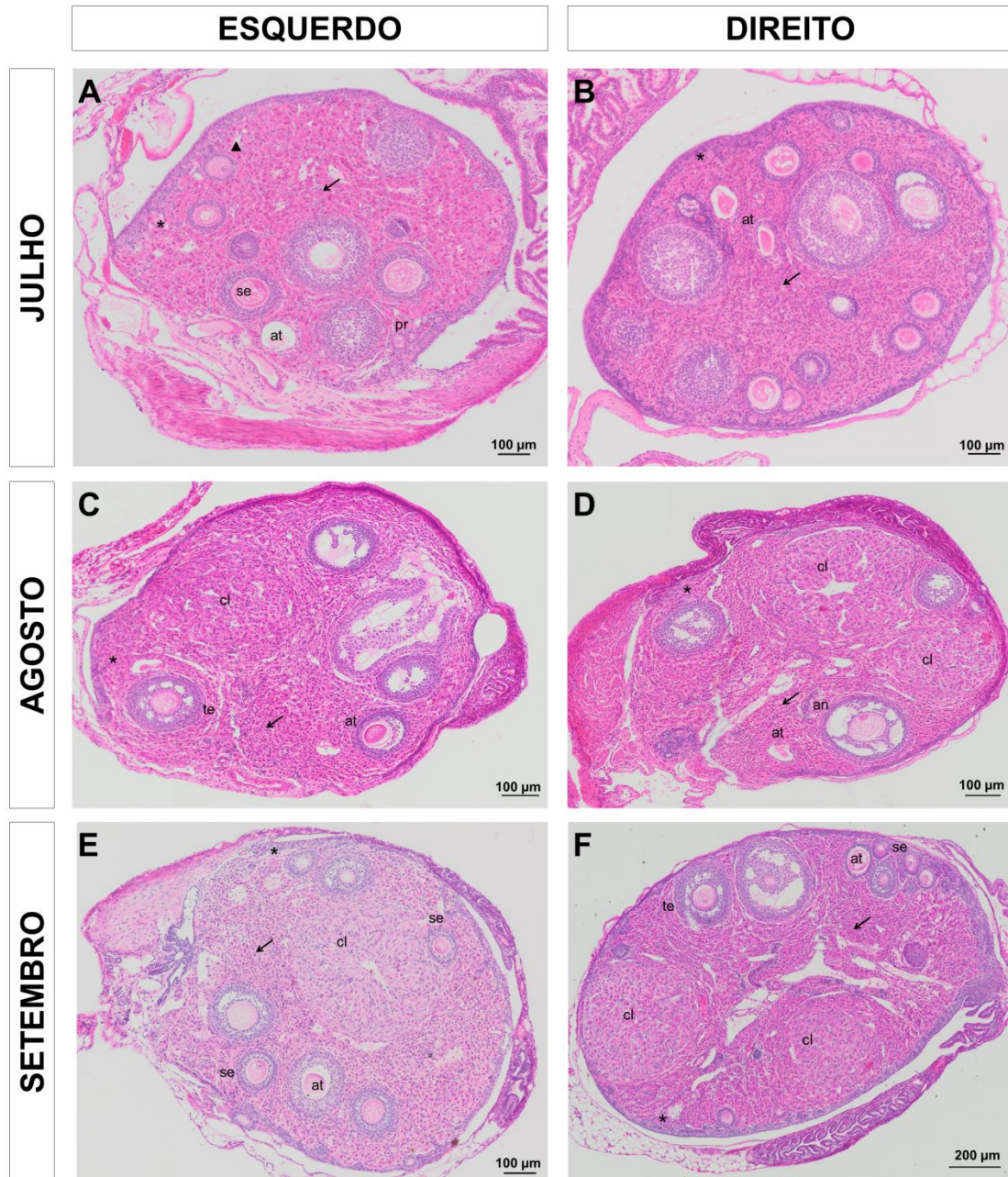


Figura 07. Cortes histológicos do ovário de *E. furinalis* corados com hematoxilina-eosina. Ovário esquerdo nos meses de Julho (A), Agosto (C) e Setembro (E). Ovário direito nos meses de Julho (B), Agosto (D) e Setembro (F). As células do estroma e glândulas intersticiais (**seta**) exibem um maior volume citoplasmático em Julho, enquanto que a partir de Agosto, o volume do citoplasma das células estromais das glândulas intersticiais diminui. (**an**: folículo antral; **at**: folículo em atresia; **cl**: corpo lúteo; **pr**: folículo primário; **se**: folículo secundário; **te**: folículo terciário; * folículos primordiais; ▲ transição entre folículo primário e folículo secundário).

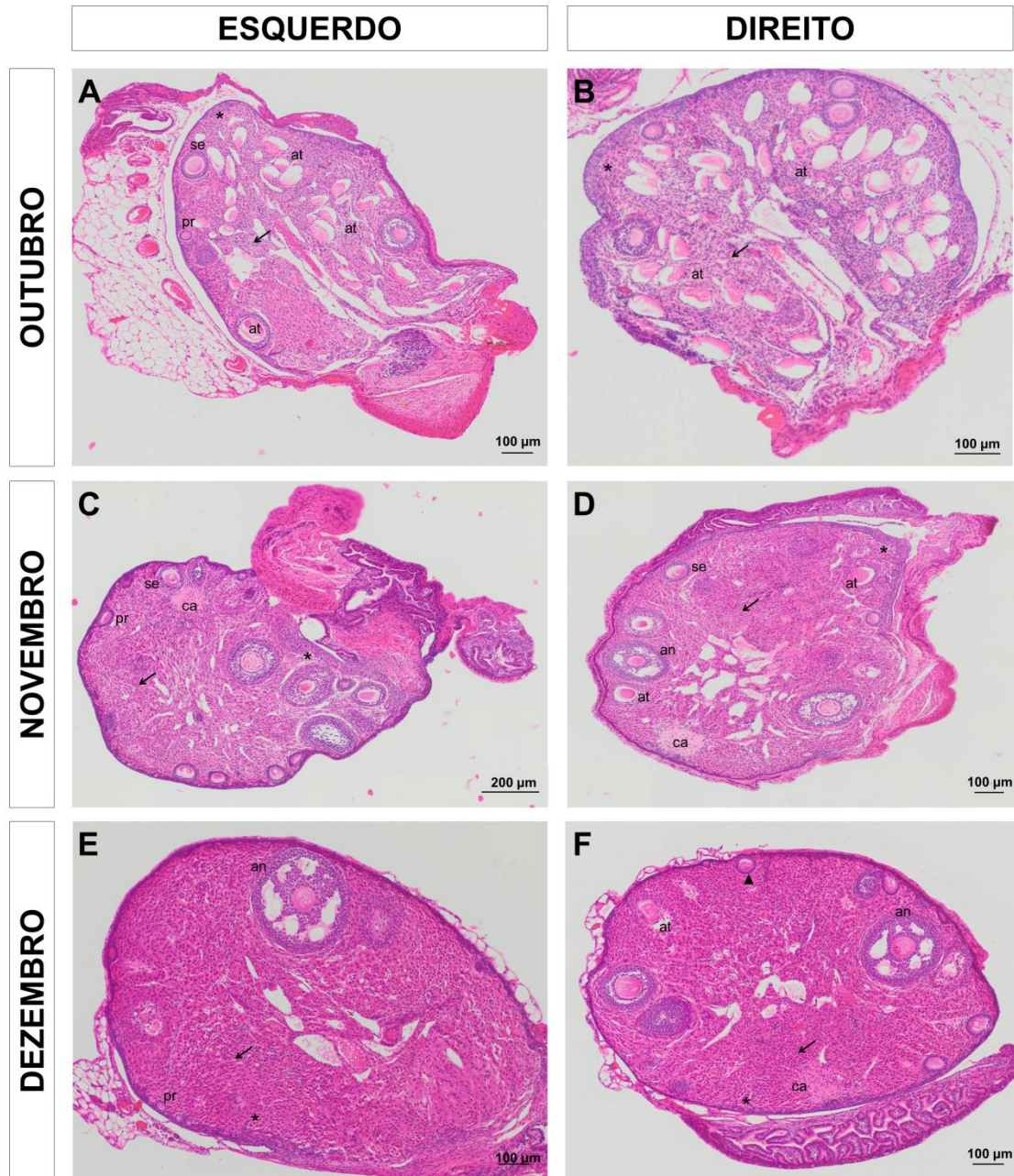


Figura 08. Cortes histológicos do ovário de *E. furinalis* corados com hematoxilina-eosina. Ovário esquerdo nos meses de Outubro (A), Novembro (C) e Dezembro (E). Ovário direito nos meses de Outubro (B), Novembro (D) e Dezembro (F). Nota-se a grande quantidade de atresia em Outubro e o pequeno volume do citoplasma das células do estroma e glândulas intersticiais (seta). (an: folículo antral; at: folículo em atresia; ca: corpo albicans; pr: folículo primário; folículo secundário; * folículos primordiais; ▲ transição entre folículo primário e folículo secundário).

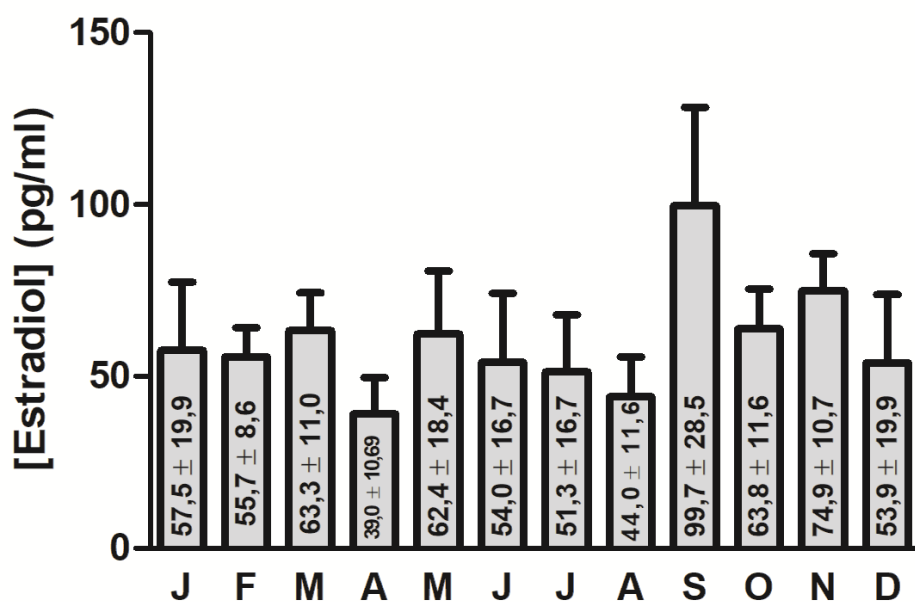


Figura 09. Variação da concentração de estradiol no plasma de *E. furinalis* ao longo do ano.

