UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

CINTIA CRISTINA ISICAWA PUGA

Morfofisiologia das glândulas reprodutivas acessórias masculinas de morcegos: estudo nas espécies *Artibeus planirostris* e *Platyrrhinus lineatus* (Chiroptera: Phyllostomidae).

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Co-orientadora: Profª Drª Patrícia Simone Leite Vilamaior

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, área Biologia Estrutural, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

-2011-

Puga, Cintia Cristina Isicawa.
Morfofisiologia das glândulas reprodutivas acessórias masculinas de morcegos: estudo nas espécies *Artibeus planirostris* e *Platyrrhinus lineatus* (Chiroptera: Phyllostomidae) / Cintia Cristina Isicawa Puga. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.
130 f. ; il. ; 30 cm.

Orientador: Sebastião Roberto Taboga
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia animal. 2. Morcego – Morfologia. 3. Morcego – Reprodução. 4. Próstata. I. Taboga, Sebastião Roberto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 599.4

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

CINTIA CRISTINA ISICAWA PUGA

Morfofisiologia das glândulas reprodutivas acessórias masculinas de morcegos: estudo nas espécies *Artibeus planirostris* e *Platyrrhinus lineatus* (Chiroptera: Phyllostomidae).

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga
Professor Adjunto
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Profª. Drª. Rejane Maira Góes
Professor Adjunto
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Sergio Luis Felisbino
Professor Adjunto
UNESP – Botucatu

São José do Rio Preto, 28 de fevereiro de 2011

AGRADECIMENTOS

Este espaço dedico àqueles que deram a sua contribuição para que este trabalho fosse realizado, pois nada na vida conquistamos sozinhos, sempre precisamos de outras pessoas para alcançar nossos objetivos. A todos deixo aqui meu agradecimento sincero.

Agradeço...

Ao meu orientador **Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga**; Sebaka obrigada por ter me acolhido mesmo sem me conhecer, oferecendo-me a oportunidade de contribuir com uma de suas linhas de pesquisa. Obrigada por acreditar no meu trabalho, pela orientação, incentivo e bom convívio. E também, por todas as vezes que me emprestou seu carro e foi pra faculdade caminhando, para que eu realizasse as minhas coletas.

À **Profª Drª Patrícia Simone Leite Vilamaior**, pela co-orientação neste trabalho, por ter realizado as primeiras análises nas glândulas de morcego, as quais foram imprescindíveis para realização deste trabalho, obrigada por toda contribuição.

À **Profª Drª Rejane Maíra Góes** e **Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino**, membros titulares e aos membros suplentes **Profª Drª Silvana Martinez Baraldi Artoni** e **Prof. Dr. Wagner André Pedro,** por aceitarem a indicação para formarem minha banca examinadora, por toda a futura contribuição, as quais tenho certeza que enriquecerão ainda mais o meu trabalho.

Aos professores do meu exame geral de qualificação**, Prof. Dr. Classius de Oliveira** e **Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino** pelas sugestões e esclarecimentos, os quais contribuíram para que a dissertação ficasse mais coesa.

À todos os amigos que me ajudaram nas coletas (**Carol loira, Carol morena, Fernanda, Lívia, Mateus, Melina, Stéphannie** e **Samantha**), ou mesmo os que estavam no laboratório na hora certa e apenas me ajudaram na montagem das redes (**Luiz, Ricardinho, Egon** e **Bruno**), pois sem eles meu trabalho ficaria muito mais difícil.

Aos companheiros de linha de pesquisa: **Mateus, Carol loira, Carol morena, Fabi** e **André**, que me apoiaram e ajudaram durante todo o desenvolver deste trabalho. Em especial ao **Mateus** que disponibilizou grande parte de seu tempo para me ensinar à coletar, várias técnicas do laboratório, e também por me auxiliar nas discussões dos resultados e na correção de grande parte deste manuscrito.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia e Microanálise, por todas as experiências vividas, pelos bons momentos de descontração, por compartilharem os conhecimentos teórico-práticos específicos, pelo auxílio em várias atividades, e, sobretudo por toda amizade desprendida....**Ana Paula, André, Bianca, Bruno, Camila, Carol Christante, Carol Frandsen, Carol Negrin, Dani, Diego, Egon, Eloísa, Fabi, Fernanda, Filipe, Maê, Mariana Marcielo, Mariana Zanateli, Marina, Mateus, Ricardo, Sabrina, Samantha, Sérgio, Simone**, **Vanessa** e **Victória.**

À **Lilian Franco Belussi** por sempre estar presente quando precisava de algum esclarecimento tanto relacionado com as regras da pós-graduação quanto com os meus experimentos, pelo convívio nos congressos e em nossas aulas do CCI.

Aos **docentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal** que contribuíram no aperfeiçoamento dos meus conhecimentos e, conseqüentemente para minha formação profissional.

À **Profª Drª Eliana Morielle-Versute** por disponibilizar seu laboratório quando precisei, por esclarecer dúvidas tanto teóricas quanto de identificação de animais.

Ao super técnico **Luiz Roberto Falleiros Jr** por toda a ajuda desprendida tanto no trabalho quanto na vida, pela sua preocupação e conselhos, e principalmente por toda sua animação a qual deixa nosso ambiente de trabalho muito mais alegre.

Aos professores de graduação por tudo que me ensinaram, e que contribuíram para minha formação. Em especial, aos professores**: Profª. Drª. Ana Paula L. Brancaleoni, Prof. Dr. Antonio S. Ferraudo, Profª. Drª. Kênia Cardoso Bicego, Profª. Drª. Luciane H. Gargaglioni, Prof. Marcos L. de Araújo** e **Profª. Drª. Rosemary de Oliveira**, por terem me permitido participar de suas linhas de pesquisa e me concedido a oportunidade de conhecer as diversas faces da vida de um pesquisador, permitindo que eu caminhasse pelas áreas biológicas, humanas e exatas; pela pesquisa qualitativa, quantitativa, descritiva ou experimental. Experiências estas que me mostraram o caminho da ciência e proporcionaram a base que tenho sobre pesquisa.

À **Profª Drª Lia Raquel S. Santos** e à **Profª Drª Raquel F. Domeniconi** pelo aprendizado nas monitorias realizadas, pela amizade e ajuda na hora de escolher o caminho a ser tomado para a pós-graduação, sem elas eu não estaria aqui.

À **CAPES** pelos primeiros meses de bolsa de estudo concedida.

À **FAPESP** pelo auxílio pesquisa (Processo: 2009/03470-2) e pela bolsa de estudos concedida (Processo: 2009/06666-5).

Em especial, agradeço...

À **Deus** por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais **José**, **Sonia** e **Claudinei** que não me deram apenas a vida, mas também a educação, condições de estudo, e me ensinaram fazer tudo da melhor forma possível com dignidade, confiando em mim e apoiando para que conseguisse realizar os meus sonhos, obrigada por sempre estarem presentes.

Ao meu irmão **Tiago**, que apesar de todas as nossas discussões, me ajuda em tudo que preciso. Obrigada por me entender, pelo companheirismo, amizade e alegrias.

A toda a **minha família** e **amigos**, por todo o apoio e amor desprendido, por compreender a minha ausência, e por todas as orações feitas ao meu favor.

A todos meus amigos de graduação por terem compartilhado anos importantes da minha vida. Principalmente aos componentes do quinteto fantástico (**Camila, Caio, Verônica** e **Tais**) por todos os e-mails que trocamos, os quais me fizeram: os sentir perto mesmo estando longe, sorrir nos momentos alegres e me confortar nos tristes.

Às minhas amigas de república **Carla, Fernanda**, **Francielle**, **Gisele, Melina** e **Vivian,** pela amizade e risadas, por todos os brigadeiros e seriados, pelos bons momentos de lazer, pela preocupação quando voltava tarde das coletas, por me escutarem todas as dificuldades que surgiram durante este trabalho, mesmo que na maioria das vezes não faziam idéia do que eu estava falando, e principalmente por ser a minha família durante esses anos.

"A felicidade não se resume na ausência de problemas, mas sim na sua capacidade de lidar com eles."

Einstein.

SUMÁRIO

RESUMO 8

ABSTRACT 10

I. INTRODUÇÃO 12

II. OBJETIVOS 25

III. ARTIGO 1 ……..... 28
Structure, histochemistry and ultrastructure of the male reproductive accessory glands in the Neotropical flat-faced fruit-eating bat, *Artibeus planirostris (*Chiroptera: Phyllostomidae).

IV. ARTIGO 2 ……..... 58
Avaliação anual do complexo prostático masculino de uma espécie de morcego exclusivamente neotropical, *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae).

V. ARTIGO 3 ……..... 96
Morfologia das glândulas reprodutivas acessórias masculinas de uma espécie de Phyllostomidae, *Platyrrhinus lineatus* (Chiroptera: Phyllostomidae).

VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 119

VII. REFERÊNCIAS..... 121

RESUMO

Chiroptera é a segunda maior ordem de mamíferos, esta apresenta diferentes estratégias e algumas características reprodutivas únicas. Entretanto, raros são os relatos relacionados com as glândulas reprodutivas acessórias (GRAs) masculinas de morcegos brasileiros. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar e comparar morfologicamente as GRAs de duas espécies de Phyllostomidae, *Artibeus planirostris* e *Platyrrhinus lineatus*, procurando traçar um panorama anatômico, histológico e histoquímico comparativo, levando em conta as possíveis influências da sazonalidade e da concentração plasmática de esteróides sexuais sobre as glândulas ao longo do ano. Machos adultos de ambas as espécies foram coletados no município de São José do Rio Preto de maio de 2009 a julho de 2010, e as GRAs foram submetidas às análises macroscópicas, microscópicas e ultraestruturais. Este estudo mostrou que as GRAs, de ambas as espécies estudadas, são compostas por um complexo glandular prostático, com duas regiões distintas (ventral e dorsal), glândulas parauretrais dispersas e um par de glândulas bulbouretrais, e não apresentam glândula vesicular. Macroscopicamente, a região ventral apresenta uma coloração esbranquiçada, aparência compacta e circunda a parte ventral da uretra. Já a região dorsal apresenta coloração rosa e aparência translúcida, esta intimamente ligada a região ventral circundando a parte dorsal da uretra, esta região recebe os ductos deferentes. As glândulas bulbouretrais localizam-se na raiz peniana e as glândulas parauretrais estão dispersas no tecido conjuntivo da uretra. Microscopicamente a região ventral apresenta um epitélio indefinido com células secretoras e poucas células basais, esse epitélio produz uma secreção PAS positiva. A região dorsal apresenta um epitélio pseudoestratificado colunar, com células basais e secretoras, essa região apresenta três tipos de secreção: basófila, PAS positiva e mista. A glândula bulbouretral é uma glândula acinar de formato oval, parcialmente

circundada por tecido muscular, apresenta epitélio cilíndrico com núcleos basais, a secreção é PAS positiva. Nossos dados histológicos e ultraestruturais também confirmaram a natureza prostática da região dorsal e a holócrina da região ventral, fato este nunca antes descrito para a glândula prostática. Quanto aos dados sazonais, concluímos que *A. planirostris* apresenta um padrão de reprodução poliéstrico bimodal para espécimes do noroeste do estado de São Paulo e que esse padrão aparenta ser intimamente regulado por um aumento gradativo da taxa de testosterona circulante, que estimula ambas as regiões prostáticas a se prepararem para os dois períodos reprodutivos. Assim, quando comparamos nossos dados anatômicos e fisiológicos com a literatura e estudos prévios do nosso laboratório, podemos inferir que as GRAs de Phyllostomidae (Stenodermatinae) apresentam um padrão morfológico comum. Sugerimos que sejam realizados mais estudos envolvendo a estrutura e fisiologia das GRAs em diferentes espécies de morcegos, os quais contribuirão para um melhor entendimento dos processos reprodutivos em Chiroptera e, quando associados a outros caracteres, contribuirão também às filogenias morcego.

PALAVRAS-CHAVE: Chiroptera, Complexo Glandular Prostático, Phyllostomidae, Sazonalidade.

ABSTRACT

The Chiroptera is the second largest mammalian order, presenting different reproductive strategies and some unique reproductive features. However, there are no reports related to male reproductive accessory glands (RAGs) in Brazilian bats. Thus, the aim of this study was to characterize and compare morphologically the reproductive accessory glands (RAGs) of two species of Phyllostomidae, *Artibeus planirostris* and *Platyrrhinus lineatus*, providing a comparative overview of anatomical, histological and immunohistochemical features, considering the possible influence of seasonality and the serum concentrations of sex steroid hormones on the glands throughout the year. For such, adult males of both species were collected in nature from May 2009 to July 2010, and RAGs were evaluated by macroscopic, microscopic and ultrastructural analysis. This study showed that the RAGs are composed of a prostatic complex, with two distinct regions (ventral and dorsal), paraurethral glands and a pair of bulbourethral glands, and do not present seminal vesicles. Grossly, the ventral region presents a white color and compact appearance, this region partially enclosing ventral part of the urethra. The dorsal region has a reddish color and translucent appearance; this region surrounding the dorsal part of the urethra and receives both ducts deferens. The bulbourethral glands are located in the penile root and paraurethral glands are dispersed in connective tissue of the urethra. Microscopically the ventral region has an undefined epithelium with secretory cells and a few basal cells, the epithelium produces PAS positive secretion. The dorsal region presents a columnar pseudostratified epithelium with secretory and basal cells, this region has three types of secretion: basophilic, PAS positive and mixed. The bulbourethral gland is an oval-shaped acinar gland, partially surrounded by muscular tissue, has cylindrical epithelium with basal nuclei, the secretion is PAS positive. Histological and ultrastructural data also confirmed the

prostatic nature of the dorsal and ventral holócrina the region, a fact never before described for the prostate gland. With regard for seasonal data, we concluded that *A. planirostris* shows a bimodal poliestric pattern of reproduction for the specimens from northwestern São Paulo State and that this pattern appears to be closely regulated by a gradual increase in the rate of circulating testosterone, which stimulates both the prostate region to prepare for the two reproductive periods. Thus, comparing our data, anatomical and physiological, with literature and previous studies from our laboratory, we can infer that the RAGs Phyllostomidae (Stenodermatinae) present a common morphological pattern. We suggest that are conducted more studies involving the structure and physiology of RAGs in different bat species, which contribute to a better understanding of reproductive processes in Chiroptera, and when combined with other characters, will also contribute to bat phylogenies.

KEYWORDS: Chiroptera, Phyllostomidae, Prostatic Glandular Complex, Seasonality.

I- INTRODUÇÃO

A Ordem Chiroptera

Os morcegos compõem uma das ordens mais diversa e distinta no grupo dos mamíferos, sendo os únicos que possuem estruturas que permitem um vôo verdadeiro. O nome Chiroptera deriva do grego "cheir" e "pteron" os quais significam mão e asa, respectivamente, o que sugere que a asa do morcego é uma mão altamente modificada (PERACCHI *et al*., 2006).

A ordem Chiroptera constitui-se a segunda maior Ordem dos mamíferos, apresentando em torno de 200 gêneros e 1000 espécies amplamente distribuídas pelo planeta (Fig. 1), ocorrendo em regiões tropicais e temperadas, com exceção de algumas ilhas oceânicas remotas e a Antártica (EISENBERG e REDFORD, 1999). A ordem Chiroptera tem sido divida em 2 subordens: Megachiroptera e Microchiroptera. A primeira é encontrada apenas no Velho Mundo e apresenta uma única família (Pteropodidae) com 42 gêneros e 185 espécies; já Microchiroptera está distribuída amplamente pelo planeta, e compreende 17 famílias, 157 gêneros e 928 espécies (SIMMONS, 2005).

A subordem Megachiroptera compreende as maiores formas de morcegos, com animais que podem ultrapassar 1,5 kg de peso e apresentar o antebraço com mais de 220 mm, por apresentarem esse grande porte são também conhecidos como "raposas voadoras". Já os Microchiroptera tem peso entre 2 e 196 g, com o comprimento do antebraço variando de 22 a 110 mm (AGUIAR e TADDEI, 1995).

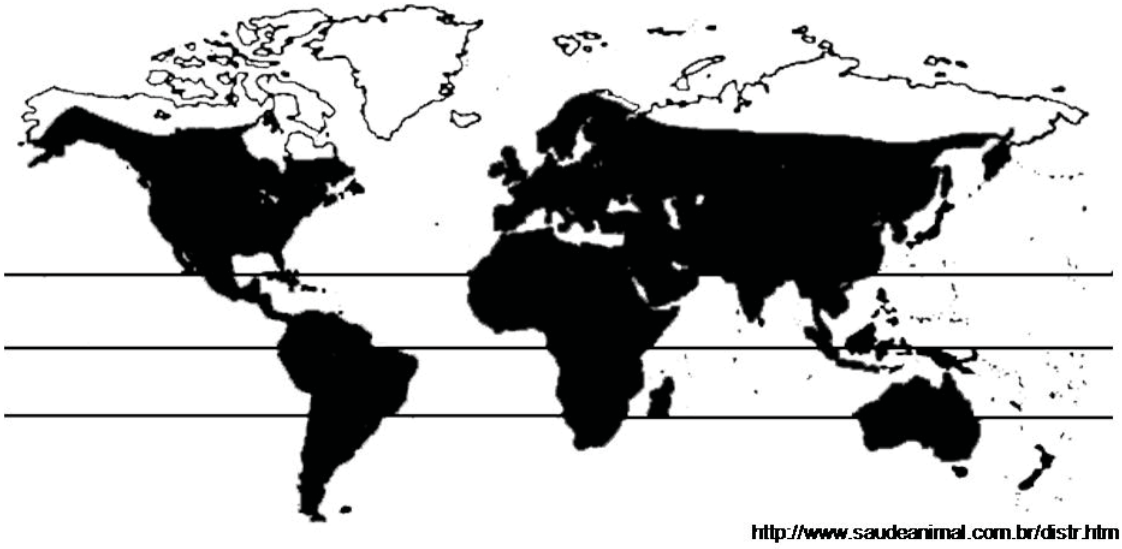


Figura 1. Mapa da distribuição geográfica da Ordem Chiroptera no mundo, as áreas em negro representa a distribuição das espécies.

Os morcegos apresentam os mais diversificados hábitos alimentares dentre todos os mamíferos. Dentro do grupo encontramos morcegos que se alimentam de: insetos e outros artrópodes, frutos, sementes, folhas, flores, pólen, néctar, pequenos vertebrados, bem como animais que se alimentam exclusivamente de sangue (BRASS, 1994; FENTON, 1992)

Os Megachiroptera são predominantemente frugívoros enquanto que os Microchiroptera, insetívoros. O hábito alimentar aparenta estar relacionado com o habitat de cada espécie, já que espécies frugívoras, nectarívoras, carnívoras e hematófagas estão confinadas às regiões tropicais e subtropicais, enquanto que as insetívoras estão dispostas em quase todas as regiões do planeta (PERACCHI *et al*., 2006).

No Brasil são conhecidas nove famílias, 64 gêneros e 167 espécies de morcegos. Este grande número de espécie torna a ordem Chiroptera a 2ª ordem em riqueza de espécies no país, sendo superada apenas pela Ordem Rodentia, com 235

espécies. As famílias brasileiras com seu respectivo número de espécies são: Phyllostomidae (90), Molossidae (26), Vespertilinidae (24), Emballonuridae (15), Mormoopidae (4), Thyropteridae (4), Noctilionidae (2), Furipteridae (1) e Natalidae (1). Estas habitam todo o território brasileiro, ocorrendo desde a Amazônia, o Cerrado, a Mata Atlântica, o Pantanal, o nordeste, até os pampas gaúchos, em regiões rurais e também em áreas urbanas (REIS *et al*., 2007).

Este grupo apresenta poucos registros fósseis, devido principalmente ao pequeno porte da maioria das espécies e a delicadeza de seu esqueleto ósseo, os quais não fossilizam bem. Os mais antigos registros de morcegos datam do final do Eoceno na América do Norte e Europa (HAND, 1990). Esses fósseis indicam que os morcegos já apresentavam todas as adaptações para o vôo neste período. Assim não se sabe ao certo como surgiram as pré-adaptações de um mamífero terrestre para o aéreo e mesmo qual seria o parente mais próximo de morcegos, já que não temos registros fósseis anteriores (SCATENA, 2006).

Dentro da ordem Chiroptera, a origem e as relações evolutivas ainda são muito controversas. Classicamente Chiroptera é considerado um grupo monofilético alocado na superordem Archonta, juntamente com Primates, Dermoptera e Scandentia (GREGORY, 1910). Contudo, Pettigrew (1986) propõe que os megaquirópteros estão mais relacionados aos primatas do que aos microquirópteros, sugerindo que o grupo é na verdade difilético. Nikaido e colaboradores (2000), baseado em dados moleculares, sugeriram que Chiroptera está mais relacionado com Fereuungulata (Carnívora + Perissodactyla + Certatiodactyla) do que com Archonta, já Van Den Bussche e colaboradores (2004) encontraram indícios que reforçam esta hipótese.

As relações entre as diferentes famílias de morcegos são também motivo de muito debate. Estudos filogenéticos sugerem que Emballonuridae representa o grupo

basal dentro da subordem Microchiroptera (SMITH, 1976; SIMMONS, 1998) e, estudos morfológicos sustentam a hipótese de que os embalonurídeos foram os primeiros a chegarem ao Novo Mundo, assim os embalonurídeos têm sido considerados os possíveis ancestrais das famílias que ocorrem somente no Novo Mundo (Furipteridae, Mormoopidae, Natalidae, Noctilionidae, Phyllostomidae e Thyropteridae).

Smith (1976) propôs uma filogenia com quatro grupos monofiléticos: Emballonuroidea (Craseonycteridae + Emballonuridae + Rhinopomatidae), Noctilionoidea (Phyllostomidae + Mormoopidae + Noctilionidae), Rhinolophoidea (Hipposideridae + Megadermatidae + Nycteridae + Rhinolophidae) e Vespertilionoidea (Furipteridae + Molossidae + Natalidae + Mystacinidae + Myzopodidae + Thyropteridae + Vespertilionidae). Esta hipótese foi questionada por vários trabalhos subseqüentes (VAN VALEN, 1979; PIERSON, 1986; NOVACEK, 1991; SIMMONS, 1998) e até o momento os pesquisadores não estabeleceram um consenso relacionado à esta problemática.

Portanto, as peculiaridades da ordem Chiroptera, tais como: grande diversidade de espécies, a ampla variação morfológica entre as famílias, a problemática filogenética e a grande heterogeneidade de habitats nos quais os animais estão inseridos, nos fizeram questionar se estas grandes diferenças se refletiriam também na sua biologia da reprodução.