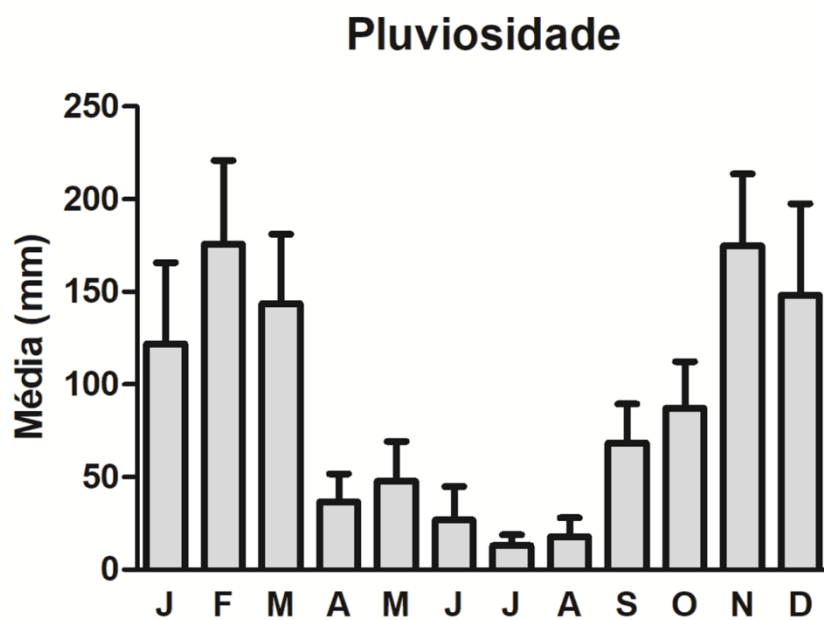
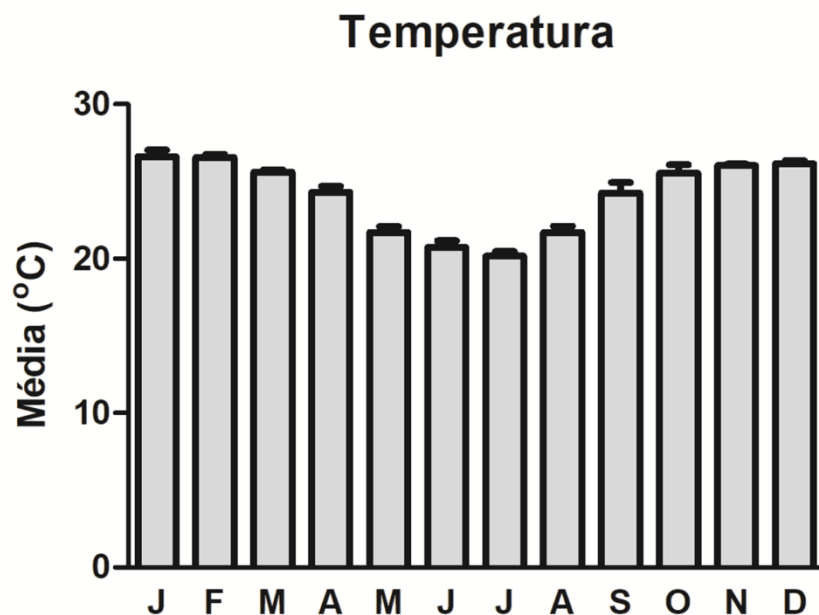


Figura 10. Variação anual média da temperatura e da pluviosidade durante os anos de 2013 a 2017 na região de São José do Rio Preto – SP. (Fonte: CIIAGRO - <http://www.ciiagro.sp.gov.br>).

7. ANEXOS

Tabela 1. Discriminação do número de espécimes e da condição reprodutiva de *Eptesicus furinalis* coletados a cada mês na região noroeste do estado de São Paulo - Brasil.

Mês	Número de Espécimes	Condição
Janeiro	05	Não Reprodutivas
Fevereiro	04	Não Reprodutivas
Março	05	Não Reprodutivas
Abril	05	Não Reprodutivas
Maio	05	Não Reprodutivas
Junho	05	Não Reprodutivas
Julho	05	Não Reprodutivas
Agosto	05	Grávidas
Setembro	03	Grávidas e lactantes
Outubro	05	Grávidas e lactantes
Novembro	03	Lactantes
Dezembro	03	1 Grávida e lactante 2 lactantes
Total	53	

Tabela 2. Variação anual da média do diâmetro, da área e do volume dos ovários direito e esquerdo de *Eptesicus furinalis*.

Ovário Direito			
Mês	Diâmetro (μm) $\pm$ EP	Área (mm^2) $\pm$ EP	Volume (mm^3) $\pm$ EP
Janeiro	838,7 $\pm$ 36,03	2,45 $\pm$ 0,18	404,6 $\pm$ 38,14
Fevereiro	1029 $\pm$ 25,57	3,45 $\pm$ 0,17	634,5 $\pm$ 47,60
Março	820,1 $\pm$ 22,7	2,22 $\pm$ 0,12	333,4 $\pm$ 25,66
Abril	857,9 $\pm$ 21,68	2,42 $\pm$ 0,11	375,8 $\pm$ 23,95
Maiο	1034 $\pm$ 29,85	3,56 $\pm$ 0,23	698,6 $\pm$ 76,51
Junho	1054 $\pm$ 23,67	3,60 $\pm$ 0,15	668,7 $\pm$ 39,27
Julho	999,7 $\pm$ 26,72	3,29 $\pm$ 0,15	591,7 $\pm$ 35,05
Agosto	888,2 $\pm$ 34,95	2,65 $\pm$ 0,20	442,0 $\pm$ 48,10
Setembro	1087 $\pm$ 25,46	3,79 $\pm$ 0,17	717,9 $\pm$ 49,42
Outubro	831,8 $\pm$ 14,42	2,22 $\pm$ 0,07	321,6 $\pm$ 15,03
Novembro	910,8 $\pm$ 18,76	2,69 $\pm$ 0,11	437,3 $\pm$ 29,03
Dezembro	877,5 $\pm$ 18,02	2,48 $\pm$ 0,09	380,9 $\pm$ 21,72
Ovário Esquerdo			
Mês	Diâmetro (μm) $\pm$ EP	Área (mm^2) $\pm$ EP	Volume (mm^3) $\pm$ EP
Janeiro	888,3 $\pm$ 14,91	2,52 $\pm$ 0,08	386,2 $\pm$ 19,11
Fevereiro	886,5 $\pm$ 22,34	2,56 $\pm$ 0,12	405,7 $\pm$ 28,98
Março	907,2 $\pm$ 24,33	2,71 $\pm$ 0,12	442,7 $\pm$ 25,75
Abril	966,0 $\pm$ 30,54	3,14 $\pm$ 0,28	600,6 $\pm$ 121,7
Maiο	1060 $\pm$ 23,96	3,66 $\pm$ 0,17	697,8 $\pm$ 51,59
Junho	1065 $\pm$ 32,62	3,78 $\pm$ 0,19	737,0 $\pm$ 46,56
Julho	1005 $\pm$ 27,76	3,34 $\pm$ 0,17	616,4 $\pm$ 43,20
Agosto	1002 $\pm$ 21,23	3,23 $\pm$ 0,12	564,7 $\pm$ 27,72
Setembro	979,4 $\pm$ 39,13	3,19 $\pm$ 0,25	584,1 $\pm$ 68,20
Outubro	848,7 $\pm$ 28,99	2,40 $\pm$ 0,16	380,2 $\pm$ 36,57
Novembro	918,2 $\pm$ 15,65	2,71 $\pm$ 0,09	435,3 $\pm$ 21,53
Dezembro	795,8 $\pm$ 13,79	2,03 $\pm$ 0,06	280,5 $\pm$ 12,52

Tabela 3. Média da quantidade de folículos ao longo do ano nos ovários direito e esquerdo de *Eptesicus furinalis*.

Ovário Direito							
Mês	Primordial	Primário	Secundário	Terciário	Antral	Total	Atresia
Janeiro	35,52 ±	2,00 ±	0,76 ± 0,22	0,05 ±	0,09 ±	7,08 ±	1,19 ± 0,26
	3,44	0,37		0,05	0,06	1,42	
Fevereiro	28,35 ±	1,55 ±	1,15 ± 0,23	0,40 ±	0,10 ±	6,31 ±	1,2 ± 0,32
	4,58	0,26		0,15	0,07	1,43	
Março	28,79 ±	1,83 ±	1,75 ± 0,30	0,37 ±	0,04 ±	6,56 ±	2,08 ± 0,57
	2,88	0,35		0,13	0,04	1,17	
Abril	33,09 ±	1,82 ±	0,91 ± 0,20	0,26 ±	0,17 ±	7,25 ±	2,96 ± 0,99
	3,17	0,30		0,11	0,08	1,36	
Maio	20,32 ±	1,84 ±	0,72 ± 0,18	0,24 ±	0,08 ±	4,64 ±	8,28 ± 1,96
	2,00	0,26		0,09	0,05	0,81	
Junho	16,39 ±	1,70 ±	0,52 ± 0,14	0,52 ±	0,04 ±	3,83 ±	2,87 ± 0,67
	2,16	0,36		0,16	0,04	0,73	
Julho	36,00 ± 4,7	1,41 ±	0,75 ± 0,14	0,12 ±	0	7,66 ±	2,08 ± 0,45
		0,24		0,09		1,53	
Agosto	26,30 ±	2,50 ±	0,40 ± 0,22	0,20 ±	0,20 ±	5,92 ±	0,50 ± 0,17
	3,21	0,83		0,13	0,13	1,59	
Setembro	52,08 ±	4,64 ±	1,43 ± 0,63	0,64 ±	0	11,04 ±	1,07 ± 0,30
	6,22	1,24		0,22		2,63	
Outubro	35,91 ±	1,56 ±	0,43 ± 0,16	0,04 ±	0	7,59 ±	12,13 ±
	6,77	0,25		0,04		1,88	2,70
Novembro	26,80 ±	3,15 ±	1,65 ± 0,33	0,10 ±	0,20 ±	6,38 ±	2,00 ± 0,51
	3,35	0,53		0,07	0,15	1,23	
Dezembro	21,15 ±	1,54 ±	1,54 ± 0,50	0,61 ±	0,08 ±	4,98 ±	0,46 ± 0,18
	3,71	0,27		0,38	0,08	1,25	
Ovário Esquerdo							
Mês	Primordial	Primário	Secundário	Terciário	Antral	Total	Atresia
Janeiro	18,37 ±	2,10 ±	0,84 ± 0,26	0,10 ±	0,31 ±	4,34 ±	1,26 ± 0,29
	2,56	0,31		0,07	0,13	0,89	
Fevereiro	34,10 ±	2,40 ±	1,20 ± 0,30	0,30 ±	0,10 ±	7,62 ±	1,45 ± 0,38
	5,02	0,35		0,13	0,10	1,66	
Março	19,61 ±	1,48 ±	0,61 ± 0,20	0,48 ±	0,04 ±	4,44 ±	2,19 ± 0,67
	2,16	0,27		0,19	0,04	0,83	
Abril	23,09 ±	1,70 ±	0,91 ± 0,21	0,35 ±	0,09 ±	5,23 ±	7,56 ± 2,38
	4,41	0,28		0,12	0,06	1,21	
Maio	27,00 ±	2,08 ±	0,52 ± 0,20	0,32 ±	0	5,98 ±	8,36 ± 1,78
	2,92	0,33		0,11		1,11	
Junho	14,81 ±	1,67 ±	1,09 ± 0,27	0,33 ±	0	3,58 ±	3,00 ± 0,54
	2,36	0,37		0,14		0,73	
Julho	33,13 ±	1,67 ±	1,08 ± 0,23	0,12 ±	0,12 ±	7,22 ±	2,12 ± 0,43
	3,98	0,29		0,07	0,07	1,42	
Agosto	13,90 ±	1,45 ±	0,55 ± 0,18	0,15 ±	0,05 ±	3,22 ±	2,00 ± 0,55
	2,13	0,29		0,11	0,05	0,68	
Setembro	36,79 ±	2,36 ±	1,07 ± 0,40	0,14 ±	0,07 ±	8,09 ±	1,21 ± 0,46
	7,33	0,68		0,10	0,07	2,25	
Outubro	37,71 ±	1,76 ±	0,35 ± 0,24	0,18 ±	0	8,00 ±	15,82 ± 2,86
	6,60	0,45		0,09		2,07	
Novembro	16,81 ±	1,90 ±	1,14 ± 0,32	0,33 ±	0,14 ±	4,07 ±	1,38 ± 0,28
	2,23	0,43		0,13	0,08	0,77	
Dezembro	45,36 ±	2,50 ±	1,00 ± 0,33	0,36 ±	0	9,84 ±	0,50 ± 0,17
	12,60	0,58		0,17		3,25	