A família Phyllostomidae e subfamília Stenodermatinae

A família Phyllostomidae constitui um grupo diverso, com aproximadamente 148 espécies agrupadas em 48 gêneros (NOWAK, 1999). Ela é subdividida em 5 subfamílias: Carollinae, Desmodontinae, Glossophaginae, Phyllostominae e Stenodermatinae (REIS *et al.*, 2007). Trata-se de um clado endêmico do Novo Mundo, com registros que se estendem do sudoeste dos Estados Unidos da América até o norte da Argentina (PERACCHI *et al*., 2006). Este grupo é caracterizado por apresentar um apêndice nasal em forma de folha ou ponta de lança, exceto em Desmodontinae, que apresenta esse apêndice nasal reduzido e em forma de ferradura (Fig. 2).

Stenodermatinae é um grupo monofilético, e compõe a subfamília mais abundante com 68 espécies, 42,2% das espécies descritas para Phyllostomidae (SIMMONS, 2005). Nesta subfamília, Simmons (2005) reconhece duas tribos: Sturniri e Stenodermatini, a primeira representa os morcegos do gênero *Sturnira*, e a segunda as demais espécies. De todos os 17 gêneros conhecidos dentro da subfamília, 12 ocorrem no Brasil, num total de 33 espécies.

Os estenodermatíneos são predominantemente frugívoros, algumas espécies complementam a dieta com outros itens, tais como: recursos florais, insetos e folhas. Essa preferência pelos frutos juntamente com o comportamento de retirá-los da planta mãe para consumí-los no abrigo faz destes animais excelentes dispersores de sementes de plantas da região Neotropical. Apesar dos poucos estudos encontrados na literatura, este grupo apresenta padrões reprodutivos diversificados, com espécies monoéstricas e poliéstricas bimodais, e espécies que se reproduzem ao longo de todo o ano (REIS *et al.*, 2007).

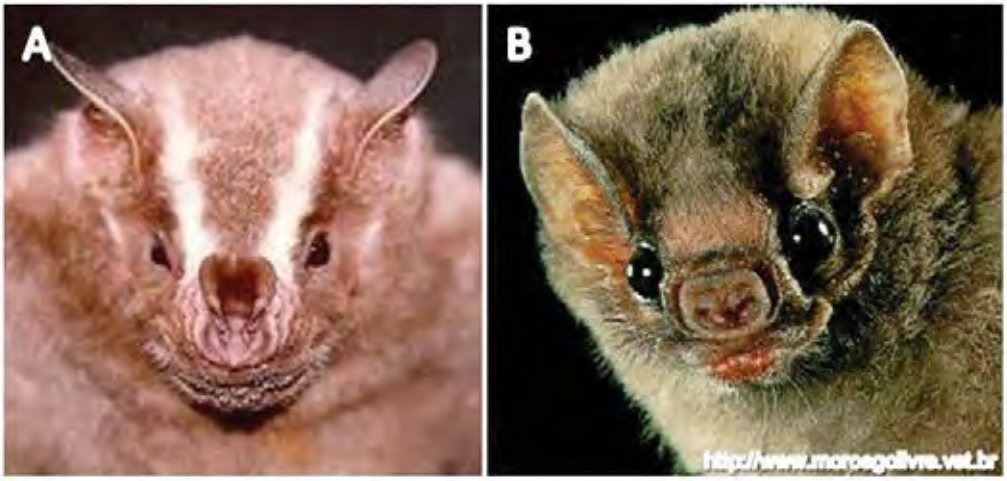


Figura 2. Representantes da família Phyllostomidae. Destaque para a característica que define a família, o apêndice nasal. **A.** *Artibeus lituratus*, subfamília Stenodermatinae, apresenta o apêndice nasal em forma de folha. **B.** *Diphylla ecaudata*, subfamília Desmodontinae a qual difere das outras subfamílias e apresenta o apêndice nasal em forma de ferradura.

Com base nesses dados, escolhemos dentro desta subfamília duas espécies abundantes de gêneros distintos, *Artibeus planirostris* e *Platyrrhinus lineatus* (Fig. 3), com o intuito de dar início às investigações dos órgãos acessórios do sistema reprodutor masculino nesta família.

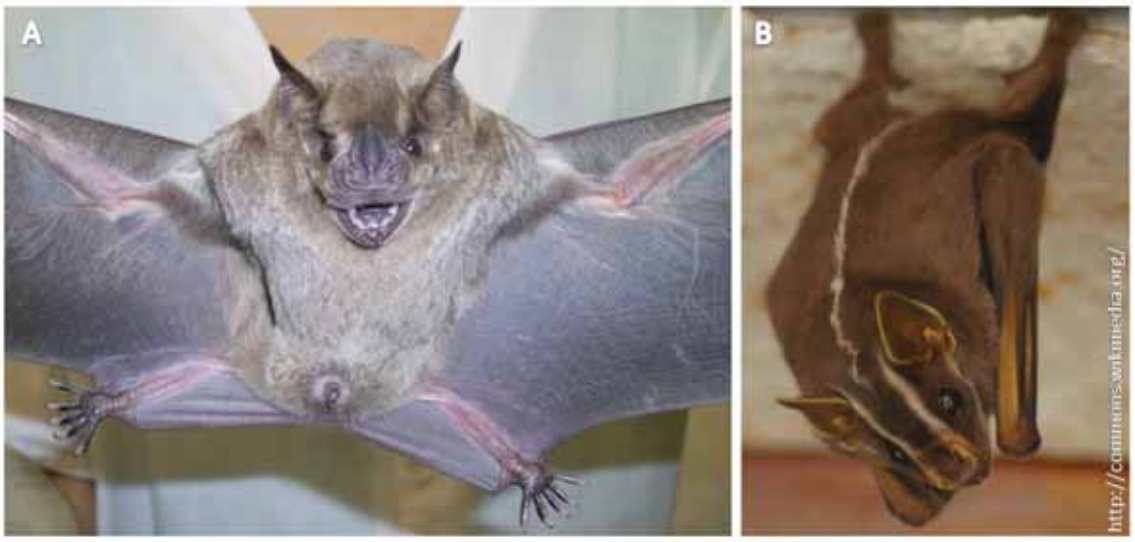


Figura 3. As duas espécies, representantes da família Phyllostomidae que foram utilizadas neste trabalho. A. *Artibeus planirostris*. B. *Platyrrhinus lineatus*.

Reprodução de Chiroptera: Aspectos Gerais.

A ampla distribuição geográfica faz com que os morcegos sofram considerável influência de fatores abióticos sobre suas estratégias reprodutivas, detectadas através de comportamento ou da avaliação funcional das gônadas e das glândulas anexas (SWAMI e LALL, 1982). Sem exceções, morcegos hibernantes de zonas temperadas são reprodutores sazonais, enquanto que aqueles de zonas tropicais apresentam padrões reprodutivos diversos, influenciados diretamente por variações da temperatura, pluviosidade e disponibilidade de alimento (FLEMING *et al*., 1972; TADDEI, 1976).

Um grande número de estudos morfofuncionais relaciona-se às estratégias reprodutivas de morcegos mostrando nas espécies algumas características interessantes, tais como o armazenamento de espermatozóides por longos períodos no prolongamento da cauda do epidídimo nos machos e na região do corno uterino nas fêmeas, além do atraso na implantação embrionária no trato reprodutor feminino (RACEY, 1972, 1973, 1979; KRUTZSCH, 1975; KRUTZSCH *et al*., 1976; KRUTZSCH e CRICHTON, 1987; VAN DER MERWE e RAUTENBACH, 1990; HAPPOLD e HAPPOLD, 1989; HOOD e SMITH, 1989; HEIDEMAN *et al*., 1992; ENCARNAÇÃO *et al*., 2004; SHARIF *et al.*, 2004). A avaliação da espermatogênese em nível morfológico, especialmente de espécies neotropicais, também tem sido abordada (SINGWI e LALL, 1983; McGUCKIN e BLACKSHAW, 1987; SAIDAPUR e PATIL, 1992; MORIGAKI *et al*., 2001; KUROHMARU *et al*., 2002; LEE, 2003).

Recentemente, Beguelini e colaboradores (2009) avaliaram comparativamente a morfologia das células testiculares e o ciclo do epitélio seminífero de cinco espécies de morcegos das famílias Phyllostomidae (*Artibeus lituratus*, *Artibeus*

planirostris, *Carollia perspicillata*, *Platyrrhinus lineatus* e *Sturnira lilium*) e uma espécie de Vespertilionidae (*Myotis nigricans*), onde detectaram que as espécies de filostomídeos analisadas apresentam uma grande similaridade entre si, tanto na morfologia das células quanto no ciclo do epitélio seminífero. Porém, quando considerada a espécie *M. nigricans* de Vespertilionidae algumas diferenças morfológicas foram notadas, assim como uma assincronia no ciclo, que apresentou sobreposição de fases que fez com que as associações celulares bem definidas do ciclo do epitélio seminífero, observadas nas espécies de Phyllostomidae, não fossem observadas.

A assincronia na espermatogênese para Chiroptera já havia sido descrita por Wilson e Findley (1971) em espécimes de *M. nigricans* do Panamá, mas não em espécimes do México. Para os autores, *M. nigricans* é geograficamente variável no que diz respeito ao ciclo reprodutivo, pois em populações do Panamá apresentaram testículos ativos durante todo o ano, enquanto que nenhuma atividade espermatogênica no inverno foi notada em populações do México, que se comportaram de forma semelhante a morcegos de zona temperada, tais como *M. macrodactylus*, que hibernam e sofrem uma degeneração das células espermatogênicas (LEE, 2003).

Descreveremos abaixo, alguns dados reprodutivos ecológicos relatados para as espécies utilizadas neste estudo. Peracchi e Albuquerque (1971) capturaram fêmeas gestantes de *P. lineatus* nos meses de dezembro, janeiro e março, no estado brasileiro do Rio de Janeiro. Já Taddei (1973, 1976) capturou em todos os meses com exceção de Abril, no sudoeste do Estado de São Paulo, e exemplares em lactação surgiram de novembro a maio. A temporada de reprodução prolongada e poliestria, indicada pelas fêmeas grávidas e lactantes simultaneamente, em novembro e dezembro, caracterizaram a população paulista. Segundo Willig (1983), *P. lineatus* apresenta proporções sexuais

desiguais em suas populações, sendo que esta espécie manteve pequenos haréns pequenos de 7 a 15 fêmeas em pequenas cavernas graníticas. Colônias similares 6 a 20 indivíduos também foram relatadas por Peracchi e Albuquerque (1971).

Quanto à *Artibeus planirostris*, há relatos para o nordeste do Brasil (Caatingas e Cerrado), nestas áreas *A. planirostris* exibe poliestria bimodal sazonal (WILLIG, 1985). Picos de parto (de junho ou julho a março) e de fêmeas lactentes (outubro-dezembro e janeiro-março) correspondem à época chuvosa, na qual a abundância de alimentos é mais elevada (WILLIG, 1982).

Artibeus planirostris pode ser capaz de se reproduzir em qualquer época do ano (GRAHAM, 1987). As fêmeas do estado de São Paulo-Brasil, foram estimadas para estarem prenhe durante o ano todo (TADDEI, 1976). Fêmeas prenhes no Brasil têm sido capturadas em dezembro e janeiro (DA SILVA *et al.*, 2001), já as fêmeas do Peru estavam prenhes em abril, junho, setembro e novembro-janeiro (DAVIS e DIXON, 1976; GRAHAM, 1987).

A gestação é de 3,5 meses nestes animais, o ovário permanece funcional durante gravidez e uma nova ovulação pode ocorrer após o nascimento (TADDEI, 1976). A literatura não infere se esta espécie monta harém ou não, porém a proporção de machos não é igual à proporção de fêmeas. Na caatinga e bioma cerrado os machos correspondem a 28-40% da população (WILLIG, 1983).

Podemos notar que há muita variação quando comparamos dados de ambientes diferentes, o que indica que estes animais sofreram uma pressão seletiva pelo ambiente, e é a capacidade de reproduzir o ano todo que os mantêm como uma espécie única, porém com o tempo estas podem sofrer especiação.

Esses dados reprodutivos revelam que os quirópteros constituem um grupo animal muito interessante para estudo em biologia da reprodução, com especial ênfase

às glândulas anexas ao sistema genital, devido à grande irradiação adaptativa da espécie em estratégias reprodutivas.

As glândulas reprodutivas acessórias masculinas.

As glândulas reprodutivas acessórias masculinas são órgãos que compõem o sistema genital masculino, com grande influência no sucesso reprodutivo dos mamíferos. Estas são de suma importância por secretarem produtos que garantem a sobrevivência, viabilidade e a motilidade dos espermatozóides (ROCHEL *et al.*, 2007).

Na próstata do indivíduo adulto são os níveis de hormônios androgênicos que mantêm a morfologia e a função do tecido prostático, havendo uma taxa de proliferação extremamente baixa, a qual se equilibra com a morte celular (CUNHA *et al.*, 1996).

O crescimento normal, a diferenciação e a manutenção da integridade funcional (secretora) e estrutural da próstata e dos demais órgãos acessórios do sistema reprodutor masculino são dependentes de níveis constantes de andrógenos circulantes produzidos pelos testículos e pelas adrenais e ocorrem através de interações recíprocas entre o estroma e epitélio (PRICE, 1963; DOUNJACOUR e CUNHA, 1988; AUMULLER e SEITZ, 1990; COOKE *et al.*, 1991; CUNHA *et al.*, 1996; ROSAI, 1996; HAYWARD *et al*., 1997; THOMSON *et al*., 1997).

Crinchton e Krutzsch (2000) ao compilarem dados sobre reprodução de morcegos, afirmam que a estrutura, tanto anatômica quanto microscópica, dos órgãos reprodutivos (testículos e glândulas reprodutivas acessórias) segue o padrão dos mamíferos, ou seja, estes apresentam um par de testículos, e as glândulas reprodutivas acessórias, tais como: próstata, vesículas seminais, glândulas ampulares e glândulas bulbouretrais, as quais podem ou não estar presentes no sistema reprodutor.

Estudos pioneiros em sete espécies de morcegos do velho mundo realizados por Mokkapati e Dominic (1976) revelaram uma grande variabilidade com relação à

anatomia das glândulas acessórias, sendo que algumas espécies apresentavam glândulas sólidas que rodeavam a uretra, outras espécies apresentavam apenas um par de glândulas bulbouretrais, e outras espécies, apresentavam os dois distintos tipos glandulares. Esses autores ressaltaram a inexistência de utrículo prostático para todas as espécies analisadas, embora somente nas espécies *Cynopterus sphinx* (Megachiroptera) e *Taphosus melanopogum* (Microchiroptera) são relatados com a presença de uma próstata única, não lobulada. As glândulas vesiculares também foram avaliadas por esses pesquisadores e não estavam presentes em todas as espécies.

Estudos posteriores feitos por Swami e Lall (1982) detectaram alterações enzimológicas importantes nas células prostáticas de *T. melanopogum* durante o ciclo anual da espécie, fato que conduz os autores a hipotetizarem um estado "quiescente" e outro "ativo" para as glândulas ao longo do ano, caracterizando não somente a sazonalidade da espécie, mas a sazonalidade das glândulas reprodutivas acessórias. Avaliações posteriores revelaram que mudanças sazonais nos níveis de testosterona e de androestenediona nessa espécie podem ser a razão para o desenvolvimento de um padrão atípico na biologia reprodutiva, que inclui a retenção de espermatozóides na cauda do epidídimo e variações da massa glandular ao longo do ano (SINGH e KRISHNA, 2000).

A família Phyllostomidae representa mais de 53% das espécies de Chiroptera no Brasil (PERACCHI *et al*., 2006). Porém poucos estudos relacionados às glândulas reprodutivas acessórias foram realizados para representantes deste grupo. Krutzsch e Nellis (2006) ao analisarem sazonalmente as glândulas acessórias de *Brachyphylla cavernarum*, obtiveram que esta espécie tem um pico reprodutivo de outubro a janeiro (primavera e verão), esse pico é observado tanto no tamanho e massa testicular, testosterona plasmática, bem como, para tamanho e massa do complexo

próstata-vesícula seminal. Demonstrando assim, que essas características reprodutivas variam sazonalmente dentro de Phyllostomidae.

Krutzsch e colaboradores (1976) também analisaram sazonalmente *Macrotus waterhousii*, outra espécie de filostomídeo do sudoeste dos Estados Unidos da América, e observaram que o pico desta espécie ocorreu no período de julho a novembro para os dados: peso e tamanho testicular; número de espermatócito primário, espermátide e espermatozóides no túbulo seminífero; diâmetro do túbulo seminífero; tamanho e peso do complexo próstata-vesícula seminal.

Nos dois estudos citados, para filostomídeos, notamos que o pico não ocorre no mesmo período, esse fato pode ser explicado: pelas diferentes condições abióticas de cada região (sendo uma espécie das Ilhas Virgens - América Central e a outra do Arizona - América do Norte); pela competição interespecífica de cada ambiente; bem como pela própria biologia da espécie. Esses dados nos mostram que a ampla distribuição geográfica do grupo Chiroptera afeta circunstancialmente a biologia reprodutiva desses animais. Sendo assim, para que entendamos um pouco os processos reprodutivos de animais deste grupo é preciso estudar o maior número de espécies possíveis, principalmente espécies Neotropicais, as quais não apresentam trabalhos que caracterizem suas estruturas e nem abordem a sazonalidade das glândulas reprodutivas acessórias masculinas.

II- OBJETIVOS

- Gerais

O presente trabalho objetivou avaliar morfofisiologicamente as glândulas reprodutivas acessórias masculinas de duas espécies de morcegos pertencentes à família Phyllostomidae (*Artibeus planirostris* e *Platyrrhinus lineatus*).

- Específicos

1. Traçar um panorama anatômico comparativo das glândulas reprodutivas acessórias (GRAs) masculinas das duas espécies (*A. planirostris* e *P. lineatus*), por meio de análises macroscópicas e microscópicas.

2. Caracterizar ultraestruturalmente os tipos celulares epiteliais e estromais presentes em todas as GRAs das duas espécies, objetivando avaliar o perfil das organelas citoplasmáticas nos compartimentos glandulares e comparar possíveis diferenças morfológicas.

3. Avaliar o padrão histológico, histoquímico e histo-enzimológico do complexo prostático na espécie *A. planirostris*, com acompanhamento anual, objetivando a avaliação das possíveis influências de sazonalidade sobre as glândulas.

4. Avaliar os níveis plasmáticos de esteróides sexuais dos espécimes de *A. planirostris* coletados ao longo do ano, por meio de quimioluminescência.

5. Avaliar a distribuição dos receptores androgênicos no complexo glandular prostático pelo método de imunoistoquímica, com intuito de verificar a influência da sazonalidade nesses parâmetros.

Esta dissertação foi escrita na forma de 3 artigos científicos, os quais serão submetidos a revistas internacionais relacionadas ao tema.

Artigo 1: **Structure, histochemistry and ultrastructure of the male reproductive accessory glands in the Neotropical flat-faced fruit-eating bat, *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae).**

Artigo 2: **Avaliação anual do complexo prostático masculino de uma espécie de morcego exclusivamente neotropical, *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae).**

Artigo 3: **Morfologia das glândulas reprodutivas acessórias masculinas de uma espécie de Phyllostomidae, *Platyrrhinus lineatus* (Chiroptera: Phyllostomidae).**

III- Artigo 1: Structure, histochemistry and ultrastructure of the male reproductive accessory glands in the Neotropical flat-faced fruit-eating bat, *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae).

Cíntia C. I. Puga[1], Mateus R. Beguelini[2], Ana C. Negrin[2], Caroline M. Christante[2], Eliana Morielle-Versute[1], Patricia S. L. Vilamaior[1], Sebastião R. Taboga[2*]

[1] *Department of Zoology and Botany, São Paulo State University – UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil 15054-000*

[2] *Department of Biology, São Paulo State University – UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil 15054-000*

*Corresponding author: Sebastião Roberto Taboga – Rua Cristóvão Colombo nº 2265, Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 17 32212380. FAX: + 55 17 3221-2390. E-mail address: taboga@ibilce.unesp.br

ABSTRACT

The Chiroptera is the second largest mammalian order, presenting different reproductive strategies and some unique reproductive features. However, no the reports related to male reproductive accessory glands (RAGs) in Brazilian bats are scarce. Thus, the aim of this study was to characterize morphologically the RAGs of an exclusively Neotropical bat, *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). The RAGs were investigated using macroscopical, microscopical and electron microscopical procedures. Our study indicates that RAGs are composed by a prostate complex, with two distinct regions (ventral and dorsal), dispersed paraurethrals glands and a pair of bulbourethrals glands, without seminal vesicles. Comparing the histology of the dorsal region with RAGs of other mammals, we found that it is very similar to the dorsal prostate of rodent and ventral of camel. Moreover, the ventral region is not similar to another mammalian gland. This leads us to believe that this is a histological region never documented before, and needs more detailed studies. The presence and position of bulbourethral glands are in agreement with other studies of phyllostomid bats, however, the presence of paraurethral glands had not yet been documented for this family. Our data demonstrate the wide discrepancy in composition, structure and morphology of RAGs of bats when compared to other mammals. Similarly, the little related literature indicates that RAGs vary widely within each family, and less inter-specifically. Thus, more studies involving the structure and physiology of RAGs in different species of bats may contribute to a better understanding of reproductive processes in Chiroptera and, associated with another characters, to bat phylogenies.

KEYWORDS: Chiroptera, Phyllostomidae, Prostate, Bulbourethral, Paraurethral.

INTRODUCTION

The Chiroptera is the second largest order of mammals, with approximately 202 genera and 1120 species widely distributed in tropical and temperate regions, except for some remote oceanic islands and Antarctica (Simmons, 2005; Marchesin et al. 2008). The family Phyllostomidae is endemic to the New World, with records that extend from southwestern United States to northern Argentina (Peracchi et al, 2006). This is the most diverse bat family in the Neotropics, presenting about 57 genera and 160 species. In Brazil, bats are represented by 167 species and 64 genera, from which 92 species and 40 genera are phyllostomids, representing 55.76% and 62.5% of bats in the country, respectively (Reis et al. 2007). Despite being the most species family in Brazil, no reports related to their reproductive accessory glands (RAGs) are available.

Bats have a wide geographical distribution and a great number of species (Reis et al. 2007). Throughout its geographical distribution several factors may potentially influence reproductive patterns, such as latitude, abiotic factors (temperature, humidity and rainfall) and food availability (Fleming et al. 1972). These features provide bats with some unique reproductive characteristics, such as prolonged sperm storage in the cauda epididymis in males and in the uterine cornua in females; asynchrony of spermatogenesis and copulation period; and a delayed embryo implantation in the female reproductive tracts (Crichton & Krutzsch, 2000; Beguelini et al. 2009).