Capítulo 5

Ovarian morphology and folliculogenesis and ovulation process in the flat-faced fruit-eating bat *Artibeus planirostris* and the Argentine brown bat *Eptesicus furinalis*: a comparative analysis

Artigo aceito para publicação na revista “Acta Zoologica”

ORIGINAL ARTICLE

WILEY



Ovarian morphology and folliculogenesis and ovulation process in the flat-faced fruit-eating bat *Artibeus planirostris* and the Argentine brown bat *Eptesicus furinalis*: A comparative analysis

Larissa Mayumi Bueno¹ | Dianelli Lisboa Caun¹ | Manuela Tosi Comelis¹ |
Mateus Rodrigues Beguelini² | Sebastião Roberto Taboga³ | Eliana Morielle-Versute¹ 

¹Department of Zoology and Botany, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (Ibilce), Campus São José do Rio Preto, São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil

²Center of Biological and Health Sciences, UFOB – Universidade Federal do Oeste da Bahia, Bahia, Barreiras, Brazil

³Department of Biology, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (Ibilce), Campus São José do Rio Preto, São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil

Correspondence

Eliana Morielle-Versute, Department of Zoology and Botany, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (Ibilce), Campus São José do Rio Preto, São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil.
Emails: morielle@ibilce.unesp.br and emorielle@gmail.com

Funding information Brazilian National Research and Development Council (CNPq), Grant/Award Number: 300163/2008-8, 301596/2011-5, 302008/2010 and 301073/2013-9

Abstract

The Neotropical bat species *Artibeus planirostris* and *Eptesicus furinalis* present a different morphology of the female reproductive organs: the first presents a simplex uterus, while the second presents a bicornuate uterus, but there is no information about their ovaries. Our aim was to compare the general ovary morphology and the folliculogenesis process in these species to increase the knowledge about the reproductive diversity of tropical bats. We observed a morphological distinction between the ovaries of both species: *A. planirostris* presents the primordial follicles located in a cranial portion of the ovary and the interstitial gland cells are not distinctive, while in *E. furinalis*, the primordial follicles are located throughout the cortex, and there is an abundance of interstitial gland cells. Both species present binovular or triovular follicles. *Artibeus planirostris* is a monovular species, with a preferential ovulation in the left side. Some females of *E. furinalis* exhibited two corpora lutea in the same ovary, and others presented a corpus luteum in both right and left ovaries at the same time; thus, *E. furinalis* is a polyovular species. Our results express the variation between two Neotropical species, reflecting the great variation in the reproductive aspects in Chiroptera.

KEYWORDS

follicular development, ovulation, polarized ovary, reproduction, reproductive morphology

1 | INTRODUCTION

Bats are characterized by a great variety of reproductive strategies (Crichton & Krutzsch, 2000; Rasweiler, 1993), and this is related to the adaptation to different habitats. In temperate zones, bat reproduction is seasonal and both males and females present adaptations to hibernation (Crichton & Krutzsch, 2000; Gustafson, 1979). In tropical regions, bat reproduction shows geographical variability, with males of some species presenting testicular regression similar to

temperate species, while other species present spermatogenesis activity throughout the year (Araújo, Amaro, Talamoni, & Godinho, 2013; Beguelini, Puga, Taboga, & Morielle-Versute, 2013; Morais et al., 2013). Females can show variation in uterus shape and in ovary and follicle physiology and morphology, and there are even some species with true menstruation (Crichton & Krutzsch, 2000; Rasweiler, Badwaik, & Mechineni, 2011).

Phyllostomidae is an exclusive family from the New World, and among all bat families, it is the one that displays

the greatest diversity of food sources (Lopez & Vaughan, 2004). *Artibeus planirostris* is a frugivorous phyllostomid species with an important ecological role in seed dispersal (Hollis, 2005; Reis, Peracchi, Pedro, & Lima, 2007), and like most of the Phyllostomidae bats, it is characterized by a polyestric bimodal pattern of reproduction (Fleming, Hooper, & Wilson, 1972; Willig, 1985). However, some authors believe that this species can breed throughout the year (Graham, 1987; Hollis, 2005). Beguelini et al. (2013) show that the spermatogenesis process in *A. planirostris* is active year-round, signalling a continuous reproductive cycle where females could have more than one pregnancy per year.

On the other side, Vespertilionidae is the major family of bats and is distributed worldwide (Nowak, 1999; Simmons, 2005); however, most investigations about reproduction in this family have only considered temperate species (Beguelini, Moreira, Faria, Marchesin, & Morielle-Versute, 2009). The insectivorous vespertilionid bat *Eptesicus furinalis* is exclusively Neotropical (Mies, Kurta, & King, 1996) and has an important ecological role controlling insect populations (Aguiar & Antonini, 2008). Despite its wide distribution throughout Central and South America (Miranda, Bernardi, & Passos, 2006; Simmons, 2005), there are few studies about the reproductive aspects in this species. Ecological literature data show that *E. furinalis* present geographical variability in reproduction, with females presenting post-partum oestrus and males presenting sperm storage in the epididymis (Barquez, Mares, & Braun, 1999; González, 2001; Myers, 1977). Until now, a deeper morphological investigation about the reproductive aspects in this species has only been performed with males, which show a pattern of testicular regression with no production of spermatozoa during some months of the year (Bueno, Beguelini, Comelis, Taboga, & Morielle-Versute, 2014).

These two species also present a different morphology of the female reproductive organs. *Artibeus planirostris* presents a simplex uterus, while *Eptesicus furinalis* presents a bi-cornuate uterus (Myers, 1977; Rasweiler & Badwaik, 2000). Literature data show that implantation sites can vary between species with a simplex or a bicornuate uterus, and this can result in different developmental strategies of the blastocyst (Rasweiler & Badwaik, 2000).

The few studies involving ovarian morphology analysis in bat species show that they have different morphologies of the ovaries and follicles (Antonio-Rubio, Porras-Gómez, & Moreno-Mendoza, 2013; Rasweiler & Badwaik, 2000; Spaniel-Borowski, 2012). Generally, these differences are related to the ovarian cycle—the process of folliculogenesis. Although folliculogenesis is widely preserved within mammals, its early stages, including the accumulation and recruitment of primordial follicles from the resting pool and their transition into primary follicles, are crucial for female reproduction, regardless of the species (Malgorzata, Malgorzata,

Malgorzata, & Tabarowski, 2016; Skinner, 2005). Beside this, folliculogenesis is a key event in female fertility and dictates concurrent modifications in the endometrium and other ovarian hormone-sensitive tissues. Indeed, the ultimate goal of this physiologic progression was to achieve ovulation and offer an adequate environment for installing gestation—the consummation of female fertility (Rojas et al., 2015).

Thus, due to the facts that the reproductive characteristics between different bat taxa vary considerably, that there are few investigations involving the reproductive organs of tropical species, and because of the absence of investigations about ovarian morphophysiology in females of *A. planirostris* and *E. furinalis*, our aim was to analyse and compare the general ovary morphology and the folliculogenesis and ovulation process in these species to increase the knowledge about the reproductive diversity of tropical bats and to help to understand the different patterns of tropical bat reproduction.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals

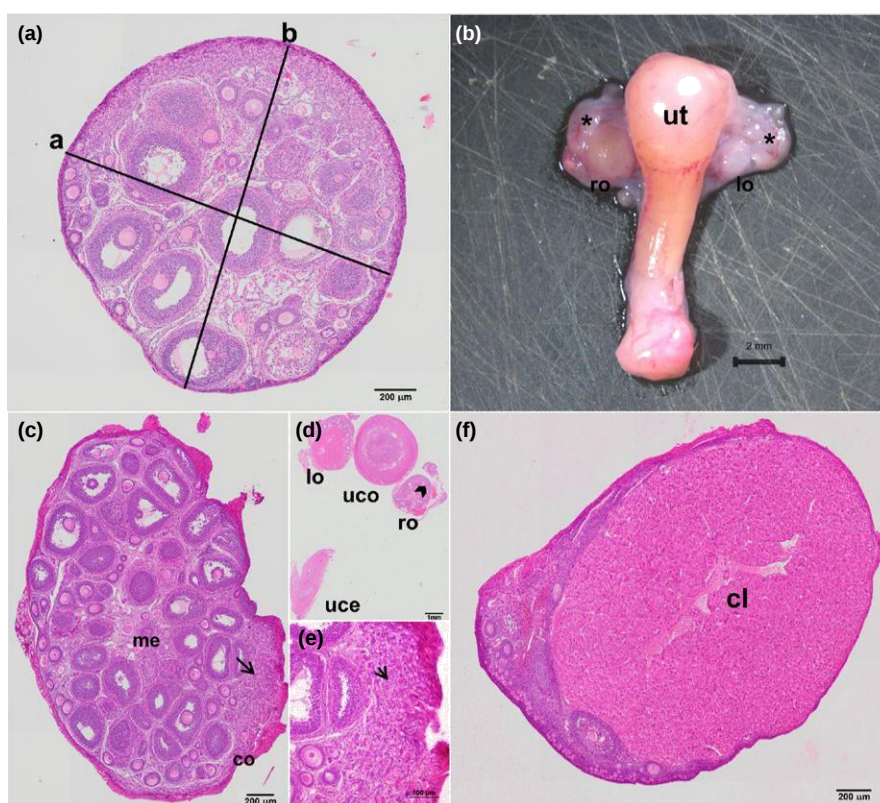
Sexually mature females of *A. planirostris* and *E. furinalis* were collected between September 2013 and April 2015 in north-western São Paulo State, Brazil (20°49'11"S, 49°22'45"W). In total, 29 females of *A. planirostris* (20 animals presenting corpus luteum and nine presenting no corpus luteum) and 29 females of *E. furinalis* (seven animals presenting corpus luteum and 22 presenting no corpus luteum) were analysed. Each animal was classified as an adult based on the body weight, complete ossification of the metacarpal-phalangeal epiphyses and wear of the teeth (De Knecht, Silva, Moreira, & Sales, 2005; Kunz & Anthony, 1982).