Reproductive accessory glands are important glands, whose secretions ensure the survival, mobility and viability of sperms in male and female reproductive tracts (Rochel et al. 2007). The position, morphology and physiology of RAGs vary significantly among mammals. In rodents, one pair of ventral, dorsal and anterior

prostates, seminal vesicles and one pair of bulbourethrals (Cowper's glands) occur together in most taxa (Voss & Linzey, 1981). The RAG of Mongolian gerbil, like that of other rodents, is composed of a multilobulated prostate, which presents four bilaterally symmetric lobes, surrounding the urethra at the base of the urinary vesicle. These lobes are called ventral, dorsal, lateral and anterior lobes, the latter also known as the coagulator gland.. This complex is attached to the dorsal seminal vesicles (Price, 1963; Williams, 1974; Jesik et al. 1982; Pinheiro et al. 2003). However, a fourth pair of lobes (dorsolateral lobes (DLL)) was described recently (Rochel et al. 2007), showing that the definition of RAGs is yet poorly understood.

The same multilobular organization of rodents is not observed in humans, in which RAGs are composed of a prostate, with closely related areas that forms a compact body, seminal vesicles and bulbourethrals glands (Price, 1963).

The RAGs of bats are still little known, however, the few studies available indicated that the combination of paired glands laterally to the urethra (ampullary and bulbourethrals glands), prostate and seminal vesicles may or may not be part of the glandular complex (Crichton & Krutzsch, 2000), demonstrating a great variability in its composition, morphology and physiology.

Thus, the aim of the present study was to characterize morphologically the male reproductive accessory glands (RAGs) of an exclusively Neotropical bat, *Artibeus planirostris* (Spix, 1823) (Chiroptera: Phyllostomidae).

MATERIALS AND METHODS

Specimens

Ten sexually mature specimens of *Artibeus planirostris* were analyzed. The specimens are housed in the Chiroptera Collection at the São Paulo State University (DZSJRP- UNESP). The animals were collected in the northwest of the state of São Paulo, Brazil (49º22'45"W; 20º49'11"S) between June 2009 and July 2010. The experimental procedures were approved by the Ethics Committee of São Paulo State University (UNESP) (Process: 017/2009 – CEEA), and the capture and captivity of bats were authorized by the Brazilian institution responsible for wild animal care (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, IBAMA – Process: 21707-1).

Animal Processing and Documentation

The animals were euthanized by deep anesthesia and accommodated in the supine position on the board of dissection. An incision was made in the abdominal region in the caudal direction; the skin and subcutaneous tissues were cut to expose the area. The position of RAGs was photo-documented, and the organs were removed for histological analysis. The gross documentation was accomplished with a HP Photosmart M627 (6.0 mm - 18.0 mm) camera, with 7.0 megapixels and 3x optical zoom and 5x digital zoom.

Histochemistry

The RAGs were immediately fixed by immersion in Karnovsky's fixative solution (0.1 M Sörensën phosphate buffer, pH 7.2, containing 5% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde) for at least 24 hours. The tissues were dehydrated in a graded

series of ethanol, embedded in glycol methacrylate (Historesin, Leica Instruments), and sectioned (3µm thickness) using a Leica RM 2155 microtome. Tissue sections obtained from serial sections were stained with hematoxylin-eosin (Ribeiro & Lima, 2000), with Toluidine Blue (Mello & Vidal, 1980) and submitted to Gömöri's reticulin (Gömöri, 1937) and to Periodic Acid-Schiff (PAS) (Behmer, 1976). The microscopic analyses were performed on an Olympus BX60 microscope coupled with Image-Pro-Plus for Windows computer software for image analysis.

Three Dimensional Reconstruction

After histological processing, the whole glandular complex was serially sectioned at 3µm and stained with hematoxylin-eosin. Image capture and processing were carried out using the software Analysis 3.2 (Build 743; Digivision–SIS, San Diego, CA). After image alignment, the ventral and dorsal regions, paraurethral gland, the muscle and lumen of urethra were isolated in each image and then processed to obtain an interface boundary in each section, thus generating a three dimensional (3-D) model.

Transmission Electron Microscopy

The RAGs were processed for transmission electron microscopy as described previously by De Carvalho et al. (1994), employing the fixation procedure of Cotta-Pereira et al. (1976). Briefly, tissue fragments were perforated and fixed by immersion in a solution of 3% glutaraldehyde plus 0.25% tannic acid in Millonig buffer (pH 7.3) containing 0.54% glucose for 24 h, dehydrated in acetone, and embedded in Araldite 502 Resin (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Ultrathin sections (50–75 nm), obtained with a diamond knife, were stained by uranyl acetate and

142 lead citrate (Venable & Coggeshall, 1965). The analyses were made in a Leo-Zeiss 906
143 Transmission Electron Microscope (Cambridge, United Kingdom) at the "Prof. Dr.
144 Celso Abbade Mourão" Center for Microscopy (IBILCE-UNESP).
145

RESULTS

RAG Composition, Gross anatomy and 3D model.

The RAGs of *A. planirostris* are formed by a compact glandular complex that surrounds the urethra, inferiorly to the urinary vesicle (Figs. 1A-C), and two bulbourethral glands, which are located in the inguinal region, extra-abdominally, at the root of the penis (Fig. 1D). Seminal vesicle was not observed.

The glandular complex is composed by the prostate gland, which has two well defined regions: ventral and dorsal ones (Figs. 2A-C) and paraurethral glands that are associated with the submucosa of the urethra, situated between the prostate and the urethra (Fig. 2D). Macroscopically, the two regions of the prostate have different colors, format and texture. The ventral region presents a white color and a compact appearance, and is located at the both sides of the urethra, partially enclosing its the ventral part (Figs. 2A and 2C). On the other hand, the dorsal region has a reddish color and a transparent appearance (Fig. 2B), it also encloses the dorsal part of the urethra and receives both ducts deferens (Figs. 1B-C, arrows). These ducts enter dorsally in the dorsal region, and converge to the center of the complex, where they flow into a more rounded region of the dorsal urethra (Figs. 3C-D, arrows).

The paraurethral glands are slightly isolated and are located in the submucosa of the urethra, dispersed within the connective tissue (Fig. 2D). These little glands have a simple and columnar epithelium (Fig. 2E), which has PAS positive secretions (Fig. 2F).

In the 3D model, the gross anatomy of the glandular complex was confirmed (Fig. 3). The ventral region surrounds the prostatic urethra almost in its entire length (Fig. 3A), being more prominent in the caudal region; the dorsal region is more

prominent anteriorly (Figs. 3B-C). We observe that the prostatic urethra is a linear tube that crosses the prostate complex (Fig. 3A). It presents three distinctive regions: the cranial, medial and caudal. The cranial region has only connective tissue (Figs. 3E-F). The medial region is the place where both ducts deferens flow into the urethra (Figs. 3C-D) and the place where small ducts from both prostatic regions converge (Figs. 3E-F). The caudal region is surrounded by paraurethral glands (Figs 3E-F) and is covered by a layer of connective tissue in its entire length, and by a muscular layer in its caudal region (Figs. 3A).

Histochemical Evaluation

Histologically, the two distinct regions of the prostate are confirmed: the ventral and dorsal ones (Fig. 4A). The ventral region has an atypical epithelium, with irregular luminal interface, different from usual acinar prostatic epithelium found in the other mammals species. This epithelium present acinar cells, which contains a basal nucleus, and sporadically basal cells. The cytoplasm contains numerous secretory droplets; its lumen is filled with numerous secretory vesicles of distinct sizes (Fig. 4B). The dorsal region has a pseudostratified columnar epithelium that contains two cell types: the basal and the secretory cells (Fig. 4C). The basal cells are less frequent, and firmly opposed to the basal lamina, and have elongated nuclei. The secretory cells are columnar and present a parabasal nuclei and an evident Golgi area in the perinuclear cytoplasm (Fig. 4C).

Using the PAS method, three types of secretion were observed (Fig. 4D). The secretion of the ventral region is formed by PAS positive globular vesicles (Figs. 4D-E), however, the dorsal region presents two types of secretion: one basophilic (Figs. 3D and 3F) and other mixed PAS-positive and PAS-negative (Fig. 4D and 4G), which is

always located around the ducts deferens (Fig. 4D). Interestingly, the dorsal region presents some acini with spermatozoa inside their lumen, probably originated by reflux from ducts deferens or from the urethra (Fig. 4H).

Employing the Toluidine blue stain, we observed that the majority of the acinar cells from the ventral region have a great amount of chromatin concentrated in a single central region (Fig. 4I, black arrow), however a few cells have chromatin concentrated in two regions (Fig. 4I, white arrow). On the other hand, the secretory cells from the dorsal region have small clusters of chromatin dispersed throughout the nucleus, and are commonly associated with the nuclear envelope (Fig. 4J). The basal cells, from both regions have great amounts of chromatin in the nucleus (Figs. 4I-J, arrow heads).

With the Gömöri's reticulin, we observed that the prostate complex is a compact organ covered with a simple capsule of connective tissue (Fig. 4K). The framework of this capsule is formed mainly by a large number of reticular fibers, arranged in parallel (Fig. 4L-M, white arrows), and also by fibers of collagen type I (Fig. 4L-M, black arrows). These two types of fibers also support the internal framework of the prostate, forming a convoluted network of fibers in the extracellular matrix around the acini. The amount of fibers that separates the two prostatic regions is very similar to those from other regions (Fig 4K, arrow).

The bulbourethral gland is an oval-shaped acinar gland. It is partially surrounded by muscular tissue (Fig. 5A) and presents a cylindrical epithelium with basal nuclei (Fig. 5B), which have dispersed chromatin associated to the nuclear envelope (Fig. 5D). The secretion of these glands is granular and PAS positive (Fig. 5C). The framework of their stroma is also composed by reticular and collagen fibers surrounding the acini (Fig. 5E).

222 ***Transmission Electron Microscopy (TEM) Evaluation***

223 With the TEM analysis, we observed that the ventral region presents, in fact,
224 a thin epithelium composed of basal and secretory cells, with both cell types presenting
225 one dark and other clear form (Fig. 6A-B). The basal cells are firmly adhered to the
226 basal lamina, have elongated nuclei with a large amount of chromatin associated to the
227 nuclear envelope and a small cytoplasm with few organelles and sporadic secretory
228 vesicles (Fig. 6A). The secretory cells are in contact with the basal lamina or associated
229 to the basal cells. They have irregular nuclei with condensed chromatin clusters
230 dispersed throughout the nucleus and numerous secretory vesicles in their cytoplasm
231 (Fig. 6A-B).

232 Our observations indicate that the secretion of the ventral region is produced
233 almost entirely by secretory cells, which produce and store highly electron-dense
234 vesicles (Fig. 6C), which in turn are released into the lumen along with part of its
235 cytoplasm. Apparently, the cell bursts its cytoplasm and a huge amount of it is released
236 into the lumen, leaving only the nucleus at the basal region (Fig. 6D).

237 The basal and the secretory cell types of the dorsal region were confirmed in
238 TEM (Fig. 6E). The basal cell strongly resembles those of the ventral region, however
239 no clear cells were observed. The secretory cells had a columnar shape, with parabasal
240 nuclei that are surrounded by a large convoluted network of endoplasmic reticulum. The
241 apex of the cell presents a great amount of secretory vesicles at several stages of
242 maturation, and a well-developed Golgi complex (Fig. 6F).

243

DISCUSSION

Remarkably limited attention has been given to reproductive aspects of male bats, despite its worldwide distribution, immense species richness, the diversity of niches they present, and the immense variation of reproductive patterns exhibited. In addition, details of morphology and physiology of their reproductive system are generally not described. Crichton and Krutzsch (2000) compiled the existing data on bats reproduction and stated that both the anatomical and microscopical structures of reproductive organs (testes and accessory glands) follow the general pattern of mammals, i.e. they show a pair of testes and epididymis, and accessory glands, such as: prostate, seminal vesicles, ampullary and bulbourethral glands (Cowper's glands), which may or may not be present in the reproductive system. Those authors also suggested that the composition of RAGs follows a phylogenetic pattern, at the family level. Thus, according to these authors, the glandular complex that surrounds the urethra has all glands in members of the families Emballonuridae, Molossidae and Vespertilionidae. In other families, either the ampullary gland or the seminal vesicle is absent.

The same authors propose that the Phyllostomidae family present a single ventral prostate, not lobulated, associated to a dorsal seminal vesicle and a pair of Cowper's glands (Crichton & Krutzsch, 2000). However, our study indicates that the RAGs of *A. planirostris*, a phyllostomid bat, are composed by a prostate complex, with two distinct regions (ventral and dorsal), dispersed paraurethrals glands and a pair of bulbourethrals glands, without seminal vesicles.

Comparing the histology of the dorsal region of *A. planirostris* with RAGs of other mammals, we observed that it is very similar to dorsal prostate of rodents (Rochel et al. 2007) and ventral of camels (Ali et al. 1978), but has distinct

morphological characteristics from their seminal vesicles. Similarly, our study demonstrates that the prostatic complex is a compact mass covered by a single capsule of conjunctive tissue. This feature indicates that probably both structures (ventral and dorsal regions) have a common embryological origin. The data available demonstrate that the prostate and seminal vesicles have different embryological origins, being the seminal vesicle derived from mesonephric ducts (Moore & Persaud, 2000) and the prostate from urogenital sinus (Thomson & Cunha, 1999). This feature demonstrates that the development of a compact and isolated structure composed by a prostate and a seminal vesicle is uncommon. Thus, based on embryologic origins, histophysiologies of these structures and in the fact that the two regions of the glandular complex of *A. planirostris* are fused, we refute the affirmation, of authors Crichton & Krutzsch (2000), which the dorsal region is considered the seminal vesicle, and affirm that the dorsal region can be considered a dorsal prostate.

Moreover, comparing the ventral region with RAGs of other animals, we did not find anything similar in the literature. This region does not resemble any of the prostatic lobes of rodents (Rochel et al. 2007), or even the three different areas of the human prostate: central, transition and peripheral zones (Junqueira & Carneiro, 2008). Similarly, the holocrine secretion released by secretory cells along with a great amount of its cytoplasm, was not observed in RAGs of any mammal. This leads us to believe that this is a histological region never documented before, that needs more attention and therefore larger and more detailed studies.

The presence and position of bulbourethral glands in *A. planirostris* is in agreement with other studies of phyllostomid bats, *Macrotus waterhousii* (Krutzsch et al. 1976) and *Brachyphylla cavernarum* (Krutzsch & Nellis, 2006). Alternatively, the presence of paraurethral glands in RAGs of a phyllostomid bat had not yet been

documented.

Our data demonstrate the wide discrepancy in composition, structure and morphology of RAGs of bats compared to other mammals. Similarly, the little related literature (Crichton & Krutzsch, 2000), and previous works from our laboratory indicate that RAGs of bats also vary widely within each family, or less inter-specifically. Thus, more studies on RAGs structure and physiology, functional and seasonal (annual) modifications, in different species of bats may contribute to a better understanding of reproductive processes in Chiroptera and, associated with another characters (taxonomic, molecular, cytogenetic, biochemical), could improve bat phylogeny.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their gratitude to Mr. L.R. Falleiros-Jr for technical assistance. The scholarship awarded to CCIP by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP – Process Nr. 2009/06666-5) is also gratefully acknowledged. Financial support from the São Paulo State Research Foundation (FAPESP – Process Nr. 2009/03470-2 for SRT) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq Process Nr. 471365/2009-2 for PSLV and Nr. 300163/2008-8 for SRT) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

Ali HA, Tingari MD, Moniem KA. 1978 On the morphology of the accessory male glands and histochemistry of the ampulla ductus deferentis of the camel (*Camelus dromedarius*). J Anat. 125: 277-292.

Beguelini MR, Moreira PRL, Faria KC, Marchesin SRC, Morielle-Versute E. 2009 Morphological characterization of the testicular cells and seminiferous epithelium cycle in six species of Neotropical bats. J Morphol. 270:943-953.

Behmer OA, Tolosa EMC, Freitas-Neto AG. 1976. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.

Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, David-Ferreira JF. 1976 The use of tannic acid–glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. Stain Technology 51, 7–11.

Crichton EG, Krutzsch PH. 2000. Reproductive biology of bats. London: Academic Press.

De Carvalho HF, Lino Neto J, Taboga SR. 1994. Microfibrils: neglected components of pressure-bearing tendons. Ann Anat. 176, 155–159.

Fleming TH, Hooper ET, Wilson DE. 1972. Three central American bat communities: structure, reproductive cycles and movement patterns. Ecology 53, 555–569.

Gömöri G. 1937. Silver impregnation for reticulin in paraffin sections. Am J Pathol. 13, 993–1002.

Jesik CJ, Holland JM, Lee C. 1982. An anatomic and histologic study of the rat prostate. Prostate 3, 81-97.

336 Junqueira LM, Carneiro J. 2008. Histologia básica. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara
337 Koogan.

338 Krutzsch PH, Nellis DW. 2006. Reproductive anatomy and cyclicity of the male
339 *Brachyphylla cavernarum* (Chiroptera: Phyllostomidae). Acta Chiropterologica 8-2,
340 497-507.

341 Krutzsch PH, Watson RH, Lox CD. 1976 Reproductive biology of the male leaf-nosed
342 bat, *Macrotus waterhousii* in Southwestern United States. Anat Rec. 184, 611-635.

343 Marchesin SRC, Beguelini MR, Faria KC, Moreira PRL, Morielle-Versute E. 2008.
344 Assessing genetic variability in bat species of Emballonuridae, Phyllostomidae,
345 Vespertilionidae and Molossidae families (Chiroptera) by RFLP-PCR. Genet Mol Res.
346 7-4, 1164-1178.

347 Mello MLS, Vidal BC. 1980. Práticas de biologia celular. Campinas, Brazil: Edgard
348 Blücher-Funcamp.

349 Moore KL, Persaud TVN. 2000. Sistema Urogenital. In: Embriologia Clínica. 6ª ed. Rio
350 de Janeiro: Guanabara Koogan.

351 Pinheiro PF, Almeida CC, Segatelli TM, Martinez M, Padovani CB, Martinez FE. 2003.
352 Structure of the pelvic and penile urethra– relationship with the ducts of the sex
353 accessory glands of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). J Anat. 202, 431–
354 444.

355 Price D. 1963. Comparative aspects of development and structure in the prostate.
356 National Cancer Institute Monograph 12, 1-27.

Peracchi AL, Lima IP, Reis NR, Nogueira MR, Hortêncio-Filho H. 2006. Ordem Chiroptera. In: Mamíferos do Brasil. Org.: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. Londrina: Nélio R. dos Reis. p. 153-230.

Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. 2007. Morcegos do Brasil. Londrina: Universidade Estadual de Londrina.

Ribeiro MG, Lima SR. 2000. Iniciação às técnicas de preparação de material para o estudo e pesquisa em morfologia. Belo Horizonte: SEGRAC – Editora e Gráfica Limitada.

Rochel SS, Bruni-Cardoso A, Taboga SR, Vilamaior PSL, Góes RM. 2007. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. Anat Rec. 290, 1233-1247.

Simmons NB. 2005. Order Chiroptera. In: Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference (Wilson D.E. and Reeder D.M., eds.). 3rd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Spix JD. 1823. Simiarum et vespertilionum brasiliensium species novae, ou histoire naturelle des espèces nouvelles de singes et de chauves-souris observées et recueillies pendant le voyage dans l'intérieur du Brésil execute par ordre de S.M. le Roi de Bavière dans les années 1817, 1818, 1819, 1820. Volume 4. Francisci Seraphici Hubschmanni, Munich, Germany.

Thomson AA, Cunha GR. 1999. Prostatic growth and development are regulated by FGF10. Development. 126, 3693-3701.

Venable JH, Coggeshall RA. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J Cell Biol. 25, 407–408.

Voss RS, Linzey AV. 1981. Comparative gross morphology of male accessory glands among Neotropical Muridae (Mammalia: Rodentia) with comments on systematic implications. Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan 159, 1-41.

Williams WM. 1974. The anatomy of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*).West Brookfield, MA: Tumblebrook Farm, Inc.

Figure 1. Gross anatomy of the male reproductive accessory glands of *Artibeus planirostris.* Intra-abdominal view, after section of skin and muscles. **A.** The urinary vesicle was suspended to show the compact glandular complex beneath it, and the continuation of the urethra. **B-C.** The urinary vesicle and the glandular complex were dislocated down to show the location of the entry of the ducts deferens (arrows) in the dorsal region. **D.** Position of the bulbourethral glands at the penis root (arrows). View after the removal of skin to exposure of the dorsal region of penis (this structure was offset with a forceps). (UV, urinary vesicle; GC, glandular complex; P, penis; R, rectum; U, urethra). Scale Bars = 1cm.

FIGURE 1.

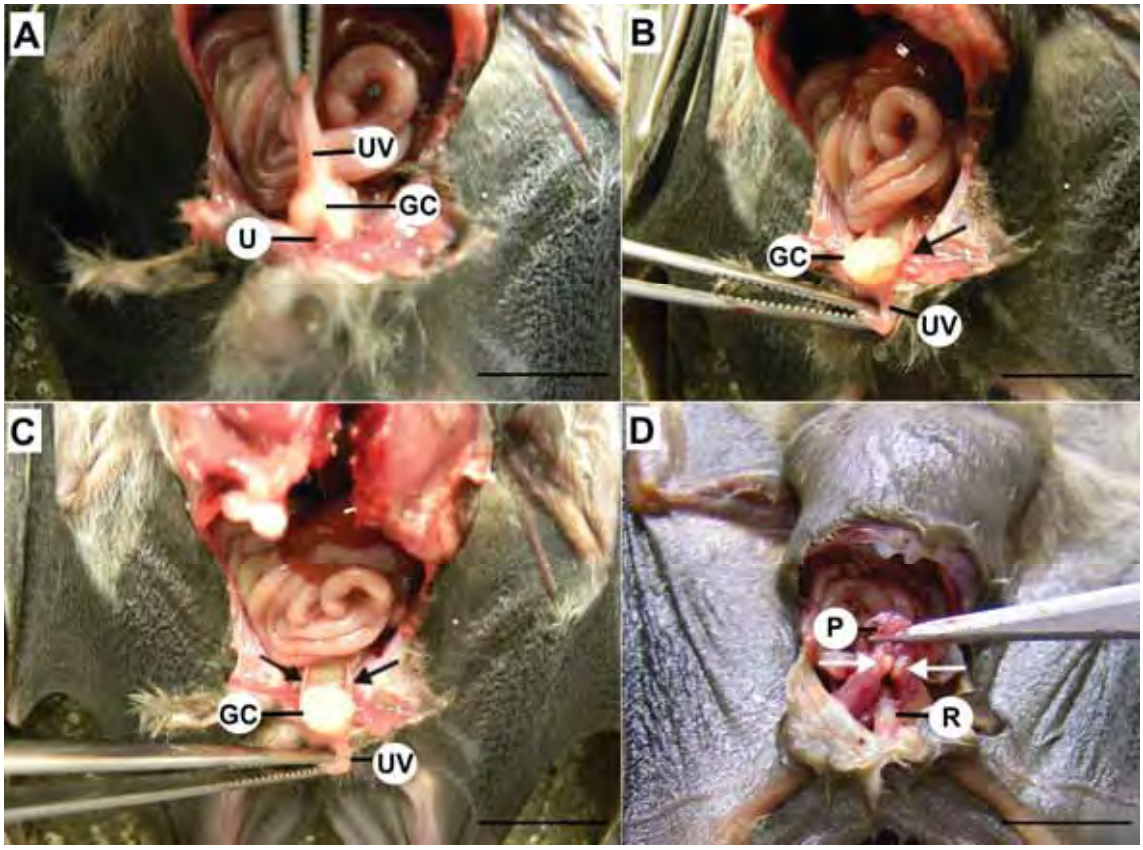


Figure 2. Gross anatomy (**A-B**) and histology (**C-E**, hematoxylin-eosin stain; **F**, Periodic Acid-Shiff method) of the glandular complex of *Artibeus planirostris*. **A.** Ventral view of the complex, showing the intimate relationship of the ventral region with the urethra. **B.** Dorsal view of the complex. **C.** Section of the glandular complex in the plane indicated in A. Observe the relationship between the ventral and dorsal regions, and between those regions and the urethra. **D.** Paraurethral glands arranged around the urethra (arrow). **E.** Epithelium of the paraurethral gland. **F.** Notice the PAS-positive secretion of the paraurethral gland. (BV, blood vessel; DR, dorsal region; Ep, epithelium; ; L, lumen; St, stroma; Ur, urethra; UV, urinary vesicle; VR, ventral region).