Capture and captivity of bats were authorized by the Brazilian institution responsible for wild animal care (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, IBAMA—licence number: 21707--1; Sisbio: 59765825--13/04/2010). The animals were treated according to the recommendations of the Committee on Care and Use of Laboratory Animals from the Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (Committee on Care and Use of Laboratory Animals, 1980). All the procedures were authorized by the Ethics Committee on Animal Use of IBILCE/UNESP (Process: 102/2014--CEUA), and all the specimens are housed in the Chiroptera Scientific Collection at the São Paulo State University (DZSJRP-UNESP).

2.2 | Preparation of the ovaries and histomorphometric analysis

The animals were euthanized with 80 mg ketamine and 20 mg de xylazine/kg. The ovaries were carefully removed

FIGURE 1 Localization and the general morphology of the ovaries of *A. planirostris* stained with haematoxylin–eosin. (a) Measurements of ovaries were taken by cross–sectioning the “a” axis and the “b” axis. (b) Right and left ovaries connected to the upper side of the simplex uterus through the uterine tube (star). (c) General morphology of the right ovary showing the cortex, medulla and primordial follicles (arrow). (d) Cross section of the uterus and the ovaries (arrowhead) showing primordial follicles localized on the medial side of the ovary. (e) Primordial follicles (arrow). (f) General morphology of the left ovary which presented a single corpus luteum. (cl: corpus luteum; co: cortex; lo: left ovary; me: medulla; ro: right ovary; uce: uterine cervix; uco: uterine corpus; ut: uterus). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



and fixed using a methanol: chloroform: acetic acid (6:3:1) fixative solution for three hours at 4°C, then dehydrated in ethanol, clarified in xylene, embedded in paraffin, sectioned (5 μm) and stained with haematoxylin–eosin (Ribeiro & Lima, 2000) to show the basic morphology of the ovarian tissue, and, to a more detailed analysis, the ovary sections were stained with periodic acid–schiff (PAS, Behmer, Tolosa, & Freitas–Neto, 1976) to illustrate the follicular zona pellucida composed by glycogen component, Masson Tushman’s blue (Delbes et al., 2004), to show the smooth muscle cells and collagen fibres of the theca interna, and Gomori’s trichrome (Behmer et al., 1976) to show the interstitial gland morphology, and submitted to histological and morphometric analyses. The analyses were performed using an Olympus BX60 microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) and an Olympus BX–VCB scanner, both coupled with an image analyser (Image–Pro Plus version 6.1 for Windows 1993–2006 Media Cybernetics, Inc.). The follicles were classified into different stages according to Williams & Erickson (2012), and follicular atresia was classified following Bansal and Uppal (2014). The diameters (μm) of each ovary, with and without corpus luteum, were measured with the software Image–Pro Plus, version 6.0 (© Media Cybernetics) for Windows ®. All measurements were taken as shown in Figure 1a.

The diameter was calculated based on Williams (1977), using the formula:

$$\text{DIAMETER (D)}(\mu\text{m}) = \sqrt{\frac{AB}{\pi}}$$

where ‘a’ is the measure of the ovary diameter and ‘b’ is the diameter in 90° angle.

The mean values and standard deviations were calculated. We applied paired t tests to determine the significant difference ($p < .05$) between the right and left ovaries. All statistical analyses were performed using the GraphPad InStat 3 software.

3 | RESULTS

3.1 | General ovary morphology

In *A. planirostris*, the ovaries are located on both sides of the upper side portion of the simplex uterus (Figure 1b), while in *E. furinalis*, the ovaries are located in the cranial portion of each horn of the bicornuate uterus (Figure 2a). In both species, the ovary shape is round to oval and histologically divided into cortex and medulla; however, the limits between these two regions are not distinct.

The cortex consists of a connective tissue and fibroblasts surrounding the follicles in different stages of maturation and the corpus luteum (if present). The medulla, which is centrally located in the ovaries, is composed of loose connective tissue and contains blood vessels and nerves. The whole ovarian surface is covered by a layer of cubic to flattened epithelial cells and, between this layer and the cortex, there is a basement membrane called “tunica albuginea.” The primordial follicles are located next to the surface epithelium.

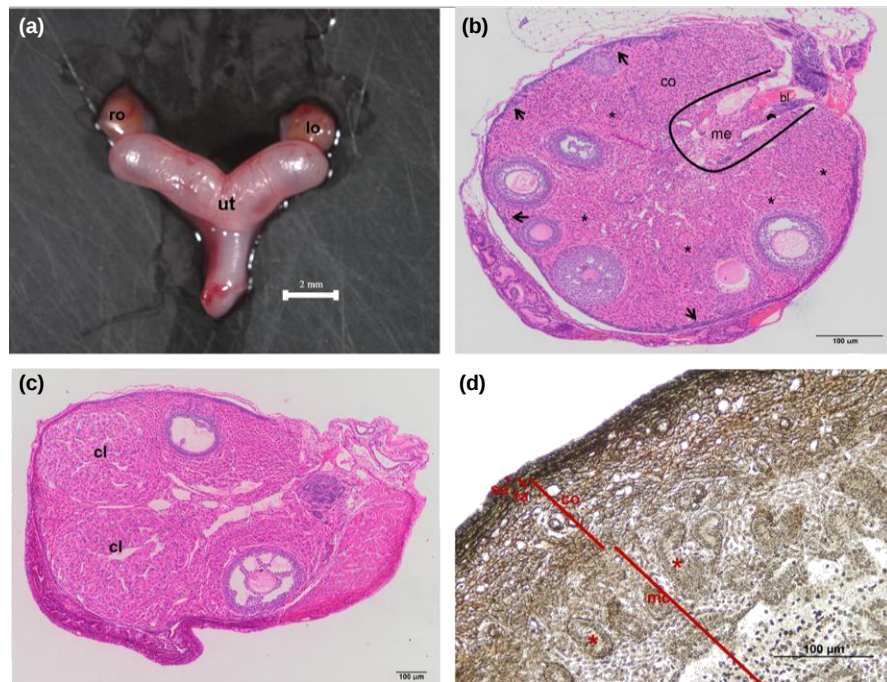


FIGURE 2 Localization and the general morphology of the ovaries of *E. furinalis* stained with haematoxylin–eosin (b–c) and Gomori's trichrome (d). (a) Right and left ovaries in the cranial portion of the bicornuate uterus. (b) General morphology of the ovary showing the cortex and medulla with blood vessels and nerves (arrowhead) and primordial follicles (arrows) spread throughout the ovary, not constituting a polarized ovary. (c) General morphology of the ovary with two corpora lutea. (d) Ovary Gomori's trichrome stained. Note that the surface of the ovary is lined with a simple epithelium of cuboidal to columnar cells, which is attached above a basement membrane, the tunica albuginea. There is an abundance of interstitial gland cells (asterisk) in the cortex and in the medullary portion of the cortex. (bl: blood vessel; cl: corpus luteum; co: cortex; lo: left ovary; mc: medullary portion of the cortex; ro: right ovary; se: surface epithelium; ta: tunica albuginea; ut: uterus). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

and the tunica albuginea, while the other stages of follicles are located in the region among the cortex and the medulla, the medullary section of the cortex (Figure 2b).

A general morphological distinction between the ovaries of *A. planirostris* and *E. furinalis* in regard to the distribution of primordial follicles and the interstitial gland cells was noted. In the ovary of *A. planirostris*, the primordial follicles are restricted to a zone in the periphery of cortex, located only in the medial side of the ovary, and the interstitial gland cells are not distinctive (Figure 1c–e), while in *E. furinalis*, the primordial follicles are located throughout the cortex, next to the surface epithelium, and there is an abundance of interstitial gland cells (Figure 2b,d). However, when the follicles grow and mature, they occupy large area of the cortex until close to the ovarian medulla in both species (Figures 1c and 2b).

3.2 | Folliculogenesis

Five different follicular stages were observed in the ovaries of both species and were grouped into two categories: preantral follicles (primordial, primary, secondary, tertiary) and the antral follicle (Graafian or antral follicle; Figure 3).

The primordial follicle (Figure 3a) appears close to the tunica albuginea and contains a small primary oocyte with a

central nucleus and a prominent nucleolus. Surrounding the oocyte is a thick basal lamina and, attached to this lamina, a single layer of flattened follicular cells, which has an elongated nucleus and little cytoplasm.

With the development of the follicle, the oocyte increases in size and the single layer of follicular cells becomes cubic; the cells are now called granulosa cells. These cells present a central round nucleus and a prominent nucleolus. The nucleus of the oocyte is eccentric with a prominent nucleolus, and the follicle is now called primary follicle (Figure 3b).

In the secondary follicle (Figure 3c), the granulosa cells divide mitotically, resulting in two or more layers, which present a round to oval nucleus with a prominent nucleolus. The oocyte with a peripheral nucleus increases in size and develops an extracellular matrix surrounding it, called zona pellucida. Further, a sheath of connective tissue cells is developed surrounding the follicle, known as the theca layer, which is divided into an outer portion, the theca externa, containing smooth muscle cells and collagen fibres, and the theca interna, the thinner layer composed of cubic cells (Figure 3i).

The granulosa cells start to secrete the antrum fluid, which accumulates between the cells of the granulosa layers, forming small cavities, and from that stage, the follicle is called tertiary follicle (Figure 3d). At this stage, the granulosa cells