FIGURE 2.

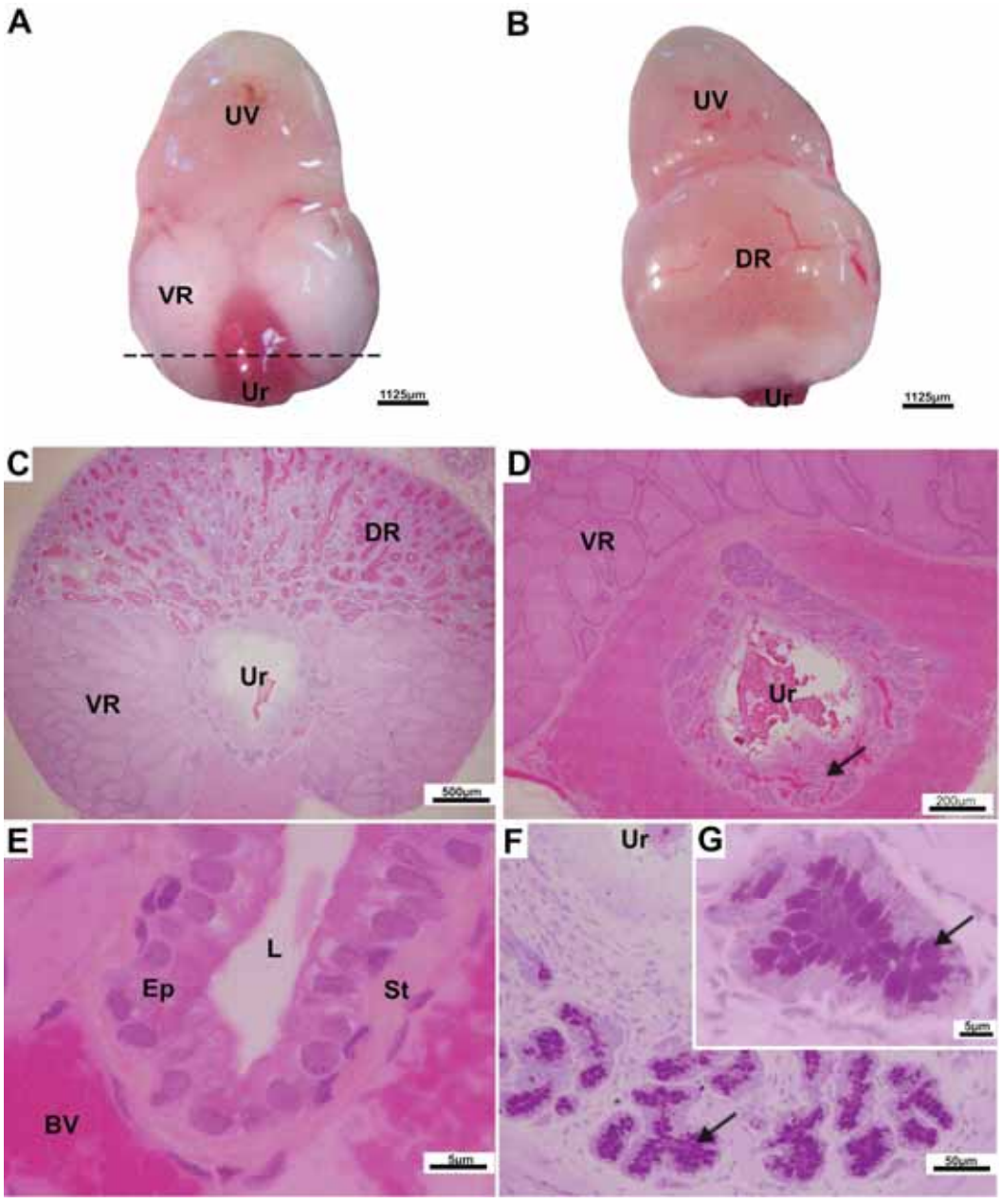

A
UV
VR
Ur
1125µm
B
UV
DR
Ur
1125µm
C
DR
Ur
VR
500µm
D
VR
Ur
200µm
E
L
Ep
St
BV
5µm
F
Ur
G
5µm
50µm

Figure 3. Three-dimensional reconstruction of the glandular complex of *Artibeus planirostris*. **A.** Frontal view. Notice that the ventral region has two lobes which surrounds the urethra; and that the urethra has muscular tissue only in the most distal region from the urinary vesicle. **B.** Lateral view of the complex showing the intimate relationship between the two regions of the prostate. **C.** Lateral view. Notice, by transparency, the site of the ducts deferens entry in the dorsal region (arrow). **D.** Dorsal view with the dorsal region removed. Notice the place where both ducts deferens (black) flow into the rounded region of the dorsal urethra (pink). **E.** Lateral view with the ventral region removed. Notice the different parts of the urethra: the caudal region that is surrounded by the paraurethral glands (pink with green), the medial region, with the small ducts from both prostatic regions (pink with purple) and the cranial region with only connective tissue (pink). **F.** Dorsal view with the ventral and dorsal regions removed. Notice that the ducts deferens flow into the urethra in the rounded region, where the small ducts from both prostatic regions converge (arrow). Scale Bars = 1mm.

FIGURE 3.

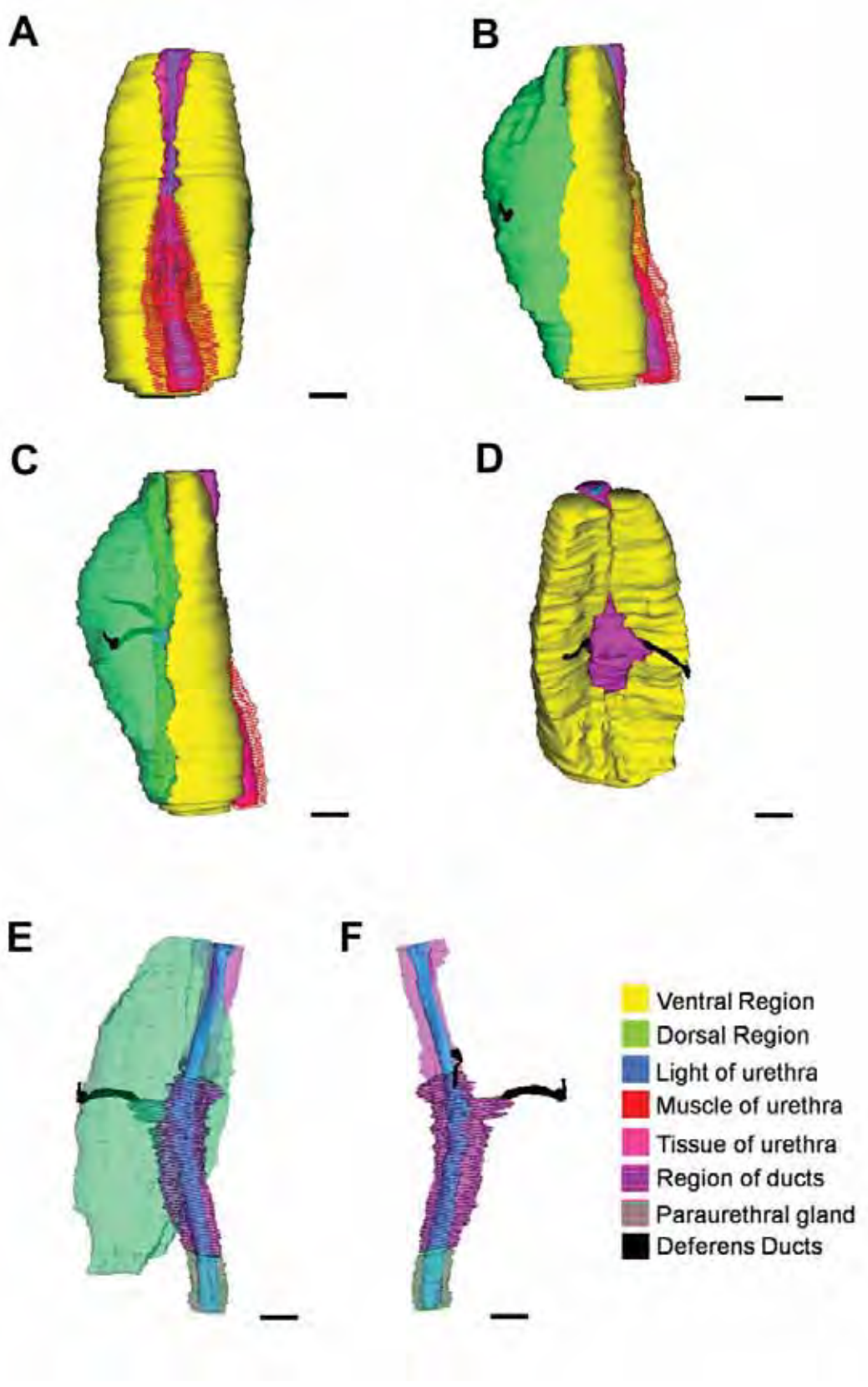

A
B
C
D
E
F
Ventral Region
Dorsal Region
Light of urethra
Muscle of urethra
Tissue of urethra
Region of ducts
Paraurethral gland
Deferens Ducts

Figure 4. Histological sections of the prostatic complex of *Artibeus planirostris* stained with Hematoxylin-Eosin (**A-C**); PAS method (**D-H**), Toluidine Blue (**I-J**) and Gömöri's reticulin (**K-M**). **A.** General structure of the prostatic complex, with ventral and dorsal regions. **B.** Ventral region of the prostate. Notice the undefined epithelium with secretory (S) and, sporadically, basal cells (B); and the abundance of secretory vesicles in the lumen. **C.** Dorsal region of the prostate. Notice the pseudostratified columnar epithelium with secretory (S) and basal cells (B). **D.** General structure of the prostatic complex, with ventral and dorsal regions. Notice the differences in the secretions of ventral and dorsal regions, and the two types of secretion in the dorsal region (*, mixed secretion in the acini around the ductus deferens (DD); # basophilic secretion). **E.** Ventral region, the arrow points to the lumen with globular PAS positive vesicles. **F.** Dorsal region with basophilic secretion (#). **G.** Acini of the dorsal region closely related to ducts deferens with mixed PAS positive and granular PAS negative secretions (*). **H.** Detail of an acini of the dorsal region closely related to ducts deferens with spermatozoa inside the lumen. **I.** Ventral region. Notice the cell with a great amount of chromatin concentrated in a single central region (black arrow) and the cell with two regions (white arrow). **J.** Dorsal region. Observe the nuclei of secretory cells (black arrow) with small clusters of chromatin dispersed throughout the nucleus and associated with the nuclear envelope; and the great amount of chromatin of the basal cells (white arrow). **K.** General structure of the prostatic complex. Notice the simple connective tissue capsule (arrow) that surrounds both prostatic regions. **L.** Ventral region. Notice the large number of reticular fibers, arranged in parallel (white arrow), and the fibers of collagen type I (black arrow). **M.** Dorsal region. (B, basal cell; DR, dorsal region; Ep, epithelium, L, lumen; VR, ventral region; S, secretory cell; St, stroma).

FIGURE 4.

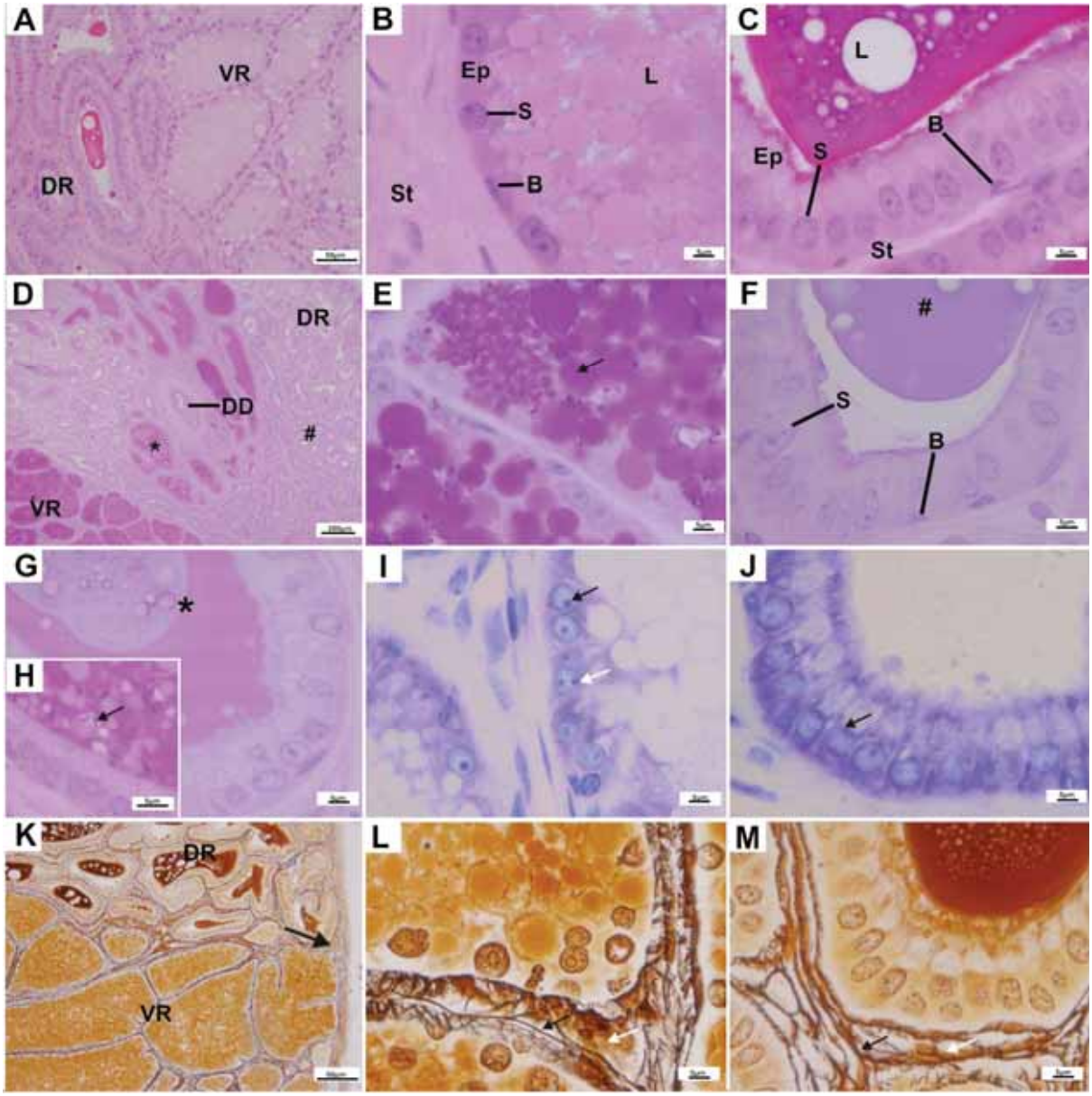


Figure 5. Histological sections of the bulbourethral gland of *Artibeus planirostris* stained with Hematoxylin-Eosin (**A-B**), PAS (**C**), Toluidine Blue (**D**) and Gömöri reticulin (**E**). **A.** General structure. Observe the muscular tissue (SMC) surrounding the gland. **B.** Cylindrical epithelium of the gland. Notice the basal nuclei (arrow). **C.** Notice the great secretory activity of cells and the storage of granules at the apex of epithelium (asterisk). **D.** Notice the dispersed chromatin within the nucleus (arrow). **E-F.** Observe that the stroma is composed by reticular (white arrows) and collagen type I (dark arrows) fibers surrounding the acini. (BG, bulbourethral gland; Ep, epithelium; L, lumen; St, stroma; SMC, smooth muscle cell).

FIGURE 5.

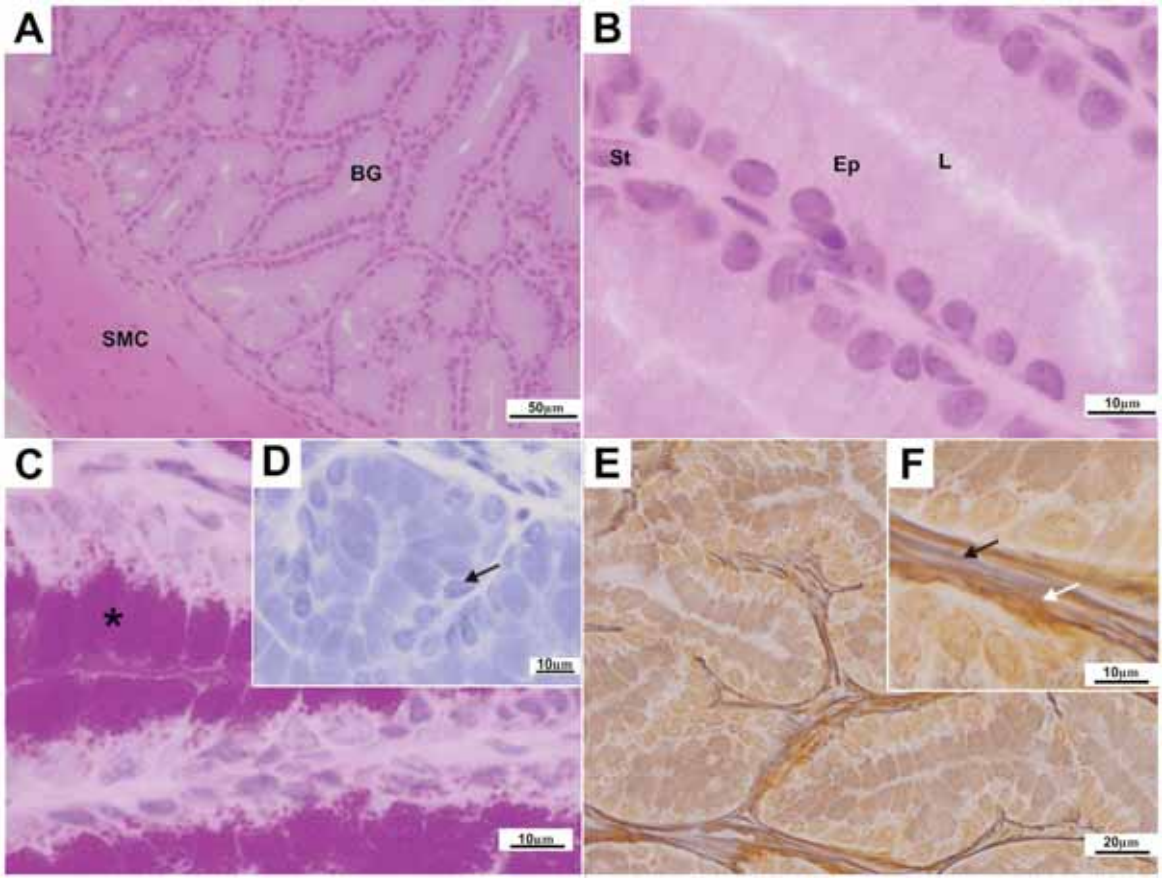
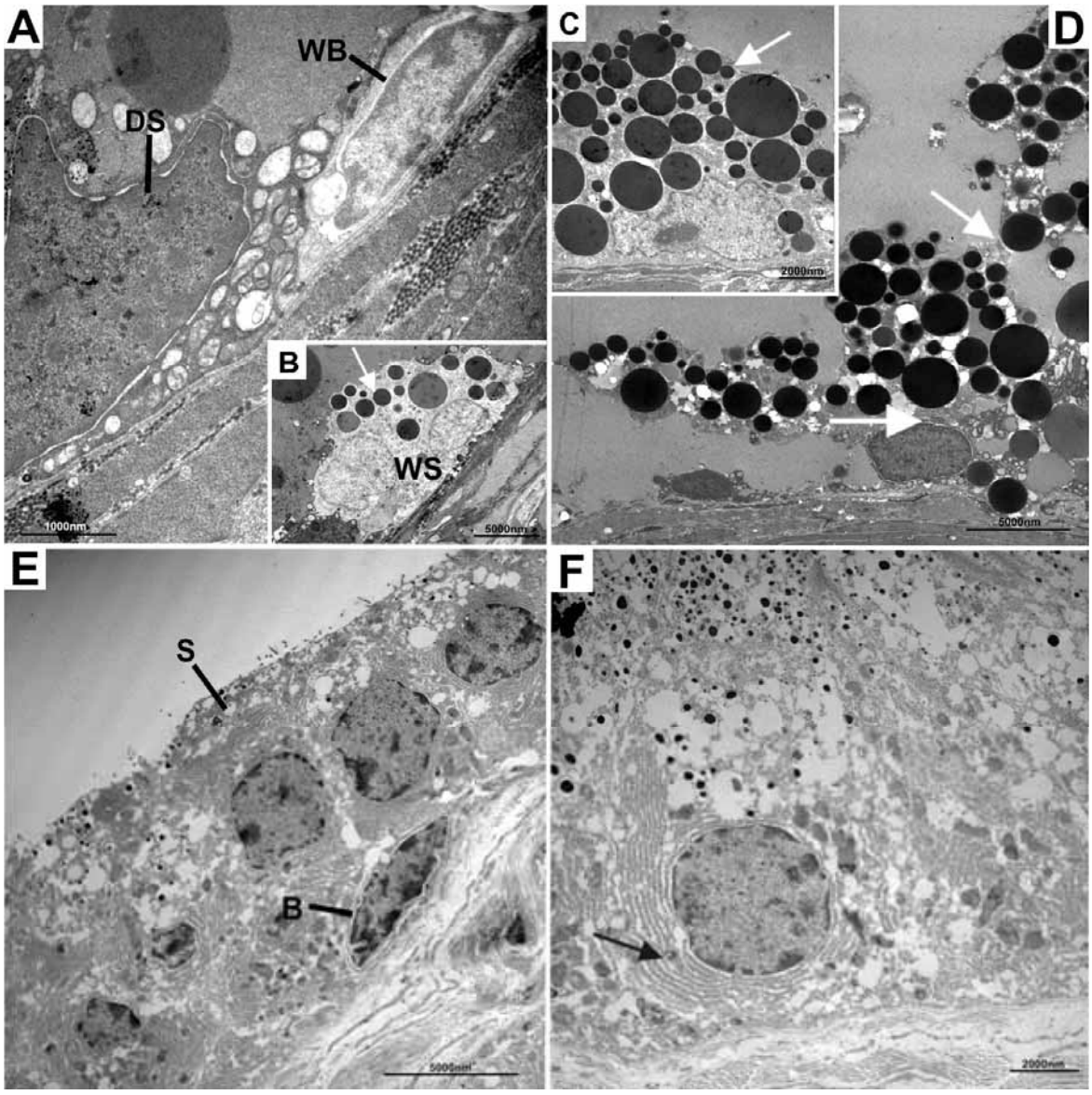


Figure 6. Electron micrographs of the prostatic cells of *Artibeus planirostris*. Ventral Region (**A-D**). Dorsal Region (**E-F**). **A.** Notice the clear basal cell (WB), with elongated nucleus, a large amount of chromatin associated to the nuclear envelope and a small cytoplasm with few organelles; and the dark secretory cell (DS), with irregular nucleus, condensed chromatin clusters dispersed throughout the nucleus and numerous secretory vesicles in their cytoplasm. **B.** The clear secretory cell of ventral region (WS). **C.** Notice the large amount of secretory vesicles within the secretory cell (arrow). **D.** Notice the release of the cytoplasm of secretory cells, filled with secretory vesicles (arrow), to the lumen. **E.** Notice the presence of secretory (S) and basal cells (B). **F.** Secretory cell with columnar shape; parabasal nuclei that are surrounded by a large convoluted network of endoplasmic reticulum; and a great amount of secretory vesicles, at numerous stages of maturation, at the apex of the cell.

FIGURE 6.


A
WB
DS
B
WS
1000nm
5000nm
C
2000nm
D
5000nm
E
S
B
5000nm
F
2000nm

IV- <u>Artigo 2</u>: Avaliação anual do complexo prostático masculino de uma espécie de morcego exclusivamente neotropical, *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae).

Cíntia C. I. Puga[1], Mateus R. Beguelini[2], Eliana Morielle-Versute[1], Patricia S. L. Vilamaior[1], Sebastião R. Taboga[2*]

[1] *Departamento de Zoologia e Botânica, Universidade Estadual Paulista – UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil 15054-000*

[2] *Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista – UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil 15054-000*

*Autor para correspondência: Sebastião Roberto Taboga – Rua Cristóvão Colombo nº 2265, Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. Tel.: +55 17 32212380. FAX: + 55 17 3221-2390. E-mail address: taboga@ibilce.unesp.br

RESUMO

Os morcegos apresentam uma ampla distribuição geográfica e um grande número de espécies e, ao longo de sua distribuição, vários fatores potencialmente influenciam na variação de seus padrões reprodutivos, tais como a latitude, fatores abióticos e a disponibilidade de alimentos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações sazonais sobre a morfofisiologia do complexo glandular prostático (CGP) de um morcego brasileiro Neotropical, *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). Machos adultos foram coletados de junho de 2009 a julho de 2010, e os CGPs foram submetidos a diversas análises. Observamos que o CGP apresentou nítidas variações ao longo do ano. O peso do CGP e o testicular aumentaram sincronicamente com a taxa de testosterona circulante, do outono até o verão, demonstrando que ambos os órgãos são regulados por este hormônio. Cada região do CGP (ventral e dorsal) apresenta características únicas e distintas, por exemplo: a região ventral apresenta o lúmen como componente glandular predominante, em contrapartida a dorsal apresenta o epitélio; a imunorreatividade à fosfatase ácida foi observada no epitélio de todos os ácinos da região dorsal, mas apenas no estroma da região ventral; além de que as duas regiões respondem diferentemente as variações do ambiente e da testosterona circulante. Concluímos assim que *A. planirostris* apresenta um padrão de reprodução poliéstrico bimodal para espécimes do noroeste do estado de São Paulo e que esse padrão aparenta ser intimamente regulado por um aumento gradativo da taxa de testosterona circulante, que estimula ambas as regiões prostáticas a se prepararem para os dois períodos reprodutivos. Ainda confirmamos a natureza prostática da região dorsal e a holócrina da região ventral, fato este nunca antes descrito para a glândula prostática.

PALAVRA-CHAVE: Complexo Glandular Prostático, Phyllostomidae, Sazonalidade.

INTRODUÇÃO

Os morcegos apresentam uma ampla distribuição geográfica e um grande número de espécies (REIS *et al.*, 2007). Ao longo de sua distribuição, vários fatores potencialmente influenciam na variação de seus padrões reprodutivos, tais como a latitude, fatores abióticos (temperatura, umidade e pluviosidade) e a disponibilidade de alimentos (FLEMING *et al.*, 1972). A adaptação a esses fatores externos forneceram aos morcegos algumas características reprodutivas únicas, como: o armazenamento de espermatozóides em um prolongamento da cauda do epidídimo nos machos, e nos cornos uterinos nas fêmeas; assincronia entre a espermatogênese e o período de cópula; e o atraso na implantação embrionária no trato reprodutivo feminino (CRICHTON e KRUTZSCH, 2000; BEGUELINI *et al.*, 2009).

Morcegos hibernantes de zonas temperadas são reprodutores sazonais, enquanto que aqueles de zonas tropicais apresentam um padrão reprodutivo complexo e diversificado, com espécies monoéstricas, poliéstricas bimodais e espécies que se reproduzem ao longo de todo o ano (REIS *et al.*, 2007). Apesar dessa ampla variação, poucos estudos avaliaram o efeito das variáveis abióticas sobre a reprodução desses animais, e especialmente sobre as glândulas acessórias do aparelho genital.

As glândulas reprodutivas acessórias (GRAs) masculinas são de suma importância por secretarem produtos que garantem a sobrevivência, viabilidade e a motilidade dos espermatozóides fato este que tem grande influência no sucesso reprodutivo dos mamíferos. A maioria dos estudos relacionados à reprodução de morcegos não contemplam essas glândulas, por exemplo, apesar da família Phyllostomidae representar mais de 53% das espécies de Chiroptera no Brasil (PERACCHI *et al*., 2006), poucos estudos relacionados às GRAs foram realizados para

representantes deste grupo, com os existentes fazendo apenas uma análise superficial, dando ênfase somente a variação anual do peso glandular.

Em trabalho prévio (PUGA *et al.*, 2011), observamos que as GRAs de *Artibeus planirostris* (Phyllostomidae) são compostas por um par de glândulas bulbouretrais, glândulas parauretrais e um complexo prostático compacto com duas regiões histologicamente distintas, ventral e dorsal. A região dorsal assemelha-se fortemente a próstata dorsal de diversos roedores, no entanto, a região ventral é atípica pois não se assemelha a nada descrito anteriormente para outros mamíferos, em particular às características do epitélio e secreção produzida. Tal descrição demonstra que a constituição das GRAs de *A. planirostris* difere de todas as outras famílias de morcegos já analisadas (CRICHTON e KRUTZSCH, 2000). Além disso, quando analisamos a literatura para Phyllostomidae notamos que as descrições já realizadas (KRUTZSCH *et al.*, 1976; KRUTZSCH e NELLIS, 2006) precisam ser renomeadas já que inferem que a região dorsal prostática corresponde a vesícula seminal.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o padrão hormonal, histológico, histoquímico, histo-enzimológico, e imunoistoquímico do complexo glandular prostático de um morcego Neotropical, *Artibeus planirostris* (SPIX, 1823) (Chiroptera: Phyllostomidae), com acompanhamento anual, no intuito de avaliar possíveis influências da sazonalidade sobre essas glândulas.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo, Coletas e Licenças.

Os animais foram coletados na cidade de São José do Rio Preto, no noroeste do estado de São Paulo, Brasil, (49W22'45" 20S49'11"), que está localizado 500 metros acima do nível do mar. Essa é uma região semi-plana, inserida em um degradado bioma de Cerrado, com clima meso-térmico (verões chuvosos e inversos secos).

As coletas foram realizadas entre maio de 2009 e julho de 2010, no período noturno, e consistiram na montagem de redes de espera (3 m x 6 m), colocadas para interceptar morcegos voando de 1-3 m acima do solo. As redes foram colocadas precisamente em possíveis rotas de vôo ou em saídas de abrigos.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista (UNESP) (Processo: 017/2009 – CEEA), e a coleta e captura dos animais foi autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, IBAMA (Processo: 21707-1).

Análise da Temperatura e Pluviosidade.

Os dados médios mensais referentes à temperatura (°C) e pluviosidade (mm) da região deste estudo (São José do Rio Preto – Noroeste do Estado de São Paulo – Brasil) foram cedidos pelo Instituto Agronômico de Campinas – CIIAGRO, estes estão disponíveis no site: http://www.ciiagro.sp.gov.br.

Estes dados mensais foram agrupados, de modo que obtivéssemos a média e o desvio padrão da pluviosidade e temperatura para cada estação do ano.

Delineamento experimental.

Foram analisados 43 espécimes machos, sexualmente maduros de *Artibeus planirostris*. A maturidade sexual foi certificada com base no tamanho e peso corporal, completa ossificação das epífises metacarpais, grau de desgaste dos dentes e características da pelagem (DE KNEGT *et al.*, 2005), além do tamanho e posicionamento dos testículos e a presença de espermatozóides no interior da uretra.

Todos os espécimes estão arquivados na Coleção de Chiroptera da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP – DZBSJRP).

Os espécimes analisados foram divididos ao longo das Estações do Ano (Outono, Inverno, Primavera e Verão), bem como entre as técnicas executadas. A relação dos animais (*n*) de cada estação com a respectiva técnica utilizada encontra-se na **Tabela 1**.

Processamento e documentação dos animais.

Os animais foram sacrificados por compressão cervical, devidamente pesados, e posteriormente acomodados em decúbito dorsal na placa de dissecção. Amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca e, posteriormente, foi realizada uma incisão na região abdominal em direção caudal, seccionando a pele e o tecido subcutâneo para expor a área. O complexo glandular prostático (CGP) e os testículos foram retirados, pesados e posteriormente fixados para as análises.

Dosagem hormonal sérica.

As amostras de sangue foram processadas para separação do plasma (centrifugação 3000rpm, durante 15min), o qual foi utilizado para análise da concentração de testosterona plasmática, realizada em aparelho automatizado (VITROS

ECi-Johnson e Johnson de Análise Quimioluminescente Ultra-sensível), em um laboratório de análises clínicas de referência.

Análise em microscopia de luz.

O CGP foi fixado por imersão em solução fixadora Karnovsky's, desidratado e incluído em historesina (Historesin embedding Kit – Leica). Cortes de 3µm foram corados com hematoxilina-eosina (RIBEIRO e LIMA, 2000) e analisados em microscópio Olympus BX60 com analisador de imagens (Image-Pro-Plus for Windows software) acoplado.

Análise Estereológica, Morfométrica e Cariométrica.

Estereologia: Para esta análise, 30 campos histológicos foram aleatoriamente selecionados de cada estação do ano. A freqüência relativa dos componentes glandulares (epitélio, lúmen e estroma) foi calculada utilizando o Sistema-Teste de arranjo triangular M42, segundo Weibel e colaboradores (1978), com 130 pontos no sistema.

Morfometria: para quantificar a altura do epitélio, foram realizadas 240 medidas aleatórias para cada estação do ano, para isto foram capturados 20 campos aleatórios de cada animal, e realizadas em média 3 medidas por campo.

Cariometria: para quantificação de área (μm^2), perímetro nucleares (µm) e fator-forma do núcleo [4μ.área nuclear/(perímetro nuclear)^2], foram realizadas 240 medidas aleatórias para cada estação do ano. Para isto foram capturados 20 campos aleatórios de cada animal, e realizadas em média 3 medidas por campo.

O censo populacional de células epiteliais foi realizado na região ventral. Para esta contagem foram obtidos 77 campos de cada estação do ano, e nestes foram identificados a quantidade de células basais e secretoras.

Imunoistoquímica.

O CGP foi fixado em Metacarn (metanol: clorofórmio: ácido acético – 6:3:1), desidratado, diafanizado e incluído em parafina (Historec – MERK). Cortes de 4µm foram produzidos e submetidos às reações imunoistoquímicas para receptor de andrógeno (AR - rabbit polyclonal IgG, N-20, Santa Cruz Biotechnology, EUA, diluição 1:75), antígeno nuclear para proliferação celular (PCNA - PC10 sc-56, Santa Cruz Biotechonology, EUA, diluição 1:100) e apoptose (TUNEL - TdT-Fragel-Calbiochem, segundo instruções do fabricante). Os cortes passaram por revelação com diaminobenzidina (DAB) e contracoloração com hematoxilina de Harris por 8 segundos. Foram utilizados controles negativos, omitindo-se a etapa de incubação com o anticorpo primário ou enzima (no caso do TUNEL).

A porcentagem relativa de células positivas e negativas do epitélio acinar foi determinada a partir de campos histológicos aleatórios. E dividindo-se a porcentagem de células PCNA-positivas pelas TUNEL-positivas, obtivemos a razão PCNA/TUNEL.

Citoquímica enzimática – Atividade da Fosfatase Ácida Prostática.

Os CGP foram removidos e imediatamente imersos em nitrogênio líquido. Criocortes de 10µm de espessura, obtidos em criostato Leica CM1850, foram coletados em lâminas de vidro. Para detecção da atividade de fosfatase ácida prostática foi empregado o método clássico de Gomori (1950) modificado por Custódio e

colaboradores (2004).

Análise Estatística.

Todos os dados numéricos foram expressos pelas médias e desvios padrão, e analisados inicialmente pela Análise de Variância (One-way ANOVA) e, posteriormente pelo teste de Tukey para comparações múltiplas ($p \leq 0.05$=significativo), usando o programa Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK).

RESULTADOS

Análise da Temperatura e Pluviosidade.

Na **Fig. 1A-B** temos os dados de temperatura e pluviosidade, respectivamente, da cidade de São José do Rio Preto (Noroeste do Estado de São Paulo), a área correspondente ao estudo. No gráfico da temperatura podemos notar que essa região não apresenta frio rigoroso, visto que a média mínima foi no outono (22,20°C), e também que a temperatura pode ser dividida em dois períodos, um frio (outono-inverno) e um com a temperatura um pouco mais elevada (primavera-verão). Quando comparamos a temperatura com a precipitação mensal, notamos que esta tem o mesmo padrão da temperatura, ou seja, apresenta um aumento da precipitação do outono até o verão, porém diferentemente da temperatura esses números são muito mais discrepantes, dado este que nos permite afirmar que nesta região as estações seca (outono-inverno) e chuvosa (primavera-verão) são bem delimitadas.

Análise Biométrica, Dosagem Hormonal.

Os dados de pesos (corporal, testicular e do CGP) e dosagens hormonais de testosterona dos animais coletados em cada estação do ano estão expressos na **Fig. 1C-F**.

Analisando o peso corporal (**Fig. 1C**) observa-se que este variou pouco dentro de cada estação do ano, não sendo estatisticamente significativo. Já os pesos testicular (**Fig. 1D**) e do CGP (**Fig. 1E**) variaram sincronicamente, apresentando os menores valores no outono, um aumento significativo no inverno, uma redução na primavera e o maior pico no verão.

Avaliando as dosagens hormonais de testosterona verificamos que há uma tendência ao aumento dos níveis séricos de testosterona do outono ao verão (**Fig. 1F**), sendo que o pico máximo ocorre no verão (9,95ng/dL±6,51), assim como o peso testicular e glandular.

Análise Estereológica, Morfométrica e Cariométrica.

O CGP é um complexo glandular compacto que circunda a uretra. Ele pode ser subdividido em duas distintas regiões: ventral e dorsal (**Figs. 2A-B**).

-Região Ventral

Observamos que a região ventral apresenta uma maior proporção de lúmen em todos os grupos amostrais, seguido pelo epitélio e estroma (**Figs. 2C-E**). O lúmen apresentou seu pico na estação outono (68,20% ± 9,49, **Fig. D**), a qual foi diferente significativamente de sua estação adjacente (Inverno: 57,28% ± 13,05), bem como do verão (Verão: 59,13% ± 10,97, **Fig. E**). O epitélio teve comportamento inverso ao lúmen, com proporção máxima no inverno (26,81% ± 7,81), e mínima no outono (21,12% ± 7,07). O estroma apresentou menores proporções nas estações outono (10,68% ± 5,93) e primavera (11,18% ± 5,29), e dois picos nas estações inverno (15,91% ± 8,44) e verão (16,00% ± 7,76), com todos os valores diferindo significativamente (**Fig. 2C**).

O epitélio dessa região é bastante irregular e indefinido (**Figs. 2D-E**), sendo assim a mensuração de sua altura não foi possível.

Nessa região observamos que a área do núcleo apresentou uma redução gradativa do outono até o verão (**Fig. 2I**). Essa redução foi confirmada estatisticamente, onde, tanto o outono quanto o inverno (**Fig. 2O**), foram diferente significativamente da primavera e do verão (**Fig. 2P**). Demonstrando assim que nesta região há uma época onde a área nuclear é maior (Outono) e outra menor (Verão), e as estações inverno e primavera são intermediárias.

De forma similar, o perímetro nuclear também apresentou uma redução gradativa do outono até o verão (**Fig. 2J**), com apenas a redução da primavera para o verão não sendo estatisticamente significativa.

Analisando o fator-forma observamos que este ficou próximo a 0,81 ao longo de todas as estações, ocorrendo diferenças estatisticamente significantes entre o outono e o inverno (**Fig. 2K**).

-Região Dorsal

Diferentemente do observado para a região ventral, na região dorsal observamos uma predominância do epitélio em todos os grupos analisados, seguido pelo lúmen e o estroma (**Figs. 2F-H**). Observamos que o epitélio apresenta um acentuado pico no inverno (**Fig. 2F-G**; Inverno: 52,32% ± 8,43), com significativo declínio posterior, primavera-verão (**Fig. 2F-H**). O lúmen apresentou características opostas ao epitélio, com um declínio significativo no inverno (28,25% ± 11,90). Já o estroma não apresentou variações significativas durante as estações (**Fig. 2F-G**)

Nessa região, observamos que a altura do epitélio tende a aumentar gradativamente da primavera (**Fig. 2Q**) até o inverno (**Fig. 2R**), sendo essa diferença estatisticamente significativamente (**Fig. S**).

A área nuclear das células secretoras dessa região apresentou similaridades com a da região ventral, apresentando valores bem próximos em cada estação do ano e também uma tendência a reduzir progressivamente da estação outono-inverno (**Fig. R**) à primavera-verão (**Fig. Q**), sendo essa redução estatisticamente significante (**Fig. 2L**). Já o perímetro nuclear não apresentou diferença significativa ao longo do ano (**Fig. 2M**).

Observamos ainda que o fator-forma apresentou um valor médio próximo a 0,85, com diferenças estatisticamente significativas entre as estações: outono-primavera; outono-verão; inverno-primavera e inverno-verão (**Fig. 2N**). Esse resultado nos leva a inferir que há uma tendência a um decréscimo no valor do fator forma das estações outono-inverno para primavera-verão.

Censo populacional de células epiteliais

-Região Ventral

Analisando a freqüência de células epiteliais da região ventral identificamos um declínio gradativo no número de células secretoras do inverno (**Fig. 3A-B**) até o outono (**Fig. 3A-C**), com um pico significativo no inverno (15,33 céls/5733μm^2 ± 4,41) e apenas a diferença entre primavera e verão não sendo significativa (**Fig. 3A**).

As células basais apresentaram um decréscimo significativo entre as estações outono-inverno e primavera-verão, demonstrando assim que, ao longo do ano, as células secretoras respondem mais as mudanças sazonais que as células basais (**Fig. 3A**).

Imunoistoquímica

Receptor de Andrógeno (AR)

Observamos que ambas as regiões apresentaram uma alta imunorreatividade ao AR (acima de 70%) em todas as estações do ano (**Fig. 4A**), mostrando assim que ambas as glândulas (ventral e dorsal) são, possivelmente, reguladas/estimuladas fortemente por andrógenos.

A região ventral apresentou uma média de 73% de células marcadas positivamente (**Fig. 4B-B'**), com nenhuma diferença significativa entre as estações do ano (**Fig. 4C**). Por outro lado, a região dorsal apresentou uma maior imunorreatividade, em média 77% nas estações inverno-primavera-verão (**Fig. 4D-D'**) e um significante pico no outono (84,95% ± 7,91, **Fig. 4E**).

Assim observamos que a região dorsal apresenta uma maior imunorreatividade aos receptores de andrógeno do que a ventral e que sua expressão varia sazonalmente.

As figuras **4F-F'** representam os controles negativos das regiões ventral e dorsal, respectivamente.

Proliferação Celular

A porcentagem de células imunorreativas ao PCNA da região ventral foi alta, próximo a 10% (**Fig. 4J**). Essa porcentagem permaneceu constante durante as estações inverno-primavera-verão (**Fig. 4I-I'**), com um declínio significativo no outono (**Fig. 4H-H'**). Por outro lado, a região dorsal apresentou baixas taxas de proliferação, próximas a 2-3% no outono-primavera-verão (**Fig. 4K-K'-N**), com um pico significativo no inverno (10,88%, **Fig. 4L-L'-N**).

As figuras **4M-M'** representam os controles negativos das regiões ventral e dorsal, respectivamente.

Apoptose Celular

A imunorreatividade para apoptose mostrou características interessantes, principalmente para a região ventral. Observamos que essa região apresenta um enorme aumento na quantidade de células apoptóticas na primavera (63,46% ± 18,30; **Fig. 4O-P-R**), já que nas outras estações a porcentagem fica em média 1,7% (**Fig. 4Q-Q'-R**). Demonstrando assim, que esta região apresenta uma perda significante de suas células secretoras.