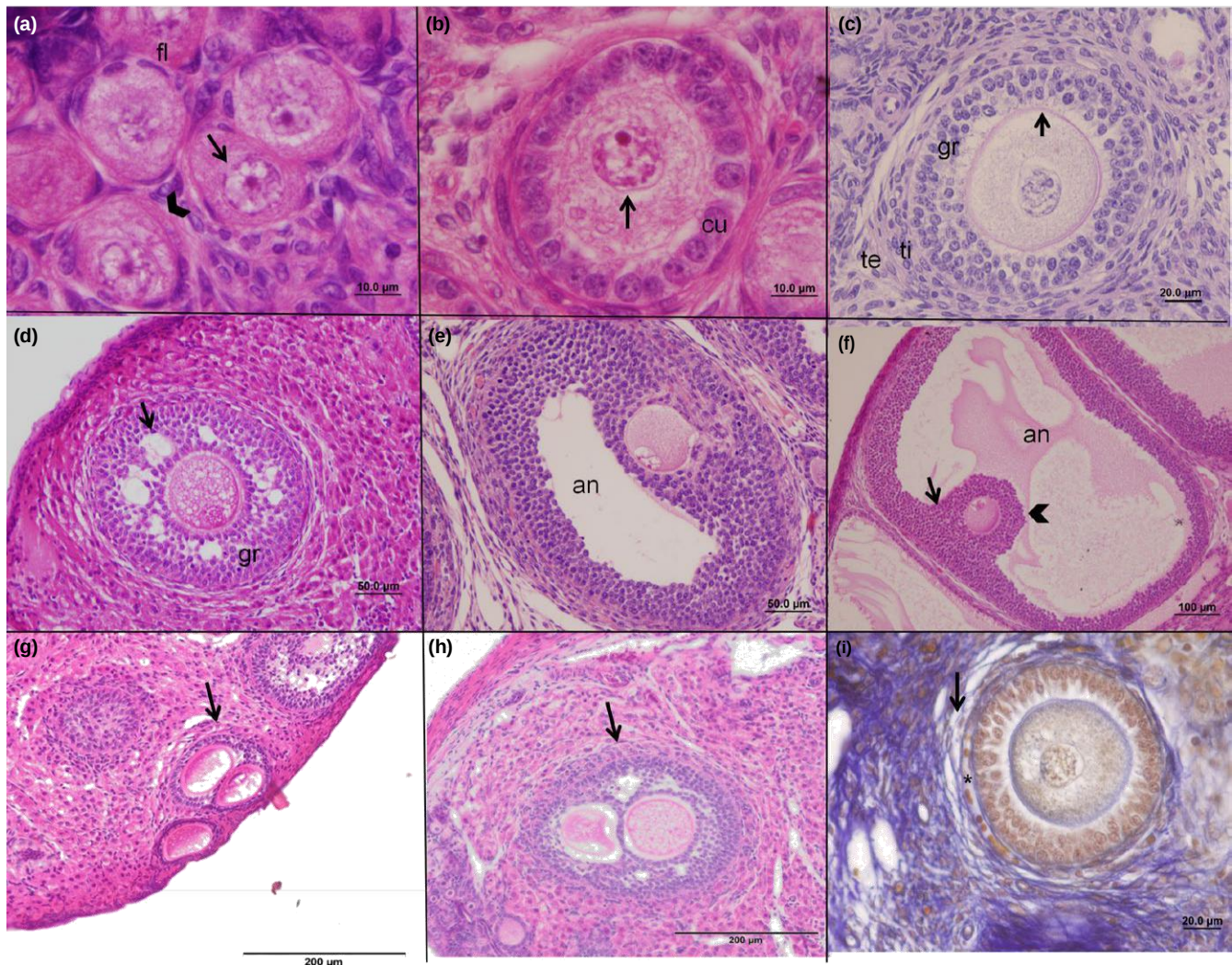


FIGURE 3 Histological sections of the ovaries of *A. planirostris* and *E. furinalis* showing the folliculogenesis process. (a) Primordial follicles, surrounded by a single layer of flattened cells limited by a basal lamina (arrowhead), and the oocyte with a central nucleus (arrow). (b) Primary follicle, surrounded by a single layer of cubic granulosa cells, and an eccentric nucleus (arrow) in the oocyte. (c) Secondary follicle surrounded by two or more layers of granulosa cells. The zona pellucida (arrow) surrounds the oocyte, and the follicle is surrounded by the theca externa (te) and the theca interna (ti). PAS stain. (d) Tertiary follicle with small cavities (arrow) within the granulosa layers (gr). (e) Antral follicle presenting the antrum (an) in the granulosa cells layers. (f) In the pre-ovulatory or Graafian follicle, the antrum is now a single cavity (an), where the oocyte is surrounded by the corona radiata (arrowhead), which connects with the granulosa cells through the cumulus oophorus (arrow). (g) Cross section of a binovular follicle (arrow) in transition from primary to secondary stage, separated by granulosa cells. (h) Cross section of an atretic binovular follicle (arrow) in transition from the secondary to the tertiary stage, separated by granulosa cells. (i) Cross section of a secondary follicle stained with Masson Tushman's blue; note the theca interna (star), composed of a thin layer of cubic cells, and the theca externa (arrow), containing smooth muscle cells and collagen fibres. (an: antrum; cu: cubic cell; fl: flattened cell; gr: granulosa cell; te: theca externa; ti: theca interna). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

present a round nucleus, with a prominent nucleolus and a small amount of cytoplasm.

As the granulosa cells secrete more fluid, the cavities start to increase and merge into each other, resulting in a major cavity, known as antrum, and now the follicle is called antral follicle (Figure 3e). As the follicle develops, the antrum increases in size until it becomes a single cavity, where the oocyte is eccentrically positioned and surrounded by a single layer of granulosa cells, the corona radiata, which connects

with the granulosa cells through the cumulus oophorus. Both theca interna and externa are more distinguishable, and the oocyte is ready to be ovulated. This follicle is known as pre-ovulatory or Graafian (Figure 3f).

We could observe that both species presented binovular or triovular follicles separated by granulosa cells (Figure 3g). However, this condition was only observed in primary or secondary follicles, and with the development of these follicles, they became atretic (Figure 3h).

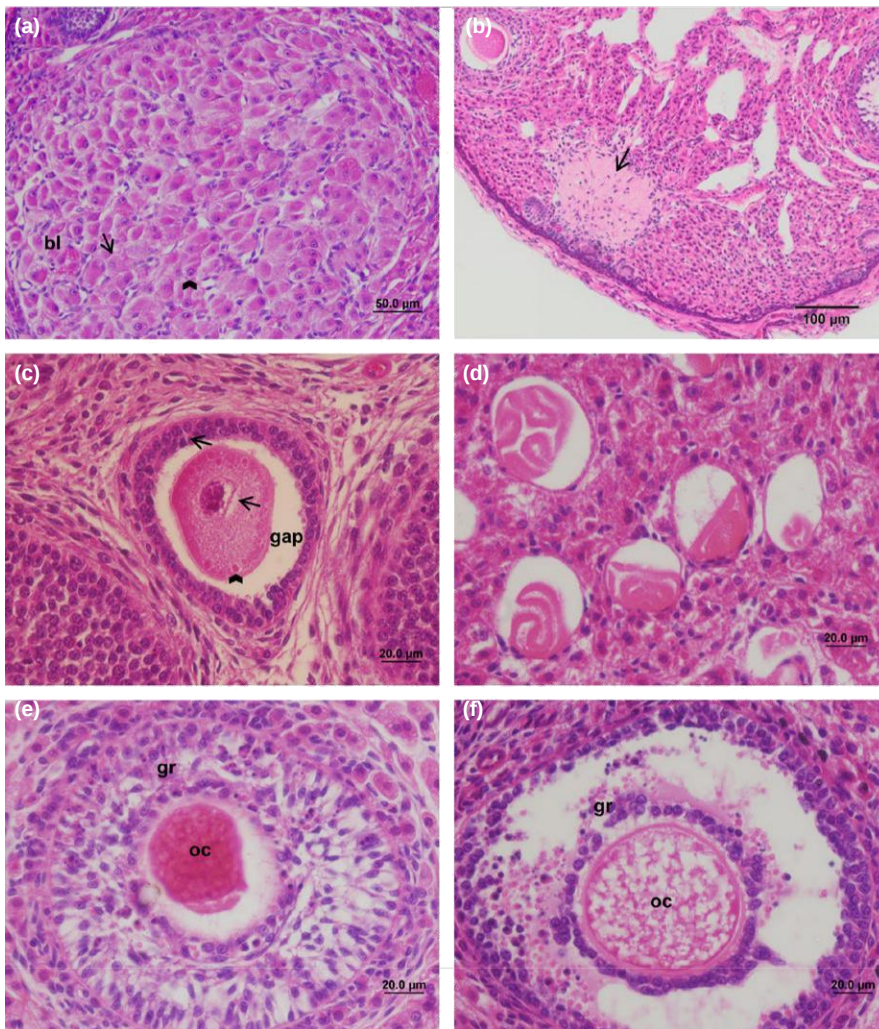


FIGURE 4 Corpus luteum and corpus albicans structures, and the follicular atresia in *A. planirostris* and *E. furinalis* ovaries stained with haematoxylin–eosin. (a) The corpus luteum of both species with lighter granulosa or large luteal cells (arrow) and darker theca or small luteal cells (arrowhead). (b) The corpus albicans (arrow) of both species is composed of a fibrous connective tissue and fibroblasts. (c) Atretic follicles presented oocyte with pyknotic nucleus (arrow) and macrophage infiltration (arrowhead), and a gap between the granulosa layer cells and zona pellucida (gap). (d) In more advanced atresia, the follicle showed an irregular shape. (e) Type A atresia in preantral follicles. (f) Type B atresia in antral follicles (bl: blood vessel; gr: granulosa cells; oc: oocyte). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

3.3 | Corpus luteum

In both species, after follicle rupture and ovulation, the follicle becomes a folded and rounded structure called “corpus luteum,” which is composed of theca cells (or small luteal cells), granulosa cells (or large luteal cells) and blood vessels (Figure 4a). The granulosa or large luteal cells are spherical shaped cells with a round, darker stained nucleus, while the theca or small luteal cells are spindle-shaped with a lighter stained, irregular nucleus.

In *A. planirostris*, only one of the ovaries presented a corpus luteum (Figure 1d), in which 76.2% of the corpora lutea were present in the left ovary. Therefore, *A. planirostris* is a monovular species, producing just one ovum per cycle, with a preferential ovulation in the left side. The number of corpora lutea in the ovaries of *E. furinalis* varied. Some females presented two corpora lutea in the same ovary (Figure 2c), while others presented corpora lutea in both right and left ovaries at the same time. Thus, *E. furinalis* is a polyovular species, producing more than one ovum by cycle.

In both species, the corpus luteum degenerates into the corpus albicans, which is composed of a fibrous connective tissue and fibroblasts (Figure 4b).

3.4 | Atresia

Follicular atresia was observed in ovaries of both species and occurred in all follicle stages which presented granulosa cells with pyknotic nuclei, condensed chromatin in the nucleus of the oocyte and a gap between the granulosa layer cells and the zona pellucida, due to an involution of the oocyte (Figure 4c). In more advanced atresia, the follicle showed an irregular shape (Figure 4d). We could also observe macrophage infiltration in the oocyte of follicles in atresia (Figure 4c).

We recognized two types of atresia in both species, type A and type B. Type A atresia (Figure 4e) occurs in preantral follicles (primordial to secondary follicles), in which the oocyte degenerates before the granulosa cells. In type B atresia (Figure 4f), which occurs in antral follicles, the granulosa cells start to degenerate before the oocyte.

TABLE 1 Ovarian diameter of *Artibeus planirostris* and *Eptesicus furinalis* in the presence and absence of corpus luteum

Diameter (μm)	Ovary without corpus luteum		Ovary with corpus luteum	
	Left ovary	Right ovary	Left ovary	Right ovary
<i>Artibeus planirostris</i> ^a	1,608.30 $\pm$ 282.28	1,550.55 $\pm$ 417.48	1,982.87 $\pm$ 504.58	1,961.175 $\pm$ 388.73
<i>Eptesicus furinalis</i> ^b	934.68 $\pm$ 164.47	870.21 $\pm$ 176.25	995.95 $\pm$ 144.20	1,034.95 $\pm$ 102.18

Significant test ($p \leq .005$) between the right ovary and left ovary of *A. planirostris*^a (0.034 without corpus luteum; 0.18 with corpus luteum) and *E. furinalis*^b (0.09 with-out corpus luteum; 0.64 with corpus luteum).