Por outro lado, a imunorreatividade da região dorsal não apresentou diferenças significativas ao longo do ano, permanecendo constante com uma média de 0,02% (**Fig. 4S-U**).

Nas figuras **4S'-T** temos os controles negativos do TUNEL e na figura **4T'** o controle positivo.

Razão PCNA/TUNEL

Quando calculamos a razão PCNA/TUNEL da região ventral observamos que esta apresenta sua maior taxa no outono (102), e esta vai decaindo até atingir o mínimo na primavera (0,18) (**Fig. 4V**). Já a taxa da região dorsal acompanhou a porcentagem do PCNA apresentando um pico no inverno (362, **Fig. 4W**).

Citoquímica enzimática – Atividade da Fosfatase Ácida Prostática

Observamos que as regiões prostáticas responderam diferentemente a exposição à reatividade a fosfatase ácida (**Fig. 5**). A região ventral não apresentou reatividade epitelial em nenhuma das estações do ano (**Figs. 5A-B)**, indicando que possivelmente esse epitélio não produz essa enzima, por outro lado alguma atividade foi observada em seu estroma em todas as estações do ano (**Figs. 5D-E)**. De forma completamente oposta, a região dorsal apresentou 100% de seus ácinos reativos a fosfatase em todas as estações do ano (**Figs. 5G-H)**, mostrando que seu epitélio produz essa enzima em alta quantidade. Nessa região observamos que a região de entrada dos ductos deferentes apresenta uma menor reatividade a fosfatase (**Figs. 5J-K**).

As figuras **5F**, **I** e **L** correspondem aos controles negativos da reação.

DISCUSSÃO

Segundo Willig (1985), *A. planirostris* apresenta no nordeste brasileiro um ciclo reprodutivo poliéstrico bimodal, com dois picos de nascimentos, um em junho-julho (outono-inverno) e outro em março (verão). Taddei (1976) descreve fêmeas grávidas durante todo o ano para o estado de São Paulo e Graham (1987) prediz que *A. planirostris* é capaz de se reproduzir em qualquer época do ano. Dados controversos também foram observados para essa espécie no Peru (DAVIS e DIXON, 1976) e na Argentina (BÁRQUEZ, 1988), mostrando que, possivelmente, essa espécie apresenta padrões reprodutivos variáveis de acordo com o ambiente em que está inserida (FLEMING *et al.*, 1972). No presente estudo, apesar de ter sido realizado no estado de São Paulo, observamos fêmeas grávidas apenas no intervalo inverno-verão, com um pequeno pico no inverno e um alto no verão, o que nos leva a crer que em nossa região tanto a temperatura quanto a pluviosidade são pressões seletivas para a reprodução, pois o maior pico de fêmeas grávidas ocorreu no verão época mais quente e úmida.

Todos esses trabalhos levam em conta dados ecológicos baseados principalmente no ciclo reprodutivo feminino, sendo poucas informações baseadas no masculino. Segundo alguns autores, machos escrotados podem ser observados em vários meses do ano (BÁRQUEZ, 1988; BÁRQUEZ *et al.*, 1991; BÁRQUEZ e OJEDA 1992; MARES *et al.,* 1995) e espermatozóides armazenados na cauda do epidídimo podem ser observados durante todo o ano (TADDEI, 1976), mostrando que, possivelmente, os machos estariam aptos à reprodução em qualquer época do ano. No entanto, não encontramos na literatura dados relativos à fisiologia e funcionamento do trato reprodutivo masculino (gônadas e glândulas anexas) para essa espécie.

A ativação espermatogênica dos testículos (produção de espermatozóides) por si só não garante o sucesso reprodutivo masculino, uma vez que todo espermatozóide deve passar por um seriado processo de maturação e ativação. Esse processo ocorre durante seu deslocamento até o meio externo e tem total influência/regulação do epidídimo, na região caudal (RUSSELL *et al.*, 1989), e principalmente das glândulas reprodutivas acessórias (GUYTON, 1984; VILAMAIOR *et al.*, 2003).

Como cada animal esta inserido em um ambiente diferente, é esperado que as GRAs não apenas auxiliem na sobrevivência, viabilidade de motilidade dos espermatozóides, mas que elas também sofram influência e modulação do tipo de reprodução que cada animal apresenta e das mudanças do ambiente em que está inserido. Neste trabalho observamos que o complexo glandular prostático (CGP) de *A. planirostris* apresentou nítidas variações ao longo do ano.

Observamos que a dosagem de testosterona plasmática aumentou sincronicamente com o aumento da temperatura e da pluviosidade, do outono até o verão. Dados referentes às dosagens hormonais para morcegos estão relacionados apenas a espécies hibernantes de clima temperado (GUSTAFSON e DAMASSA, 1985; GUSTAFSON e SHEMESH, 1976) e relatam de um a três picos de testosterona, que variam conforme a espécie, tempo de hibernação e o ambiente a qual a mesma está inserida. Assim notamos que a produção de testosterona em morcegos tropicais sofre, possivelmente, influência ambiental direta, em um *feed back* positivo com a temperatura, pluviosidade e conseqüente maior disponibilidade de alimento.

O peso do CGP e o testicular também aumentaram sincronicamente do outono até o verão, demonstrando que ambos os órgãos são regulados pela testosterona circulante, em um *feed back* positivo. Por outro lado, essa variação apresentou dois

picos, o menor no inverno e o maior no verão, sugerindo que esta espécie apresenta dois ciclos reprodutivos principais, nestes períodos. Assim podemos propor que *A. planirostris* apresenta um ciclo reprodutivo poliéstrico bimodal para a região noroeste do estado de São Paulo.

Krutzsch e Nellis (2006) estudando os aspectos reprodutivos de *Brachyphylla cavernarum*, também observaram uma sincronia entre o peso testicular e o das GRAs, porém esta espécie apresentou um único pico reprodutivo nos meses de novembro e dezembro. Estas diferenças no ciclo reprodutivo entre as espécies são devido, possivelmente, a diferenças no ambiente em que cada espécie está inserida.

Além dessas variações observamos que cada região do CGP (ventral e dorsal) apresenta características únicas e distintas, por exemplo: a região ventral apresenta o lúmen como componente glandular predominante, em contrapartida a dorsal apresenta o epitélio; a imunorreatividade à fosfatase ácida foi observada no epitélio de todos os ácinos da região dorsal, mas apenas no estroma da região ventral; além de que as duas regiões respondem diferentemente as variações do ambiente e da testosterona circulante.

Esses dados nos levam a corroborar estudos prévios (PUGA *et al.*, 2011) que indicavam que o complexo glandular de *A. planirostris* é formado por uma próstata única, dotada de duas regiões distintas, e refutar a literatura, a qual predizia a presença de uma próstata ventral e vesícula seminal dorsal (CRINCHTON e KRUTZSCH, 2000). A grande imurreatividade da região dorsal à fosfatase ácida indica essa região como uma região prostática já que, segundo Cerri e colaboradores (1999), as fosfatases ácidas estão presentes em grande concentração no tecido e secreção prostática, e ausentes na vesícula seminal. Por outro lado a ausência de imurreatividade da região ventral é intrigante e merece futuros estudos. As marcações do estroma dessa região podem estar

relacionadas com a presença de macrófagos - células estas que apresentam atividade desta enzima.

As diferenças na respostas de ambas as glândulas as variações do ambiente e da testosterona circulante são bem acentuadas ao longo do ano. Observamos que ambas as regiões expressam receptores de andrógeno em grande quantidade, porém a região ventral não apresenta variação significativa ao longo do ano, já a região dorsal apresenta uma grande expressão no outono, que diminui gradativamente até o verão. Quando cruzamos estes dados com o da dosagem hormonal, observamos que estes são inversamente correlacionados, ou seja, quando temos um maior nível de testosterona no sangue, temos uma menor expressão de receptores nas células epiteliais.

Singh e Krishna (2000) propuseram que as glândulas sexuais acessórias masculinas de *Taphozous longimanus* (um morcego embalonurídeo) apresentam uma relação dose-dependente da testosterona circulante e que, assim como em *T. georgianus* (JOLLY e BLACKSHAW, 1989) e *Myotis lucifugus* (vespertilionídeo - GUSTAFSON e SHEMESH, 1976), a atividade dessas glândulas necessita de altos níveis de testosterona circulante, níveis bem mais altos do que os necessários à espermatogênese. Assim, observamos que essa relação inversa pode ter sido desenvolvida de forma a facilitar o estimulo dessa glândula, onde quando os níveis hormonais estão baixos a síntese de receptores aumenta para que as células prostáticas maximizem a captação da pouca testosterona circulante. Por outro lado, quando os níveis hormonais estão altos, essa grande produção pode se estabilizar.

Observamos também que a região dorsal apresenta uma menor porcentagem de células PCNA positivas e também de TUNEL positivas que a ventral, e que durante o ano essa região apresenta apenas um aumento da razão PCNA/TUNEL no inverno,

que está diretamente relacionado com o aumento da porcentagem e da altura do epitélio nessa estação.

Por outro lado, a região ventral apresentava uma perceptível flutuação no número de células ao longo das estações do ano, a qual foi comprovada pelo censo populacional de células, pela alta taxa de células PCNA+ do inverno ao verão e do elevado número de células apoptóticas observados na primavera. Podemos identificar que esta flutuação ocorre tanto nas células basais quanto nas secretoras, porém com maior impacto nas secretoras. Esta região apresenta um maior número de células no inverno, sendo esse aumento provavelmente devido ao aumento da taxa de testosterona circulante que estimula a ativação da glândula e a uma grande produção de secreções necessárias aos picos reprodutivos observados no inverno e verão. Este número decai acentuadamente na primavera, devido à grande mortalidade celular observada nesse período, e o alto nível de células proliferativas (PCNA+) reconduzem ao aumento do próximo inverno. Essa alta mortalidade, somada ao fato de que as células dessa região eliminam grande parte de seu citoplasma com a secreção (PUGA *et al.*, 2011), nos leva a confirmar a natureza holócrina desta região prostática.

Apesar das diferenças observadas entre as duas regiões, notamos que ambas apresentam uma preparação funcional para a reprodução semelhante, onde no período outono-inverno, com o estimulo do aumento da testosterona circulante o componente epitelial assim como a altura do epitélio e a área nuclear aumentam, iniciando a síntese de seus componentes e elevando o peso glandular. Essa secreção parece ser armazenada no interior das células por certo período, provavelmente um período de maturação. Após esse período, as células começam a liberar a secreção no interior do lúmen, fato que demonstra o aumento no componente lúmen na primavera, e fica armazenada até a liberação na época de reprodução, provavelmente o maior pico reprodutivo, no verão.

Assim observamos que ambas as glândulas possivelmente produzem em larga escala durante o inverno, estimuladas pelo aumento da testosterona. Certa parte dessa produção é liberada já no inverno, propiciando assim o menor pico de reprodução observado nessa estação, e a outra parte ficando armazenada para o maior pico reprodutivo, observado no verão.

Concluímos assim que *A. planirostris* apresenta um padrão de reprodução poliéstrico bimodal para espécimes do noroeste do estado de São Paulo e que esse padrão aparenta ser intimamente regulado por um aumento gradativo da taxa de testosterona circulante, que estimula ambas as regiões prostáticas a se prepararem para os dois períodos reprodutivos (inverno e verão). Ainda confirmamos a natureza prostática da região dorsal e a holócrina da região ventral, fato este nunca antes descrito para a glândula prostática.

REFERÊNCIAS

BÁRQUEZ, R. M. Notes on identity, distribution, and ecology of some Argentine bats. **J Mammal.** v. 69, p. 873–876, 1988.

BÁRQUEZ, R.M.; OJEDA, R.A. The bats (Mammalia: Chiroptera) of the Argentine Chaco**. Annals of Carnegie Museum.** v. 61, p. 239–261, 1992.

BÁRQUEZ, R.M.; MARES, M.A.; OJEDA, R.A.; GIANNINI, N. Mammals of Tucuman (Mamiferos de Tucuman). **Museum of Natural History Norman.** Oklahoma, 1991.

BEGUELINI, M.R.; MOREIRA, P.R.L.; FARIA, K.C.; MARCHESIN, S.R.C.; MORIELLE-VERSUTE, E. Morphological Characterization of the Testicular Cells and Seminiferous Epithelium Cycle in Six Species of Neotropical Bats. **J Morphol.** v. 270, p. 943-953, 2009.

CERRI,L.M.O.; AJZEN, S.; ARAP, S.; CERRI, G.G. **Ultra-sonografia da Próstata.** 1st edn, vol. 1. Sarvier, São Paulo, 1999.

CRICHTON, E.G.; KRUTZSCH, P.H. **Reproductive biology of bats.** London: Academic Press, 2000. 510 p.

CUSTÓDIO, A.M.G.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Acid phosphatase activity in gerbil prostate: comparative study in male and female during postnatal development. **Cell Biol Int.** v. 28, p. 335-344, 2004.

DAVIS, W.B.; DIXON. J.R. Activity of bats in a small village clearing near Iquitos, Peru. **J Mammal.** v. 57, p. 747–749, 1976.

DE KNEGT, L.V.; SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; SALES, G.L. Morcegos capturados no município de Belo Horizonte, 1999-2003. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 57, p. 576-583, 2005.

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.

GÖMÖRI, G. Silver impregnation for reticulin in paraffin sections. **Am J Pathol.** v. 13, p. 993–1002, 1937

GRAHAM, G. L. Seasonality of reproduction in Peruvian bats. In. **Studies in Neotropical mammalogy**, essays in honor of Philip Hershkovitz (B. D. Patterson and R. M. Timm, eds.). Fieldianna: Zoology (New Series) v. 39, p. 173-181, 1987.

GUSTAFSON, A.W.; DAMASSA, D.A. Annual variations in plasma sex steroid-binding protein and testosterone concentrations in the adult male little brown bat: Relation to the asynchronous recrudescence of the testis and accessory reproductive organs. **Biol Reprod.** v. 33, p. 1126-1137, 1985.

GUSTAFSON, A.W.; SHEMESH, M. Changes in plasma testosterone levels during the annual reproductive cycle of the hinernating bat, *Myotis lucifugus lucifugus* with a survey of plasma testosterone levels in adult male vertebrates. **Biol Reprod.** v. 15, p. 9-24, 1976.

GUYTON, A.C. **Tratado de Fisiologia Médica.** 6ed. Interamericana. Rio de Janeiro, 1984.

JOLLY, S.E.; BLACKSHAW, A.W. Sex steroid levels and Leydig cell ultrastructure of the male common sheath tailed bat, *Taphozous georgianus*. **Reprod Fertil Dev.** v. 1, p. 47–53, 1989.

KRUTZSCH, P. H.; NELLIS, D. W. Reproductive anatomy and cyclicity of the male *Brachyphylla cavernarum* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Acta Chiropterologica.** v. 8 (2), p. 497-507, 2006.

KRUTZSCH, P.H.; WATSON, R.H.; LOX, C.D. Reproductive biology of the male leaf-nosed bat, *Macrotus waterhousii* in Southwestern United States. **Anat Rec.** v. 184, p. 611-635, 1976.

MARES, M.M.; BÁRQUEZ, R.M.; BRAUN,J.K. Distribution and ecology of some Argentine bats (Mammalia). **Annals of Carnegie Museum.** v. 64, p. 219–237. 1995.

PERACCHI, A.L.; LIMA, I.P.; REIS, N.R.; NOGUEIRA, M.R.; HORTÊNCIO-FILHO, H. **Ordem Chiroptera.** In: Mamíferos do Brasil. Org.: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. Londrina: Nélio R. dos Reis. p. 153-230, 2006.

PUGA, C.C.I., BEGUELINI, M.R., NEGRIN, A.C., CHRISTANTE, C.M., MORIELLE-VERSUTE, E., VILAMAIOR, P.S.L., TABOGA, S.R. Structure, histochemistry and ultrastructure of the male reproductive accessory glands in the Neotropical flat-faced fruit-eating bat, *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae) – Submitted, 2011.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Morcegos do Brasil.** Londrina: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. 2007. 253 p

RIBEIRO, M.G.; LIMA, S.R. **Iniciação às técnicas de preparação de material para o estudo e pesquisa em morfologia.** Belo Horizonte: SEGRAC – Editora e Gráfica Limitada, 2000.

RUSSELL, L.D.; BARTKE, A.; GOH, J.C. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. **Am J Anat.** v. 184, p. 179-189, 1989.

SINGH, U.P.; KRISHNA, A. 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.** v. 15;287(1), p. 54-61, 2000.

SPIX, J. DE. Simiarum et vespertilionum brasiliensium species novae, ou histoire naturelle des espèces nouvelles de singes et de chauves-souris observées et recueillies pendant le voyage dans l'intérieur du Brésil execute par ordre de S.M. le Roi de Bavière dans les années 1817, 1818, 1819, 1820. Volume 4. **Francisci Seraphici Hubschmanni.** Munich, Germany, 1823.

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

VILAMAIOR, P.S.L.; SUZIGAN, S.; CARVALHO, H.F.; TABOGA, S.R. Structural characterization and distribution of elastic system fibers in the human prostate and some prostatic lesions. **Braz J Morphol Sci.** v. 20(2), p. 101-107, 2003.

WEIBEL, E.R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Lab Invest.** v. 12, p. 131-155, 1978.

WILLIG, M. R. Reproductive patterns of bats from Caatingas and Cerrado biomes in northeast Brazil. **J Mammal.** v. 66,p. 668–681, 1985.

Figura 1. Variação na temperatura (**A**), precipitação pluviométrica (**B**), peso corporal (**C**), peso gonadal (**D**), peso do complexo glandular prostático (**E**) e nível plasmático de testosterona circulante (**F**) de *A. planirostris* nas diferentes estações do ano. Os valores correspondem à média ± desvio padrão. ^{a,b,c}Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas entre as estações do ano ($p \leq 0,05$).

FIGURA 1.

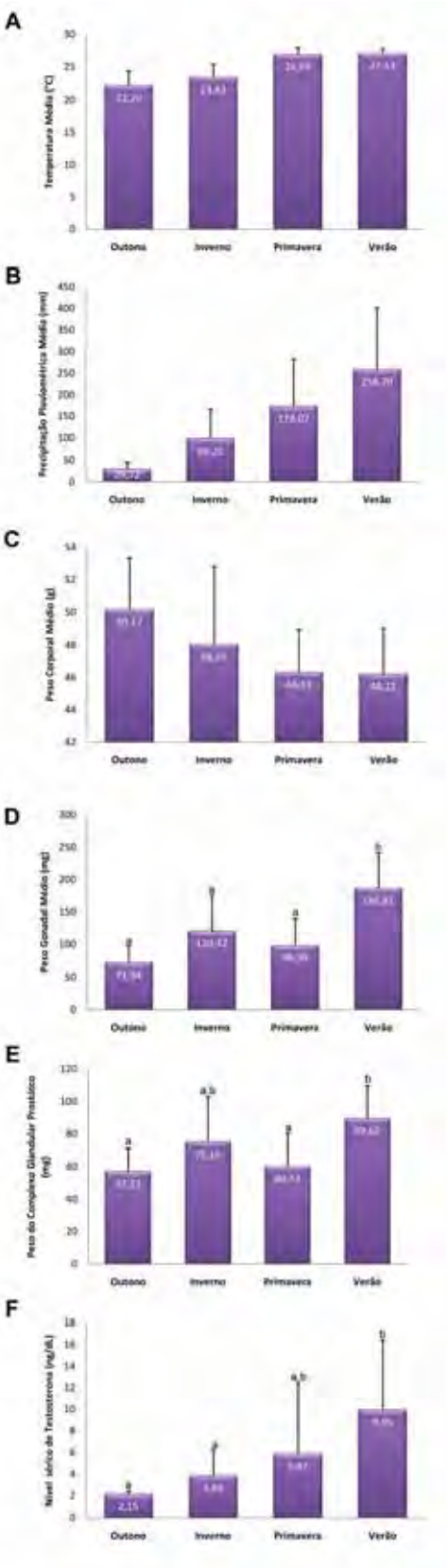

A
Temperatura Média (°C)
Outono
Inverno
Primavera
Verão
B
Precipitação Pluviométrica Média (mm)
Outono
Inverno
Primavera
Verão
C
Peso Corporal Médio (g)
Outono
Inverno
Primavera
Verão
D
Peso Gonadal Médio (mg)
Outono
Inverno
Primavera
Verão
E
Peso do Complexo Glandular Prostático (mg)
Outono
Inverno
Primavera
Verão
F
Nível sérico de Testosterona (ng/dL)
Outono
Inverno
Primavera
Verão

Figura 2. Morfologia do complexo glandular prostático (CGP) de *Artibeus planirostris* corados com hematoxilina-eosina e avaliados estereológica, morfométrica e caiometricamente ao longo de um ano. **A-B.** Vista geral do CGP, observe as duas diferentes regiões ventral e dorsal. **C-D-E.** Região Ventral. Nesta região observamos, na estereologia (**C**), que ocorre uma diminuição na porcentagem de epitélio e um aumento na de lúmen na estação do outono (**D**), quando comparamos com as outras estações (verão – **E**). **I-J-K.** Gráficos da cariometria da região ventral, nesta região observamos uma redução da área do núcleo (**I**) gradativa do outono (**O**) até o verão (**P**). O perímetro nuclear também apresentou uma redução gradativa do outono até o verão (**J**). Já o fator forma ficou próximo a 0,81 ao longo de todas as estações, ocorrendo diferenças estatisticamente significantes entre o outono e o inverno (**K**). Na estereologia da região dorsal (**F-G-H)** observamos que o epitélio apresenta um acentuado pico no inverno (**F-G**), com significativo declínio posterior, na primavera-verão (**F-H**), o lúmen apresentou caracteristicas opostas ao epitélio (**F-G-H**) e o estroma não apresentou diferenças significativas (**F-G-H**). **L-M-N.** Gráficos da cariometria da região dorsal, em **L** podemos notar que essa região apresenta um aumento significativo da área nuclear das estações primavera-verão (**Q**) para as estações outono-inverno (**R**). O perímetro nuclear não teve diferença estatistica (**M**), já o fator-forma (**N**) teve um descréscimo no seu valor das estações outono-inverno para primavera-verão. Ainda na região dorsal, observamos que a altura do epitélio tende a diminuir gradativamente da primavera (**Q-S**) até o inverno (**R-S**). Os valores escritos logo abaixo do gráfico correspondem à média da variável. ^{a,b,c}Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas entre as estações do ano ($p \leq 0,05$).

FIGURA 2.

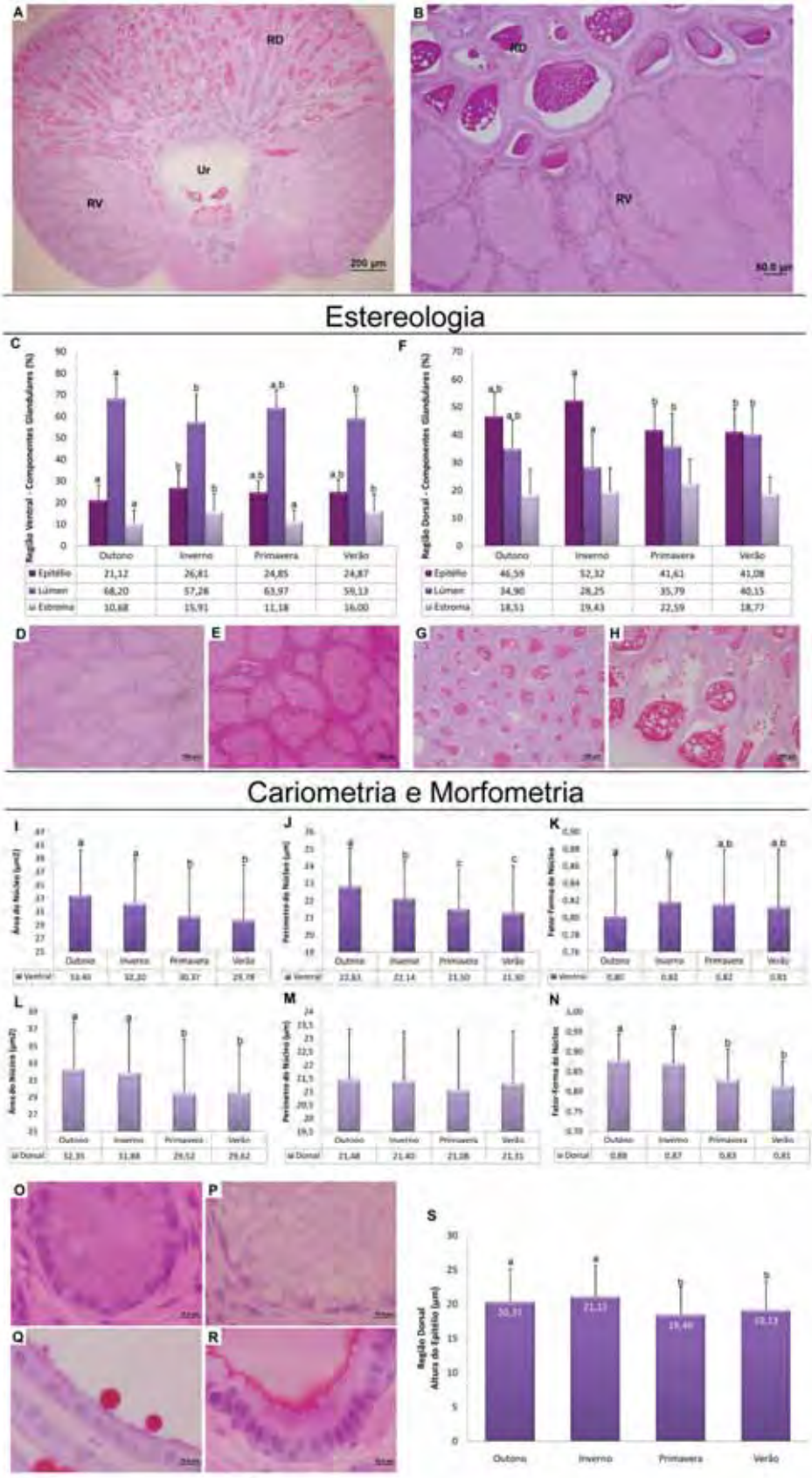

A
RD
Ur
RV
200 µm
B
RD
RV
Estereologia
C
Região Ventral - Componentes Glandulares (%)
Outono Inverno Primavera Verão
Epitélio 21,12 26,81 24,85 24,87
Lúmen 68,20 57,28 63,97 59,13
Estroma 10,68 15,91 11,18 16,00
F
Região Dorsal - Componentes Glandulares (%)
Outono Inverno Primavera Verão
Epitélio 46,59 52,32 41,61 41,08
Lúmen 34,90 28,25 35,79 40,15
Estroma 18,51 19,43 22,59 18,77
D
E
G
H
Cariometria e Morfometria
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
Região Dorsal Altura do Epitélio (µm)
30,31
21,13
19,40
19,13
Outono
Inverno
Primavera
Verão

Figura 3. Censo populacional das células epiteliais da região ventral do complexo glandular prostático de *Artibeus planirostris.* **A.** Gráfico da média do número de células por unidade de área (5733μm^2). **B-C.** Fotomicrografias da região ventral coradas com hematoxilina-eosina. Observe que as células secretoras são mais abundantes no inverno (**B**), quando comparada com as outras estações (**C** – fotomicrografia de um espécime do outono) - (RD, região dorsal; RV, região ventral; Ur, uretra). Os valores escritos logo abaixo do gráfico correspondem à média da variável. ^{a,b,c}Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas entre as estações do ano ($p \leq 0,05$).

FIGURA 3.

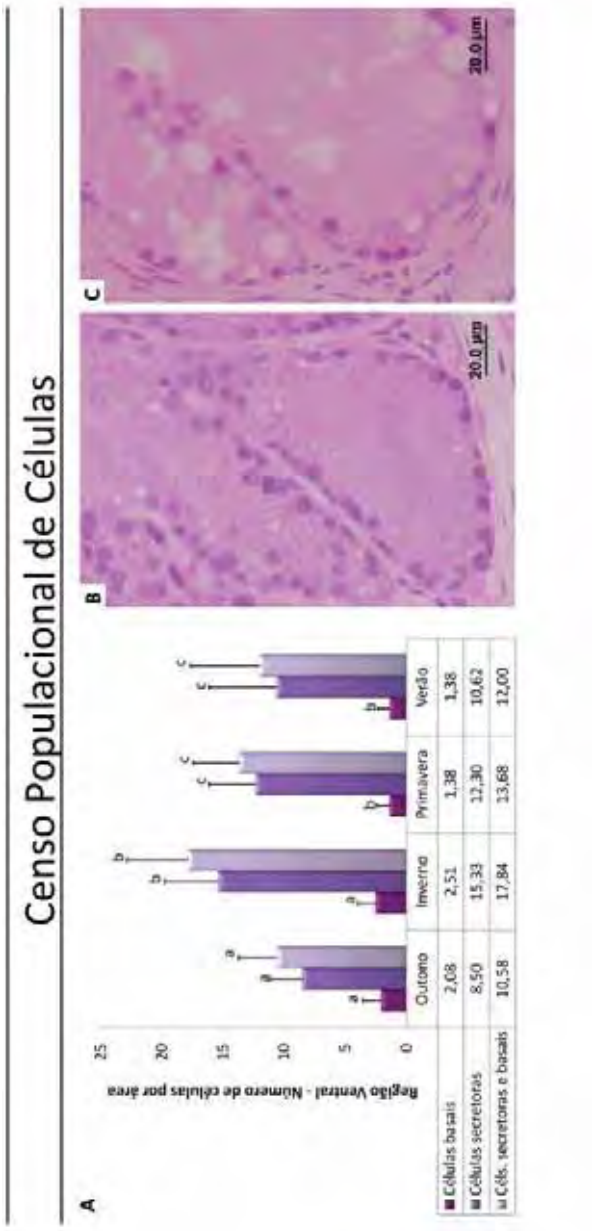

Censo Populacional de Células
A
B
C
20.0 µm
20.0 µm
Região Ventral - Número de células por área
25
20
15
10
5
0
Outono
Inverno
Primavera
Verão
Células basais 2,08 2,51 1,38 1,38
Células secretoras 8,50 15,33 12,30 10,62
Cél. secretoras e basais 10,58 17,84 13,68 12,00

Figura 4. Reações imunoistoquímicas para receptor de andrógeno (AR: **A-G**), proliferação celular (PCNA: **I-N**) e apoptose (TUNEL: **O-U**) realizadas em ambas as regiões glandulares para as quatro estações do ano de *Artibeus planirostris*; Contracoloração: Hematoxilina. **V-W.** Gráficos referentes à taxa de proliferação celular (PCNA/TUNEL) de ambas as regiões. **A.** Observe a imunorreatividade do AR em ambas as regiões glandulares (seta escura), e algumas células da região dorsal não marcadas (cabeça de seta). **B-B'-C.** Observe a alta expressão de AR da região ventral. **D-E-G.** Região dorsal. Observe a diferença significativa de reatividade ao AR (**G**) entre as estações verão (**D-D'**: seta escura – células positivas; cabeça de seta – células negativas) e outono (**E**). **F-F'.** Controles negativos da reação: região ventral e dorsal, respectivamente. **I-J.** Região ventral. Observe a alta imunorreatividade ao PCNA nas estações inverno-primavera-verão (**I-I'-J**) e o declínio significativo no outono (**H-H'-J**). **K-K'-L-L'-N.** Região dorsal. Note a baixa imunorreação no outono-primavera-verão (**K-K'-N**) e o pico de proliferação celular do inverno (**L-L'-N**). **M-M'.** Controles negativos da reação: região ventral e dorsal, respectivamente. **O.** Note a grande diferença de marcação para apoptose entre as duas regiões (ventral e dorsal) na estação da primavera. Nesta estação observamos uma alta taxa de apoptose (**P-R**) quando comparada as outras estações (**Q-Q-R'**). **S-U.** Região dorsal. Observe a baixa marcação ao longo das estações do ano. **S'-T.** Controles negativos da reação: região dorsal e ventral, respectivamente. **T'.** Controle positivo. (RD, região dorsal; RV, região ventral; Setas escuras: células positivas; cabeças de setas: células negativas). Os valores escritos no interior das barras ou logo abaixo da mesma, correspondem à média da variável. ^{a,b,c}Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas entre as estações do ano ($p \leq 0,05$).

FIGURA 4.

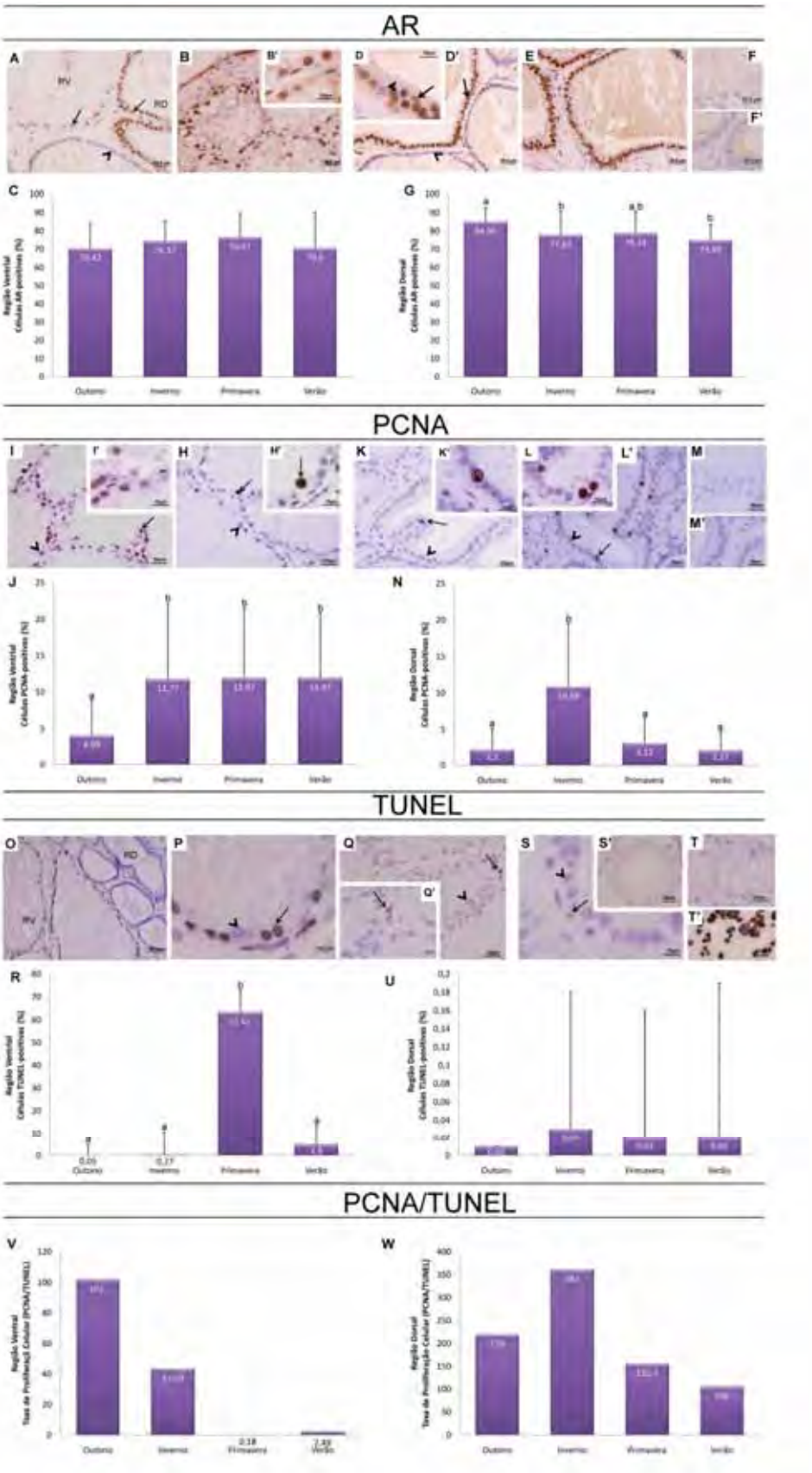


Figura 5. Criocortes do complexo glandular prostático de *Artibeus planirostris* submetidos à reação para fosfatase ácida prostática. Contracoloração: Metil-Green. **A-B.** Visão geral do complexo prostático. Observe a ausência de marcações na região ventral, a marcação positiva para a região dorsal e a região de ductos (seta). **C.** Detalhe da região dorsal. Note a região de ductos (D). **D-E.** Região ventral. Note a marcação de pontos no estroma (setas). **F.** Controle negativo da região ventral. **G-H.** Região Dorsal. Observe a forte marcação para fosfatase ácida (setas claras). **I.** Controle negativo da região dorsal. **J-K.** Região de desembocadura de ductos. Note a fraca reatividade da reação. **L.** Controle negativo da região de desembocadura de D, Região de desembocadura dos ductos deferentes; RD, região dorsal; RV, região ventral.

FIGURA 5

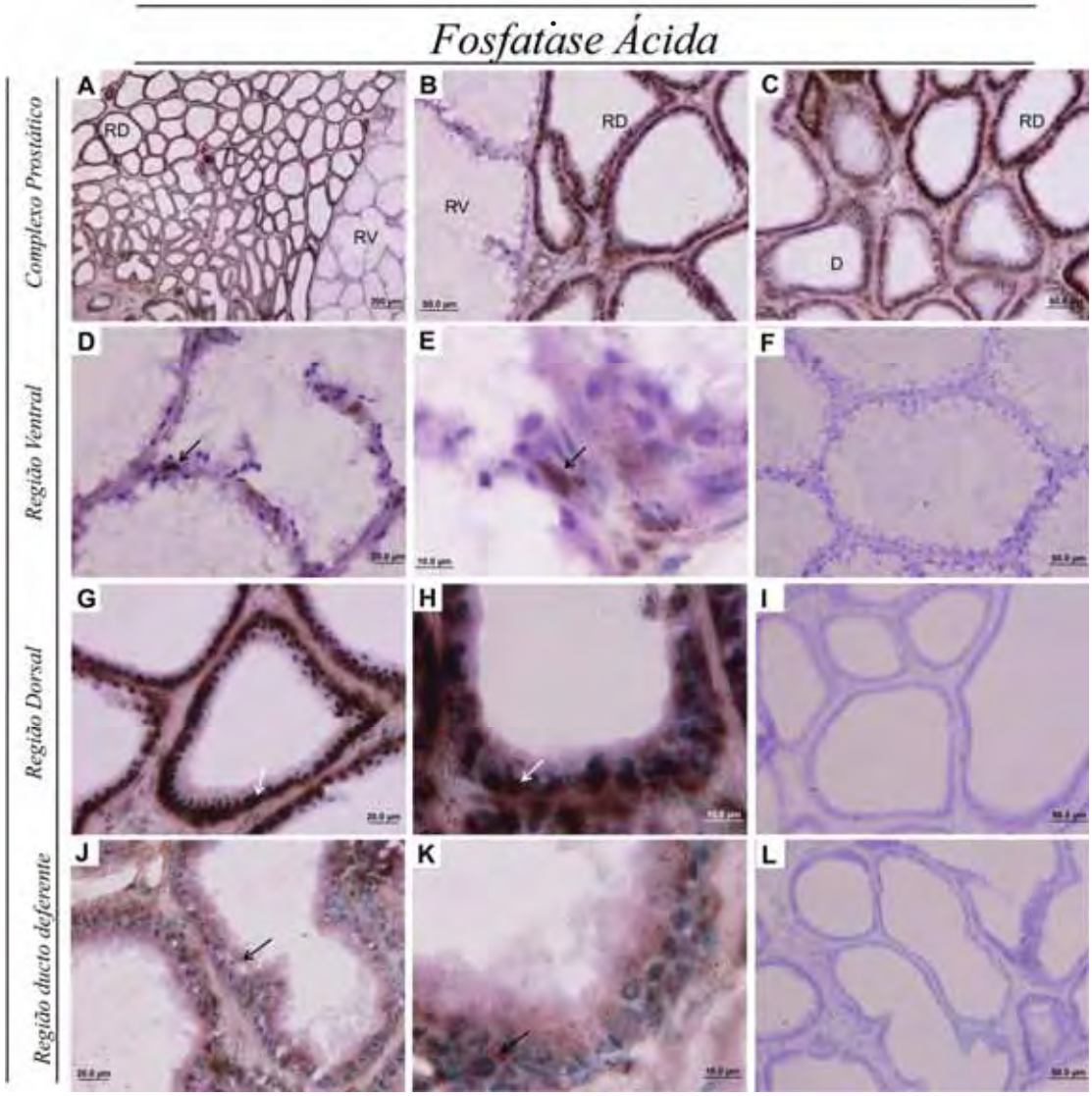

Fosfatase Ácida
Complexo Prostático
Região Ventral
Região Dorsal
Região ducto deferente
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
RD
RV
D

Tabela 1. Descrição do número de espécimes utilizado em cada parâmetro analisado ao longo do trabalho.

	Estações do Ano			
Parâmetros	***Outono***	***Inverno***	***Primavera***	***Verão***
Biometria	9	13	13	8
Dosagem Hormonal	8	12	12	8
Estereologia/Morfometria/Cariometria	4	5	4	4
AR	3	4	3	3
PCNA	3	3	3	3
TUNEL	3	3	3	3
Fosfatase ácida	3	3	3	3

.

V- <u>Artigo 3</u>: Morfologia das glândulas reprodutivas acessórias masculinas de uma espécie de Phyllostomidae, *Platyrrhinus lineatus* (Chiroptera: Phyllostomidae).

Cíntia C. I. Puga[1], Mateus R. Beguelini[2], Eliana Morielle-Versute[1], Patricia S. L. Vilamaior[1], Sebastião R. Taboga[2*]

[1] *Departamento de Zoologia e Botânica, Universidade Estadual Paulista – UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil 15054-000*

[2] *Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista – UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil 15054-000*

*Autor para correspondência: Sebastião Roberto Taboga – Rua Cristóvão Colombo nº 2265, Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. Tel.: +55 17 32212380. FAX: + 55 17 3221-2390. E-mail address: taboga@ibilce.unesp.br

RESUMO

A ordem Chiroptera é a segunda maior ordem dentro de mamíferos e apresenta uma variada distribuição geográfica e conseqüente variação de fatores abióticos, tais como: latitude, temperatura, umidade, precipitação e disponibilidade de alimentos, provavelmente influenciam na variedade de padrões e características reprodutivas de morcegos tropicais. Entretanto, raros são os relatos relacionados com as glândulas reprodutivas acessórias (GRAs) masculinas de morcegos brasileiros. Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar e comparar a morfologia das GRAs de um morcego exclusivamente Neotropical, *Platyrrhinus lineatus* (Chiroptera: Phyllostomidae), no intuito de comparar com nossos estudos anteriores. As GRAs foram investigadas usando macroscopia e microscopia de luz. Este estudo mostrou que as GRAs são compostas por um complexo prostático, com duas regiões distintas (ventral e dorsal), glândulas parauretrais dispersas e um par de glândulas bulbouretrais, e não apresentam vesículas seminais. Comparando as GRAs de *P. lineatus* com uma espécie descrita pelo nosso grupo de pesquisa, *Artibeus planirostris*, notamos uma grande semelhança tanto na macroscopia quanto na microscopia. Assim, quando comparando nossos dados anatômicos e fisiológicos com a literatura e estudos prévios do nosso laboratório, podemos inferir que as GRA de Phyllostomidae (Stenodermatinae) apresentam um padrão morfológico comum.

PALAVRA-CHAVE: Chiroptera, Phyllostomidae, Próstata, Bulbouretral, Parauretral.

INTRODUÇÃO

A Ordem Chiroptera no Brasil é representada por nove famílias, 64 gêneros e 167 espécies, isto torna essa a 2° maior ordem em riqueza de espécies, sendo superada apenas pela Ordem Rodentia, com 235 espécies. As famílias brasileiras com seu respectivo número de espécies são: Phyllostomidae (90), Molossidae (26), Vespertilinidae (24), Emballonuridae (15), Mormoopidae (4), Thyropteridae (4), Noctilionidae (2), Furipteridae (1) e Natalidae (1). Estas habitam todo o território brasileiro, ocorrendo na Amazônia, no Cerrado, na Mata Atlântica, no Pantanal, no nordeste, nos pampas gaúchos e até nas áreas urbanas (REIS *et al*., 2007).

A variada distribuição geográfica e conseqüente variação de fatores abióticos, tais como: latitude, temperatura, umidade, precipitação e disponibilidade de alimentos, provavelmente influenciam na variedade de padrões e características reprodutivas de morcegos tropicais (FLEMING *et al.*, 1972). Exemplos dessas características são, o armazenamento de espermatozóides em um prolongamento da cauda do epidídimo nos machos, e nas fêmeas nos cornos uterinos; assincronia da espermatogênese e período de cópula, e atraso no implante no trato reprodutivo feminino (CRICHTON E KRUTZSCH, 2000; BEGUELINI *et al.*, 2009).