3.5 | Morphometry

The diameters of the right and left ovaries for both species are shown in Table 1. For the measurements, we classified the ovaries into presenting corpus luteum and presenting no corpus luteum. In all cases, we observed no significant difference between the right and left ovaries for both species.

4 | DISCUSSION

Although the ovarian morphology of *A. planirostris* and *E. furinalis* represents the general mammalian pattern, which is divided into cortex and medulla, with the follicles distributed in the cortex region (Spanel-Borowski, 2012), the ovaries presented the characteristic morphology of other members of their families. While *Artibeus planirostris* presented a polarized ovary in which the primordial follicles are localized in the medial side of the ovary, *E. furinalis* presented an abundance of interstitial gland cells in the medullary portion of the cortex and the follicles dispersed throughout the cortex, next to the surface epithelium.

Ovarian follicles unite (put together) in a specific region of the cortex, characterizing the polarized ovaries, which has been observed in some Phyllostomidae species such as *Artibeus jamaicensis* (Antonio-Rubio et al., 2013), *Glossophaga soricina* (Komar, Zacharichis-Jutz, Cretekos, Behringer, & Rasweiler, 2007), *Leptonycteris curasoae* (Hood & Smith, 1983), *Phyllostomus discolor*, *Phyllostomus elongatus* (Rasweiler & Badwaik, 2000) and *Sturnira lilium* (Antonio-Rubio et al., 2013) and some Pteropodidae species, *Otopteropus cartilagonodus* and *Ptenochirus jagori* (Heideman, Cummings, & Heaney, 1993; Heideman & Powell, 1998; Pow & Martin, 1994, 1995). Except for *G. soricina*, in which only the area with the primordial follicles is covered with the ovarian surface epithelium (OSE) (Komar et al., 2007), *A. planirostris*, as the other species, presented all the ovary covered by the surface epithelium. In *G. soricina*, ovulation takes place only in the region of the ovary covered by the OSE, while in *A. planirostris* and *E. furinalis*, it takes place at the

largest part of the ovarian surface, similar to other phyllostomid species.

Studies in several species, including humans, involving the OSE have produced evidences that it has the capacity to participate in ovulation-related functions in a variety of ways that are regulated by a complex set of hormone/growth factor responses.

The abundance of interstitial gland cells is a characteristic of species in the Vespertilionidae family, but is also present in some species of Molossidae (Rasweiler, 1988), Furipteridae, Natalidae, Thyropteridae and Mystacinidae (Rasweiler & Badwaik, 2000). Interstitial gland cells are differentiated cell types derived from the theca, which are androgen-producing cells (Guraya, 1978). The granulosa cells produce aromatase, which converts androgen to oestrogen, and the interstitial gland cells act as an oestrogen substrate delivery, indirectly promoting follicle growth (Spanel-Borowski, 2012). Among mammals, there is a great variability in the distribution of interstitial glands between different taxa (Guraya, 1978), but the difference in the abundance of interstitial gland cells between *A. planirostris* and *E. furinalis* could be related to a difference in ova production and hormone requirement between these species.

The classification of the follicles during folliculogenesis is an important step and should be widely standardized in order to compare different species and a prerequisite to use the primordial pool to enhance reproductive efficiency in domestic animals, humans and endangered species (Fortune, 2003). There are different proposals to categorize the follicles during folliculogenesis, generally considering the number of cells in the granulosa layers (Pedersen & Peters, 1968), the diameter of the follicles (Boling, Blandau, Soderwall,

& Young, 1941; Paesi, 1949), the number of granulosa layers (Hadek, 1965; Myers, Britt, Wreford, Ebling, & Kerr, 2004; Palma-Cerda, Di Fiore, Sepúlveda, Duran, & Raucchi, 2012), presence/absence of antrum cavity (Myers et al., 2004; Pedersen & Peters, 1968) and the size of the oocytes (Pedersen & Peters, 1968). According to the classification by Williams & Erickson (2012), which takes into account three factors, the number of layers of granulosa cells, the

antrum, we stated that *A. planirostris* and *E. furinalis* have five follicle stages in the folliculogenesis.

The presence of binovular to multi-oocyte follicles has been reported for several mammals (Pepling & Spradling, 2001; Sawyer et al., 2002; Tingen, Kim, & Woodruff, 2009), and they are divided into two types: in type I, the multi-oocyte follicles are separated by follicular/granulosa cells; in type II, the oocytes of the multi-oocyte follicles stay in contact with each other. While some authors hypothesize that these follicles undergo atresia during process, others believe that they can ovulate (Kennedy, 1924; Reynaud, Viaris de Lesegno, Chebrout, Thoumire, & Chastant-Maillard, 2009). However, the origin, biological significance and the fate of these follicles are still controversial (Balciuniene, Bardwell, & Zarkower, 2006; Reynaud et al., 2010; Telfer & Gosden, 1987).

In both *A. planirostris* and *E. furinalis*, we found only bi-novular and triovular type I follicles, which in an advanced stage of folliculogenesis they degenerate and are thus unable to ovulate.

According to the literature, there are two patterns of ovulation within Vespertilionidae (related to the implantation process): (i) both ovaries are capable of producing and releasing oocytes, but usually just one does it and implantation always occurs in the right uterine horn, or (ii) both ovaries produce and release oocytes, and usually there is, at least, one embryo implanted in each uterine horn. Both patterns do not seem to be phylogenetic related, as different species of the same genus have different patterns, as in the case of *Myotis lucifugus* and *Eptesicus regulus* belonging to the first pattern, while *Myotis austroriparus* and *Eptesicus fuscus* belong to the second pattern (Rasweiler & Badwaik, 2000). As observed, *E. furinalis* follows the second pattern, as this species shows ovulation in both ovaries and usually produces two litters (Luz, Jordão-Nogueira, Costa, & Esbérard, 2011).

The eastern populations of the two North American species *E. fuscus* and *Pipistrellus pipistrellus* release three to seven or more ova, but only two litters are produced per cycle (Wimsatt, 1945, 1975). The presence of two corpora lutea in the same ovary of *E. furinalis*, while the other ovary had, at least, one corpus luteum, and the presence of two embryos in the uterus (personal observations) could mean that this species can produce at least three ova each cycle, with the production of two litters, as in the case of the two North American species cited above. Also, there was no significant difference between the right and left ovaries of *E. furinalis*.

The condition of polyovulation is not exclusive of bats, as it was also reported for caviomorph rodents, elephant shrews, tenrecs (Wimsatt, 1975), pronghorn (Carling, Patryce, & ByersSource, 2003), goats (Cuetoa, Gibbonsa, Alberiob, Taddeoa, & Gonzalez--Bulnesc, 2006), domestic cats (Miclăus, Groza, & Oana, 2007), and plains viscacha (Flamini, Barbeito, Gimeno, & Portiansky, 2009). The reason

why these mammals can ovulate more than two ova to produce just one or two litters could be an adaptation to ensure an appropriated number of ova for litter production (Birney & Baird, 1985).

Furthermore, *E. fuscus* presents a promiscuous mating system, where males and females can copulate with more than one partner, and the females can solicit copulations actively from multiple males (Mendonça, Chernetsky, Nester, & Gardner, 1996). In the case of the eastern populations in North America, some populations can present offspring with multiple paternities (Vonhof, Barber, Fenton, & Strobeck, 2006). Different mates with different males allow genetic variability in the sperm and heterozygosity in the offspring, ensuring higher fitness and survival of the offspring (Foerster, Delhey, Johnsen, Lifjeld, & Kempenaers, 2003; Spottiswoode & Møller, 2004). The production and release of more oocytes can be related to the increase in the heterozygosity in the offspring associated with the promiscuous mating, which could be the case in *E. furinalis*.

Unlike *E. furinalis*, we could note that *A. planirostris* present a partial dominance of the left ovary, with 76.2% of the ovulation occurring in the left ovary. The asymmetry of the reproductive organs is a stronger characteristic in bats than in any other mammal order (Wimsatt, 1979). The asymmetry of the reproduction in bats can be related to anatomical and/or functional aspects of the reproductive organs; that is, it can be related to a partial or complete dominance of one ovary, the alternation of ovulation between both ovaries, differential stimulation of the oviducts and uterine horns, and/or the dominance of one uterine horn (Rasweiler & Badwaik, 2000).

Although *E. furinalis* has no ovarian asymmetry, the asymmetrical pattern does not seem to be phylogenetically related, as members of the same family can present different patterns of asymmetry. For example, within Vespertilionidae, *Miniopterus schreibersii*, *Miniopterus australis* and *Miniopterus fraterculus* present a partial dominance of the left ovary (Bernard, 1980; Richardson, 1977), while *Pipistrellus ceylonicus*, *Pipistrellus hesperus*, *Pipistrellus mimus* and *Pipistrellus subflavus* present both ovaries functioning during each cycle, but sometimes, a frequency of ovulation can be seen in the right ovary (Gopalakrishna & Badwaik, 1988; Gopalakrishna, Thakur, & Madhavan, 1975; Wimsatt, 1945).

Dextral or partial dominance seems to be more frequent in Chiroptera, involving not only ovulation in the right ovary, but also a fetus development in the right portion of the uterus (Rasweiler & Badwaik, 2000). Sinistral dominance or partial dominance occurs only in *Mormoops megalophylla*, *Natalus tumidirostris*, *Hipposideros* sp., *M. schreibersii*, *M. australis*, *M.*

For the Phyllostomidae species, *Desmodus rotundus*, *Carollia* sp. and *G. soricina* have both functional ovaries, with an alternation of ovulation (Rasweiler, 1974, 1979). However, *A. planirostris* presents both functional ovaries, but with a partial sinistral dominance of ovulation. Besides the partial dominance of the left ovary of *A. planirostris*, we could not find any significant difference between the ovaries of this species.

Females of *A. planirostris* ovulate just one ovum per cycle, which is consistent with the number of offspring produced by females. In general, phyllostomid females produce just one litter per cycle (Fleming et al., 1972; Taddei, 1976).

To date, there is no information about the mating behaviour of *A. planirostris*, but a related species from the same genus, *A. jamaicensis*, presents a harem organization, with one dominant male defending a group of 4 to 20 females, and usually those females copulate with just one male (Kunz, August, & Burnett, 1983; Ortega, Guerrero, & Maldonado, 2008). The condition of the harem might be leading to the condition of females of *A. planirostris* to produce just one ovum per cycle, as each female copulates with just one male.

5 | CONCLUSIONS

Artibeus planirostris and *E. furinalis* present an ovary morphology with characteristics related to the family and genus to which they belong: *A. planirostris* has a polarized ovary, with all the primordial follicles located in a portion of the ovary and few interstitial gland cells, while *E. furinalis* presents an abundance of interstitial gland cells and the primordial follicles located in all the ovary. Besides, *A. planirostris* is a monovular and *E. furinalis* a polyovular species. Our results express the variation between two Neotropical species, reflecting the great variation in the reproductive aspects in Chiroptera.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Luiz Roberto Falleiros Junior for technical help. The scholarships awarded by the Brazilian Research Foundation (CAPES) to Larissa Mayumi Bueno and Dianelli Lisboa Caun are also gratefully acknowledged. We are also grateful for the support by the Brazilian National Research and Development Council (CNPq) Processes: 300163/2008--8 and 301596/2011--5 and for research fellowships to SRT and Processes: 302008/2010 and 301073/2013--9 to EMV.

ORCID

Eliana Morielle-Versute  <http://orcid.org/0000-0002-0228-3820>

REFERENCES

- Aguilar, L. M. S., & Antonini, Y. (2008). Diet of two sympatric insectivorous bats (Chiroptera: Vespertilionidae) in the Cerrado of Central Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 25, 28–31. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752008000100005>
- Antonio-Rubio, N. R., Porras-Gómez, T. J., & Moreno-Mendoza, N. (2013). Identification of cortical germ cells in adult ovaries from three phyllostomid bats: *Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* and *Sturnira lilium*. *Reproduction, Fertility and Development*, 25, 825–836. <https://doi.org/10.1071/RD12126>
- Araújo, R. A., Amaro, B. D., Talamoni, S. A., & Godinho, H. P. (2013). Seasonal reproduction of Yellowish *Myotis*, *Myotis levis* (Chiroptera: Vespertilionidae), from a Neotropical Highland. *Journal of Morphology*, 274, 1230–1238. <https://doi.org/10.1002/jmor.20175>
- Balciuniene, J., Bardwell, V. J., & Zarkower, D. (2006). Mice mutant in the DM domain gene *Dmrt4* are viable and fertile but have polyovular follicles. *Molecular and Cell Biology*, 26, 8984–8991. <https://doi.org/10.1128/MCB.00959-06>
- Bansal, N., & Uppal, V. (2014). Ovarian folliculogenesis in mammals: A qualitative and quantitative analysis. *Indian Journal of Veterinary Anatomy*, 26, 1–6.
- Barquez, R. M., Mares, M. A., & Braun, J. K. (1999). The bats of Argentina. *Special Publications of Texas Tech University Museum*, 42, 1–275.
- Beguelini, M. R., Moreira, P. R. L., Faria, K. C., Marchesin, S. R. C., & Morielle-Versute, E. (2009). Morphological characterization of the testicular cells and seminiferous epithelium cycle in six species of Neotropical bats. *Journal of Morphology*, 270, 943–953. <https://doi.org/10.1002/jmor.10731>
- Beguelini, M. R., Puga, C. C. I., Taboga, S. R., & Morielle-Versute, E. (2013). Annual reproductive cycle of males of the flat-faced fruit-eating bat, *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). *General and Comparative Endocrinology*, 185, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.12.009>
- Behmer, O. A., Tolosa, E. M. C., & Freitas-Neto, A. G. (1976). *Manual de técnicas para Histologia Normal e Patológica*. São Paulo: Edart.
- Bernard, R. T. F. (1980). Reproductive cycles of *Miniopterus schreibersii natalensis* (Kuhl, 1819) and *Miniopterus fraterculus* (Thomas and Schwann, 1906). *Annals of the Transvaal Museum*, 32, 55–64.
- Birney, E. C., & Baird, D. D. (1985). Why do some mammals poly-ovulate to produce a litter of two? *The American Naturalist*, 126, 136–140. <https://doi.org/10.1086/284403>
- Boling, J. L., Blandau, R. I., Soderwall, A. L., & Young, W. C. (1941). Growth of Graafian follicle and time of ovulation in the albino rat. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 79, 313–331. <https://doi.org/10.1002/ar.1090790305>
- Bueno, L. M., Beguelini, M. R., Comelis, M. T., Taboga, S. R., & Morielle-Versute, E. (2014). Ultrastructure of spermatogenesis, spermatozoon and processes of testicular regression and recrudescence in *Eptesicus furinalis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Animal Reproduction Science*, 148, 228–244. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.05.018>
- Carling, M. D., Patryce, A. W., & ByersSource, J. A. (2003). Microsatellite analysis reveals multiple paternity in a population of wild pronghorn antelopes (*Antilocapra*

- Cuetoa, M., Gibbonsa, A., Alberiob, R., Taddeoa, H., & Gonzalez-Bulnesc, A. (2006). Timing of emergence of ovulatory follicles in polyovulatory goats. *Animal Reproduction Science*, 91, 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.007>
- De Knecht, L. V., Silva, J. A., Moreira, E. C., & Sales, G. L. (2005). Morcegos capturados no município de Belo Horizonte, 1999–2003. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57, 576–583. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352005000500002>
- Delbes, G., Levacher, C., Pairault, C., Racine, C., Duquenne, C., Krust, A., & Habert, R. (2004). Estrogen receptor beta mediated inhibition of male germ cell line development in mice by endogenous estrogens during perinatal life. *Endocrinology*, 145, 3395–3403. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1479>
- Flamini, M. A., Barbeito, C. G., Gimeno, E. J., & Portiansky, E. L. (2009). Histology, histochemistry and morphometry of the ovary of the adult plains viscacha (*Lagostomus maximus*) in different reproductive stages. *Acta Zoologica*, 90, 390–400. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2008.00386.x>
- 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. <https://doi.org/10.2307/1934771>
- Foerster, K., Delhey, K., Johnsen, A., Lifjeld, J. T., & Kempnaers, B. (2003). Females increase offspring heterozygosity and fit-ness through extrapair matings. *Nature*, 425, 714–717. <https://doi.org/10.1038/nature01969>
- Fortune, J. E. (2003). The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, 78, 135–163. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00088-5)
- González, E. M. (2001). *Guía de Campo de los Mamíferos de Uruguay*. Montevideo: Vida Silvestre, Sociedade Uruguaya para la Conservación de la Naturaleza.
- Gopalakrishna, A., & Badwaik, N. (1988). Growth of the corpus luteum in relation to gestation in some Indian bats. *Current Science*, 57, 883–886.
- Gopalakrishna, A., Thakur, R. S., & Madhavan, A. (1975). Breeding biology of the southern dwarf pipistrelle *Pipistrellus mimus mimus* (Wroughton) from Maharashtra, India. In K. K. Tiwari & C. B. Sivastave (Eds.), *Dr. B.S. Chauhan Commemoration Volume*. Ovisso: Zoological Society of India.
- Graham, G. L. (1987). Seasonality of reproduction in Peruvian bats, In B. D. Patterson & R. M. Timm (Eds.), *Studies in Neotropical mammalogy, essays in honor of Philip Hershkovitz*. (pp.173–181). *Fieldiana, Zoology (New Series)*, 39, 1–506.
- Guraya, S. S. (1978). Recent advances in the morphology, histochemistry, biochemistry, and physiology of interstitial gland cells of mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 55, 171–245. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61889-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61889-6)
- Gustafson, A. W. (1979). Male reproductive patterns in hibernating bats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 56, 317–331. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0560317>
- Hadek, R. (1965). The structure of the mammalian egg. *International Review of Cytology*, 18, 29–71. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60551-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60551-3)
- Heideman, P. D., Cummings, J. A., & Heaney, L. R. (1993). Reproductive timing and early embryonic development in an Old World fruit bat, *Otopteropus cartilagonodus* (Megachiroptera). *Journal of Mammalogy*, 74, 621–630. <https://doi.org/10.2307/1382282>
- Heideman, P. D., & Powell, K. S. (1998). Age-specific reproductive strategies and delayed embryonic development in an Old World fruit bat, *Ptenochirus jagori*. *Journal of Mammalogy*, 79, 295–311. <https://doi.org/10.2307/1382866>
- Hollis, L. (2005). *Artibeus planirostris*. *Mammalian Species*, 775, 1–6. [https://doi.org/10.1644/1545-1410\(2005\)775\[0001:AP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1410(2005)775[0001:AP]2.0.CO;2)
- Hood, C. S., & Smith, J. D. (1983). Histomorphology of the female reproductive tract in phyllostomid bats. *Occasional Papers of Texas Tech University Museum*, 86, 1–38.
- Kennedy, P. W. (1924). The occurrence of polyovular Graafian follicles. *Journal of Anatomy*, 58, 328–334.
- Komar, C. M., Zacharachis-Jutz, F., Cretikos, C. J., Behringer, R. R., & Rasweiler, J. J. IV (2007). Polarized ovaries of the long-tongued bat, *Glossophaga soricina*: A novel model for studying ovarian develop-ment, folliculogenesis, and ovulation. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 290, 1439–1448. <https://doi.org/10.1002/ar.20602>
- Kunz, T. H., & Anthony, E. L. P. (1982). Age estimation and post-natal growth in the little brown bat, *Myotis lucifugus*. *Journal of Mammalogy*, 63, 23–32. <https://doi.org/10.2307/1380667>
- Kunz, T. H., August, P. V., & Burnett, C. D. (1983). Harem social organization in cave roosting *Artibeus jamaicensis* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Biotropica*, 15, 133–138. <https://doi.org/10.2307/2387958>
- Lopez, L. E., & Vaughan, C. (2004). Observations on the role of frugivorous bats as seed dispersers in Costa Rican secondary humid forests. *Acta Chiropterologica*, 6, 111–119. <https://doi.org/10.3161/001.006.0109>
- Luz, J. L., Jordão-Nogueira, T., Costa, L. M., & Esbérard, C. E. L. (2011). Observações sobre *Eptesicus furinalis* (d'Orbigny & Gervais, 1847) (Vespertilionidae) em forros no Estado do Rio de Janeiro, Brazil. *Chiroptera Neotropical*, 17, 826–831.
- Malgorzata, D., Malgorzata, G., Malgorzata, K., & Tabarowski, Z. (2016). The Primordial to Primary Follicle Transition — A Reliable Marker of Ovarian Function, In R. Payan Carreira (Ed.), *InTech*. Retrieved from <https://www.intechopen.com/books/in-sights-from-animal-reproduction/the-primordial-to-primary-folli-cle-transition-a-reliable-marker-of-ovarian-function>.
- Mendonça, M. T., Chernetsky, S. D., Nester, K. E., & Gardner, G. L. (1996). Effects of gonadal sex steroids on sexual behavior in the Big Brown Bat, *Eptesicus fuscus*, upon arousal from hibernation. *Hormones and Behaviour*, 30, 153–161. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1996.0019>
- Miclăus, V., Groza, I., & Oana, L. (2007). Domestic cat (*Felis catus*) polyovular follicles. *Bulletin USAMV-CN*, 64, 1–2. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-vm:64:1-2:2476>
- Mies, R., Kurta, A., & King, D. G. (1996). *Eptesicus furinalis*. *Mammalian Species*, 526, 1–7. <https://doi.org/10.2307/3504316>
- Miranda, J. M. D., Bernardi, I. P., & Passos, F. C. (2006). A new spe-cies of *Eptesicus* (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae) from the Atlantic Forest Brazil. *Zootaxa*, 1383, 57–68. <https://doi.org/10.2307/3504316>
- Morais, D. B., Oliveira, L. C., Cupertino, M. C., Freitas, K. M., Freitas, M. B. D., Paula, T. A. R., & Matta, S. L. P. (2013). Organization and seasonal quantification of the intertubular compartment in the bat *Molossus molossus* (Pallas, 1776) testis. *Microscopy Research and Technique*, 76, 94–101. <https://doi.org/10.1002/jemt.22141>
- Myers, P. (1977). Patterns of reproduction of four species of vesper-tilionid bats in Paraguay. *University of California Publications in Zoology*, 107, 1–41.

- Nowak, R. M. (1999). *Walker's Mammals of the World*, 6th ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Ortega, J., Guerrero, J. A., & Maldonado, J. E. (2008). Aggression and tolerance by dominant males of *Artibeus jamaicensis*: Strategies to maximize fitness in harem groups. *Journal of Mammalogy*, 89, 1372–1378. <https://doi.org/10.1644/08-MAMM-S-056.1>
- Paesi, F. J. A. (1949). The relation between the rate of growth of follicle and the shape of the frequency curve presenting their variability in size. *Acta Endocrinologica*, 3, 173–180. <https://doi.org/10.1530/acta.0.0030173>
- Palma-Cerda, F., Di Fiore, M. M., Sepúlveda, M., Duran, L. R., & Raucci, F. (2012). Ovarian folliculogenesis in the southern sea lion *Otaria flavescens*. *Acta Zoologica Stockholm*, 93, 444–452. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2011.00519.x>
- Pedersen, T., & Peters, H. (1968). Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 17, 555–557. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0170555>
- Pepling, M. E., & Spradling, A. C. (2001). The mouse ovary contains germ cell cysts that undergo programmed breakdown to form follicles. *Developmental Biology*, 234, 339–351. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0269>
- Pow, C. S. T., & Martin, L. (1994). The ovarian–uterine vasculature in relation to unilateral endometrial growth in flying foxes (genus *Pteropus*, suborder Megachiroptera, order Chiroptera). *Journal of Reproduction and Fertility*, 101, 247–255. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1010247>
- Pow, C. S. T., & Martin, L. (1995). Ovarian and uterine lymphatic drainage in Australian flying foxes (genus *Pteropus*, suborder Megachiroptera). *Cell and Tissue Research*, 280, 371–381. <https://doi.org/10.1007/BF00307810>
- Rasweiler, J. J. IV (1974). Reproduction in the long–tongued bat, *Glossophaga soricina*. II. Implantation and early embryonic development. *American Journal of Anatomy*, 139, 1–36. <https://doi.org/10.1002/aja.1001390102>
- Rasweiler, J. J. IV (1979). Early embryonic development and implantation in bats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 56, 403–416. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0560403>
- Rasweiler, J. J. IV (1988). Ovarian function in the captive black mastiff bat, *Molossus ater*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82, 97–111. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820097>
- Rasweiler, J. J. IV (1993). Pregnancy in Chiroptera. *Journal of Experimental Zoology*, 266, 495–513. <https://doi.org/10.1002/jez.1402660603>
- Rasweiler, J. J. IV, & Badwaik, N. K. (2000). Anatomy and Physiology of the Female Reproductive Tract. In E. G. Crichton, & P. H. Kutzsch (Eds.), *Reproductive Biology of Bats*. London: Academic Press.
- Rasweiler, J. J. IV, Badwaik, N. K., & Mechineni, K. V. (2011). Ovulation, fertilization and early embryonic development in the menstruating fruit bat, *Carollia perspicillata*. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 294, 506–519. <https://doi.org/10.1002/ar.21304>
- Reis, N. R., Peracchi, A. L., Pedro, W. A., & Lima, I. P. (2007). Morcegos do Brasil. Londrina. 253p.
- Reynaud, K., Halter, S., Tahir, Z., Thoumire, S., Chebrou, M., & Chastant-Maillard, S. (2010). Polyovular follicles. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 38, 395–397. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2010.04.008>
- Reynaud, K., Viaris de Lesegno, C., Chebrou, M., Thoumire, S., & Chastant-Maillard, S. (2009). Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology*, 72, 1120–1131. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.006>
- Ribeiro, M. G., & Lima, S. R. (2000). *Iniciação às técnicas de preparação de material para o estudo e pesquisa em morfologia*. Belo Horizonte: SEGRAC-Editora e Gráfica Ltda.
- Richardson, E. G. (1977). The biology and evolution of the reproductive cycle of *Miniopterus schreibersii* and *M. australis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Journal of Zoology*, 183, 353–375. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1977.tb04193.x>
- Rojas, J., Chávez-Castillo, M., Olivar, L. C., Calvo, M., Mejías, J., Rojas, M., & Bermúdez, V. (2015). Physiologic course of female reproductive function: A molecular look into the prologue of life. *Journal of Pregnancy*, 2015, 715–735. <https://doi.org/10.1155/2015/715735>
- Sawyer, H. R., Smith, P., Heath, D. A., Juengel, J. L., Wakefield, S. J., & McNatty, K. P. (2002). Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of Reproduction*, 66, 1134–1150. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.4.1134>
- Simmons, N. B. (2005). Order Chiroptera. In D. E. Wilson, & D. M. Reeder (Eds.), *Mammals Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Skinner, M. K. (2005). Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction Update*, 5, 461–471. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi020>
- Spaniel-Borowski, K. (2012). *Atlas of the Mammalian Ovary*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30535-1>
- Spottiswoode, C., & Møller, A. P. (2004). Genetic similarity and hatching success in birds. *Proceedings. Biological Sciences/The Royal Society*, 271, 267–272. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2605>
- Taddei, V. A. (1976). The reproduction of some Phyllostomidae (Chiroptera) from the northwestern region of the State of São Paulo. *Boletim de Zoologia*, 1, 313–330. <https://doi.org/10.11606/issn.2526-3358.bolzo.1976.121587>
- Telfer, E., & Gosden, R. G. (1987). A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 81, 137–147. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0810137>
- Tingen, C., Kim, A., & Woodruff, K. (2009). The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Molecular Human Reproduction*, 15, 795–803. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap073>
- Vonhof, M. J., Barber, D., Fenton, M. B., & Strobeck, C. (2006). A tale of two siblings: Multiple paternity in big brown bats (*Eptesicus fuscus*) demonstrated using microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 15, 241–247. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02801.x>
- Williams, M. A. (1977). *Practical methods in electron microscopy: Part 2 Quantitative methods in biology*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company.
- Willig, M. R. (1985). Reproductive patterns of bats from Caatingas and Cerrado biomes of Northeast Brazil. *Journal of Mammalogy*, 66, 668–681. <https://doi.org/10.2307/1380793>
- Williams, C. J., Erickson, G. F., (2012). Morphology and Physiology of the Ovary. In L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer, & A. Vinik (Eds.), *Endotext [Internet]*

- South Dartmouth, MA: MDText.com, Inc. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/>
- Wimsatt, W. A. (1945). Notes on breeding behaviour, pregnancy and parturition in some vespertilionid bats of the eastern United States. *Journal of Mammalogy*, 26, 23–33. <https://doi.org/10.2307/1375029>
- Wimsatt, W. A. (1975). Some comparative aspects of implantation. *Biology of Reproduction*, 12, 1–40. <https://doi.org/10.1095/biolreprod12.1.1>
- Wimsatt, W. A. (1979). Reproductive asymmetry and unilateral pregnancy in Chiroptera. *Journal of Reproduction and Fertility*, 56, 345–357. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0560345>

How to cite this article: Bueno LM, Caun DL, Comelis MT, Beguelini MR, Taboga SR, Morielle-Versute E. Ovarian morphology and folliculogenesis and ovulation process in the flat-faced fruit-eating bat *Artibeus planirostris* and the Argentine brown bat *Eptesicus furinalis*: A comparative analysis. *Acta Zool.* 2018;00:1–12. <https://doi.org/10.1111/azo.12247>

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no exposto, são considerações deste trabalho:

- O processo de regressão testicular em *Eptesicus furinalis* acarreta em mudanças morfométricas (área do túbulo seminífero) e estereológicas (porcentagem relativa de epitélio, lúmen e tecido intersticial) nos testículos durante as suas quatro fases testiculares, sendo que essas mudanças ocorrem de acordo com a atividade espermatogênica do testículo, apresentando maiores valores na fase ativa e menores valores na fase regredida.
- a regressão e a recrudescência dos testículos durante o processo de regressão testicular são controladas pelos hormônios andrógenos, evidenciadas pela variação na expressão dos receptores de LH nas células de Leydig e AR nas células de Sertoli, e a recrudescência testicular ocorre por proliferação das células testiculares, evidenciada pela variação na marcação positiva de PCNA.
- o epidídimo de *E. furinalis* apresenta a morfologia geral semelhante à de outros mamíferos, sendo dividido em cabeça, corpo e cauda, e apresentando o epitélio composto por células principais, basais, apicais, claras, estreitas e halo.
- a altura do epitélio e a porcentagem relativa de epitélio, lúmen e estroma apresenta variação nas três regiões do epidídimo em relação ao processo de regressão testicular, sendo que a média da altura do epitélio é maior na fase ativa e menor na fase regredida, enquanto que a porcentagem relativa de estroma é maior na fase regredida e menor na fase ativa.
- a porcentagem relativa do lúmen na cauda do epidídimo durante as fases em regressão e regredida apresentam os maiores valores quando comparadas com a mesma região nas outras fases. Portanto, o maior valor relativo de lúmen na cauda do epidídimo durante as fases em que a espermatogênese não ocorre é indicativo de armazenamento de espermatozoides.

- o processo de foliculogênese nas espécies *Artibeus planirostris* e *E. furinalis* é similar ao de outros mamíferos e os folículos podem ser classificados em primordiais, primários, secundários, terciários e antrais.
- *A. planirostris* e *E. furinalis* apresentam a morfologia geral do ovário similar a de outros mamíferos, sendo o ovário dividido em córtex e medula. Entretanto, *E. furinalis* apresenta uma abundância de glândulas intersticiais e folículos primordiais distribuídos por todo o ovário, enquanto *A. planirostris* apresenta poucas glândulas intersticiais e os folículos primordiais estão localizados em uma área específica do ovário, constituindo um ovário polarizado.
- Ambas as espécies diferem também no padrão de ovulação. *A. planirostris* libera um único oócito predominantemente pelo ovário esquerdo, enquanto *E. furinalis* pode liberar mais de um oócito por ambos os ovários.
- o ciclo reprodutivo anual das fêmeas de *E. furinalis* apresenta fêmeas não reprodutivas (não grávidas e não lactantes) de Janeiro e Julho, e fêmeas grávidas e/ou lactantes de Agosto a Dezembro.
- durante o ciclo reprodutivo anual das fêmeas de *E. furinalis*, ocorre uma variação na produção folicular, apresentando folículos antrais durante a gravidez e lactação, e variação na concentração sérica de estradiol, apresentando o maior valor no mês de Setembro.
- a presença de folículos antrais durante o período de gravidez e lactação, a presença de fêmea grávida em Dezembro, e a variação na concentração sérica de estradiol são indicativas da ocorrência de estro pós-parto em *E. furinalis*, podendo ocorrer então a produção de filhotes duas vezes ao ano, indicando um padrão bimodal para a espécie.

Com esses resultados, mostramos a complexidade da fisiologia e da morfologia reprodutiva nos machos e fêmeas de *E. furinalis*, bem como a variação na morfologia dos órgãos reprodutivos entre diferentes espécies de morcegos tropicais.