Crinchton e Krutzsch (2000) ao compilarem dados sobre reprodução de morcegos, afirmam que a estrutura, tanto anatômica quanto microscópica, dos órgãos reprodutivos (testículos e glândulas acessórias) segue o padrão dos mamíferos, ou seja, estes apresentam um par de testículos, e as glândulas acessórias, tais como: próstata, vesículas seminais, glândulas ampulares e glândulas de Cowper podem ou não estar presentes no sistema reprodutor. Em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, observamos que *Artibeus planirostris*, outro filostomídeo da subfamília

Stenodermatinae, apresentou um par de glândulas bulbouretrais, e um complexo glandular prostático compacto, este é dividido em duas regiões um dorsal e outra ventral, e ausência de vesícula seminal (Puga *et al.*, submetido 2011-a)

Platyrrhinus lineatus é uma espécie também da subfamília Stenodermatinae, a qual, segundo Peracchi e Albuquerque (1971) apresenta um período de reprodução prolongada e poliestria na população paulista, indicadas pelas fêmeas grávidas e lactantes simultaneamente, nos meses de novembro e dezembro. Willig (1983) afirma, também baseado em estudos ecológicos, que *P. lineatus* apresenta proporções sexuais desiguais em suas populações, sendo que esta espécie manteve pequenos haréns pequenos de 7 a 15 fêmeas em pequenas cavernas graníticas. Colônias similares 6 a 20 indivíduos também foram relatadas por Peracchi e Albuquerque (1971). O fato desta espécie apresentar semelhanças ecológicas e ser um grupo próximo de *A. planirostris*, e com isso nos permitir inferir em qual nível ocorrem as diferenças nas GRAs de morcegos, nos levou a eleger está espécie neste estudo.

Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar e avaliar a morfologia das glândulas reprodutivas acessórias masculinas (GRAs) de um morcego exclusivamente Neotropical, *Platyrrhinus lineatus* (E. GEOFFROY ST.-HILAIRE, 1810) (Chiroptera: Phyllostomidae), no intuito de comparar com nossos estudos anteriores.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais, Coletas e Licenças

Foram analisados 10 espécimes machos, sexualmente maduros de *Platyrrhinus lineatus* (E. GEOFFROY ST.-HILAIRE, 1810). Estes espécimes estão arquivados na Coleção de Chiroptera da Universidade Estadual Paulista (DZBSJRP – UNESP). Os animais foram coletados no noroeste do estado de São Paulo, Brasil (49º22'45"W; 20º49'11"S) entre julho 2009 à junho 2010. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista (UNESP) (Processo: 017/2009 – CEEA), e a coleta e captura dos animais foi autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, IBAMA (Processo: 21707-1).

Processamento e documentação dos animais

Os animais foram sacrificados por compressão cervical e acomodados em decúbito dorsal na mesa de dissecção. Foi realizada uma incisão na região abdominal em direção caudal, a pele e o tecido subcutâneo foram seccionados para expor a área. A posição das GRAs foi fotodocumentada, e os órgãos foram retirados para análise histológica. A documentação macroscópica foi realizada com uma câmera digital HP Photosmart M627 (6.0 mm - 18.0 mm), com 7.0 megapixels e 3x zoom óptico e 5x zoom digital.

Histologia

As GRAs foram imediatamente fixadas por imersão em Solução fixadora Karnovsky's por 48 horas (0.1 M Sörensën Tampão Fosfato, pH 7.2, contendo 5% de paraformoldeído e 2.5% glutaraldeído). Em seguida, o material foi desidratado em uma

série crescente de etanol e incluído historesina (Historesin embedding Kit – Leica). Cortes de 3µm foram produzidos em micrótomo rotativo (Leica RM 2155) e coletados em lâminas de vidro para as devidas colorações. Os tecidos obtidos a partir de cortes seriados foram corados com hematoxilina-eosina (RIBEIRO e LIMA, 2000), com Azul de Toluidina (MELLO e VIDAL, 1980) e submetidos à reticulina de Gömöri (GÖMÖRI, 1937) e ácido periódico de Schiff (PAS) (BEHMER, 1976). As análises microscópicas foram realizadas em um microscópio Olympus BX60 acoplado com o Image-Pro-Plus for Windows software para análise das imagens.

Reconstrução tridimensional

Após o processamento histológico, toda a extensão do complexo glandular foi seccionada na espessura de 3µm e corados com hematoxilina-eosina. A captura e processamento das imagens foram realizados utilizando o software de análise 3.2 (Build 743; Digivision-SIS, San Diego, CA). Após o alinhamento, as regiões ventral e dorsal, glândulas parauretrais, o músculo e no lúmen da uretra foram isoladas em cada imagem e depois processados para se obter um limite de interface em cada seção, gerando um modelo tridimensional (3D).

RESULTADOS

Anatomia e modelo tridimensional das GRAs.

As GRAs de *P. lineatus* são formadas por um complexo glandular compacto localizado logo abaixo da vesícula urinária (**Fig. 1A-B-C**), o qual circunda a uretra; e um par de glândulas bulbouretrais (**Fig. 1I**) localizadas na raiz peniana.

O complexo glandular é composto por uma glândula prostática, esta apresenta duas regiões bem definidas: uma ventral e outra dorsal (**Fig. 1D**). Ainda neste complexo observamos glândulas parauretrais associadas com a submucosa da uretra (**Fig. 1G-H**). Macroscopicamente, as duas regiões da próstata apresentam diferenças na cor, formato e textura (**Fig. 1A-B-C**). A região ventral apresenta uma coloração esbranquiçada e aparência compacta, e está localizada em ambos os lados da uretra, circundando parcialmente a parte ventral da uretra. Já a região dorsal apresenta uma coloração rosa e aparência translúcida, ela circunda a parte dorsal da uretra e recebe os dois ductos deferentes. Esses ductos adentram dorsalmente na região dorsal, e converge para o centro do complexo glandular, desembocando na uretra prostática (**Fig. 1E-F**).

As glândulas parauretrais são isoladas na submucosa da uretra, dispersa no tecido conjuntivo (**Fig. 1G**). Essas pequenas glândulas têm um epitélio simples colunar, e apresenta secreção PAS positiva (**Fig. 1H**).

Na reconstrução tridimensional, a anatomia desta glândula foi confirmada (**Fig. 2**). A região ventral circunda parcialmente a uretra em todo o seu comprimento. Foi observado que a uretra prostática é um tubo linear que transpassa o complexo prostático e é circundada por tecido conjuntivo e de uma região de desembocadura de ductos. A região distal a uretra é circundada por músculo (**Fig. 2A-B-C**).

A região dorsal está posicionada atrás da uretra e recebe os dois ductos deferentes, os quais desembocam na uretra (**Fig. 2D-E**).

Histologia

Histologicamente, as duas regiões prostáticas também foram confirmadas (**Fig. 3A-B-C**). A região ventral apresenta um epitélio indefinido, as células secretoras apresentam núcleos basais, e poucas células basais. O citoplasma contém numerosas vesículas secretoras, e o lúmen é repleto de pequenos grânulos de secreção (**Fig. 3B**). A região dorsal tem um epitélio pseudoestratificado colunar o qual também apresenta dois tipos celulares: basal e secretora. As células basais são menos frequentes, e estão aderidas a lâmina basal e apresentam núcleo alongado. As células secretoras são colunares e apresentam núcleo parabasal e um Complexo de Golgi evidente no citoplasma perinuclear (**Fig. 3C**).

No método PAS, 3 tipos de secreção foram observadas (**Fig. 3D-E-F-G**). A secreção da região ventral é formada por grânulos PAS positivos (**Fig. 3E**), já a região dorsal apresenta dois tipos de secreção: uma basófila (**Fig. 3F**) e outra mista, basófila e PAS-positiva (**Fig. 3G**), esta última é a região a qual recebe os ductos deferentes. Ainda nesta região de ductos temos alguns ácinos que apresentam espermatozóides no interior do lúmen, fato este que pode estar relacionado pelo refluxo dos ductos deferentes ou da uretra.

Usando a coloração de Azul de Toluidina, observamos que a maioria das células da região ventral apresenta uma massa de cromatina condensada em uma única região central, e algumas células apresentam a cromatina concentrada em duas regiões

(**Fig. 3H**). Por outro lado, as células secretoras da região dorsal apresentam a cromatina dispersa no núcleo, se associando com o envelope nuclear (**Fig. 3I**).

Com o método reticulina de Gömöri, observamos que o complexo prostático é um órgão compacto com uma cápsula única de tecido conjuntivo (**Fig. 3J**). O arcabouço da cápsula é formado por uma grande quantidade de fibras reticulares, paralelamente arranjadas, e por fibras de colágeno tipo I (**Fig. 3K-L**). Esses dois tipos de fibras também compõem também o arcabouço da matriz extracelular, circundando os ácinos prostáticos, estas são semelhantes em ambas as regiões.

A glândula bulbouretral é uma glândula acinar de formato oval, ela é parcialmente circundada por tecido muscular (**Fig. 4A**), apresenta um epitélio cilíndrico com núcleos basais (**Fig. 4B**), os quais apresentam a cromatina dispersa no núcleo celular (**Fig. 4D**). A secreção destas glândulas é granular e PAS positivo (**Fig. 4C**).

DISCUSSÃO

A ordem Chiroptera apresenta um grande número de espécies, com ampla distribuição geográfica, fatores estes que promovem uma grande variabilidade de padrões reprodutivos, porém quando consultamos a literatura estes não tem sido muito estudados. Principalmente quando focamos esta busca nas glândulas reprodutivas acessórias masculinas. Estas glândulas são órgãos que compõem o sistema reprodutor masculino, os quais são de suma importância por secretarem produtos que garantem a sobrevivência, viabilidade e a motilidade dos espermatozóides, fato este que apresenta grande influência no sucesso reprodutivo dos mamíferos.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa tem estudado aspectos da reprodução de morcegos brasileiros, dando enfoque tanto na descrição e comparações entre famílias e espécies, quanto nas mudanças que ocorrem nestas glândulas durante o ano. Neste estudo observamos que, macroscopicamente, as GRAs apresentam um complexo compacto, o qual apresenta duas regiões distintas: uma ventral e outra dorsal, as quais envolvem a uretra, isto também foi descrito pelo nosso grupo para a espécie *A. planirostris*. As glândulas bulbouretrais também são encontradas em ambas as espécies e apresentam semelhanças tanto na localização quanto na forma (Puga *et al.*, 2011-a). Quando comparamos esses dados macroscópicos com os de outras espécies de famílias diferentes também estudadas em nosso laboratório, tais como Molossidae e Vespertilionidae, observamos que há diferenças no grau de compactação glandular, nos tipos glandulares, e localização das glândulas bulbouretral. O que nos leva a crer que, possivelmente, a composição e morfologia das glândulas reprodutivas acessórias masculinas seguem um padrão filogenético, ligado ao nível de família.

Histologicamente, as duas espécies seguem um padrão geral, este mesmo padrão foi descrito por Krutzsch e colaboradores (1976) para outra espécie de filostomídeo, *Macrotus waterhousii,* estes autores descreveram a íntima relação entre a região ventral e dorsal, e confirmaram que nesta espécie não há uma separação entre as glândulas, essas glândulas são descritas por ele como próstata, a região ventral, e vesícula seminal, a dorsal. Entretanto, como já afirmamos na descrição de *A. planirostris*, temos evidências citoquímicas e histológicas que nos levam a crer que a região dorsal não é vesícula seminal e sim uma região prostática.

A região ventral desta espécie, assim como a de *A. planirostris* apresenta um epitélio distinto de todas as GRAs de outros mamíferos, entretanto quando comparamos apenas os dois trabalhos descritivos poderíamos afirmar que estas duas regiões apresentam diferenças na região ventral, já que a de *P. lineatus* apresenta o epitélio muito mais definido que a de *A. planirostris*. Porém isso está relacionado com a época de coleta destes animais, como já descrito para *A. planirostris*, essa espécie apresenta uma mudança sazonal destas glândulas, e a região ventral apresenta uma maior celularidade em certa estação do ano, então podemos inferir que provavelmente isso ocorrerá com *P. lineatus* também, e que nossa análise foi realizada durante a fase de maior número celular.

Com a descrição de um par de glândulas de bulbouretrais logo abaixo da raiz peniana em ambas as espécies aqui estudadas e nas espécies *Macrotus waterhousii* (KRUTZSCH *et al*., 1976) e *Brachyphylla cavernarum* (KRUTZSCH e NELLIS, 2006), podemos afirmar que dentro da família Phyllostomidae, todas as espécies analisadas até o presente trabalho apresentam glândulas de bulbouretrais.

Além das regiões ventral e dorsal, observamos também a presença de glândulas parauretrais, as quais estão presentes tanto em *P. lineatus* quanto em *A.*

planirostris. Essas glândulas não foram descritas na literatura existente para filostomídeos (KRUTZSCH e NELLIS, 2006; KRUTZSCH *et al*., 1976), porém em outras espécies analisadas em nosso laboratório, tanto de filostomídeos (*Phyllostomus discolor*) quanto em molossídeos (*Molossus molossus*) estas glândulas foram encontradas e apresentaram o mesmo padrão, glândulas PAS positivas localizadas em volta da uretra, geralmente na região mais distal a vesícula urinária.

As GRAs da espécie *A. planirostris*, estudada pelo nosso grupo, apresentou importantes mudanças sazonais, tais como: na expressão de receptor de andrógeno, no número de células secretoras, na porcentagem dos componentes glandulares (epitélio, lúmen e estroma), no peso glandular, entre outros (Puga *et al.*, 2011-b). Sabendo a espécie analisada neste trabalho é da mesma subfamília que *A. planirostris*, julgamos necessário realizar uma análise sazonal de *P. lineatus* para melhor compreensão tanto das mudanças sazonais desta espécie, quanto para melhor comparar as diferenças e semelhanças entre famílias e espécies.

Assim, quando comparando nossos dados anatômicos e fisiológicos com a literatura e estudos prévios do nosso laboratório, podemos inferir que as GRA de Phyllostomidae (Stenodermatinae) apresentam um padrão morfológico comum.

REFERÊNCIAS

BEGUELINI, M.R.; MOREIRA, P.R.L.; FARIA, K.C.; MARCHESIN, S.R.C.; MORIELLE-VERSUTE, E. Morphological Characterization of the Testicular Cells and Seminiferous Epithelium Cycle in Six Species of Neotropical Bats. **J Morphol.** v. 270, p. 943-953, 2009.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS-NETO, A.G. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1976.

CRICHTON, E. G.; KRUTZSCH, P. H. **Reproductive biology of bats.** London: Academic Press, 2000. 510 p.

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.

GEOFFROY, S.T.; HILAIRE, E. Sur les Phyllostomes et les Megadermes, deux genres de la familli des chauve-souris**. Ann Mus Nat Hist Nat.**, Paris, v. 15, p. 157-198, 1810.

GÖMÖRI, G. Silver impregnation for reticulin in paraffin sections. **Am J Pathol.** v. 13, p. 993–1002, 1937

KRUTZSCH, P. H.; NELLIS, D. W. Reproductive anatomy and cyclicity of the male *Brachyphylla cavernarum* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Acta Chiropterologica**, v. 8 (2), p. 497-507, 2006.

KRUTZSCH, P.H.; WATSON, R.H.; LOX, C.D. Reproductive biology of the male leaf-nosed bat, *Macrotus waterhousii* in Southwestern United States. **Anat Rec.**, v. 184, p. 611-635, 1976.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. **Práticas de biologia celular.** Campinas, Brazil: Edgard Blücher-Funcamp, 1980.

PERACCHI, A.L.; DE ALBUQUERQUE, S.T. Lista provisória dos quir6pteros dos estados do Rio de Janeiro e Guanabara, Brasil (Mammalia, Chiroptera). **Rev Brasil Biol.** v. 31, p. 405-413, 1971.

PUGA, C.C.I., BEGUELINI, M.R., NEGRIN, A.C., CHRISTANTE, C.M., MORIELLE-VERSUTE, E., VILAMAIOR, P.S.L., TABOGA, S.R. Structure, histochemistry and ultrastructure of the male reproductive accessory glands in the Neotropical flat-faced fruit-eating bat, *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae) – Submitted, 2011-a.

PUGA, C.C.I., BEGUELINI, M.R., MORIELLE-VERSUTE, E., VILAMAIOR, P.S.L., TABOGA, S.R. Avaliação anual do complexo prostático masculino de uma espécie de morcego exclusivamente Neotropical, *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). – Submitted, 2011-b.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Morcegos do Brasil.** Londrina: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. 2007. 253 p

RIBEIRO, M.G.; LIMA, S.R. **Iniciação às técnicas de preparação de material para o estudo e pesquisa em morfologia.** Belo Horizonte: SEGRAC – Editora e Gráfica Limitada, 2000.

WILLIG, M. R. Composition, microgeographic variation, and sexual dimorphism in Caatingas and Cerrado bat communities from northeast Brazil. **Bulletin of Carnegie Museum of Natural History** v. 23, p. 1–131, 1983.

Figura 1. Fotomicrografias das glândulas reprodutivas acessórias masculinas de *Platyrrhinus lineatus*. **A.B.C.** Macroscopia do complexo glandular prostático (CGP), em **A** vista ventral do CGP, note a região ventral circundando a uretra, logo abaixo da vesícula urinária. **B.** Vista dorsal do CGP. **C.** Vista lateral do CPG, note a intima relação entre as duas regiões. **D.** Microscopia geral do CPG, note como as duas regiões prostáticas envolvem a uretra. **E.** Detalhe do ducto deferente passando pelo interior da região dorsal, detalhe (**F**) para os espermatozóides no interior do ducto. **G.** Glândulas parauretrais (seta), as quais se localizam na submucosa da uretra, em **H** podemos notar que estas glândulas possuem epitélio simples colunar e secreção PAS positiva (cabeça de seta). **I.** Glândulas bulbouretrais (seta), que se localizam na raiz peniana. Colorações: **D-E-F-G.** Hematoxilina-Eosina; **H-** Ácido Periódico de Shiff. (DD, Ducto deferente; Ep, Epitélio; L, Lúmen; M, Músculo; RD, Região dorsal; RV, Região ventral; Ur, Uretra; VU, Vesícula urinária.

FIGURA 1.

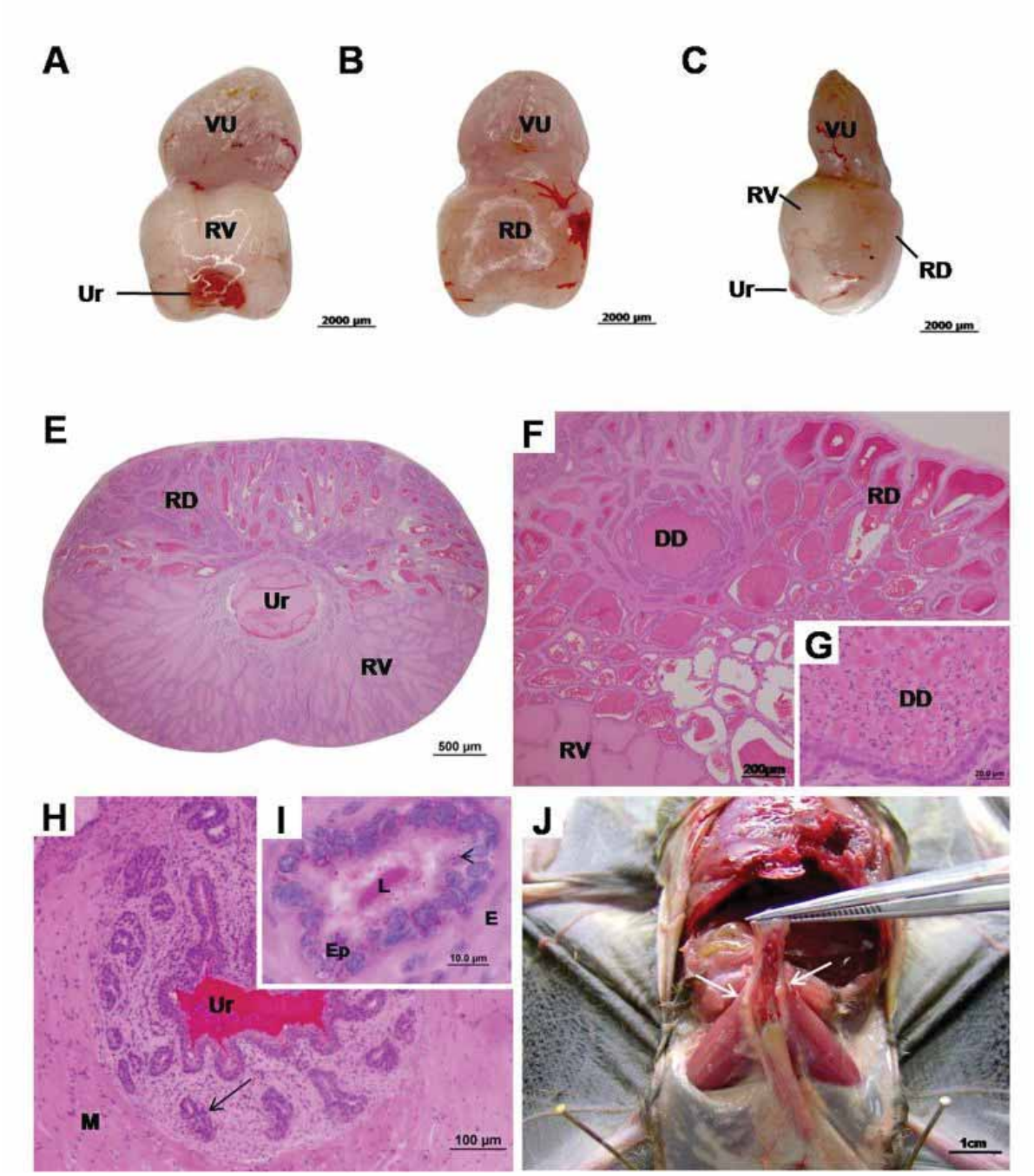

A
VU
RV
Ur
2000 µm
B
VU
RD
2000 µm
C
VU
RV
RD
Ur
2000 µm
E
RD
Ur
RV
500 µm
F
RD
DD
RV
200µm
G
DD
H
Ur
M
100 µm
I
L
E
Ep
10.0 µm
J
1cm

Figura 2. Reconstrução tridimensional do complexo glandular prostático (CGP) de *Platyrrhinus lineatus*. **A.B.C.** Vista ventral do CGP, note as partes da uretra destacadas em cores diferentes (luz, tecido conjuntivo e região muscular). **D.** Vista lateral do CGP, note o ducto deferente (seta) entrando na região dorsal do CPG. **E.** Vista dorsal do CPG, nesta foi removida a região dorsal para melhor visualização, note que os ductos deferentes (setas) desembocam na uretra prostática, na região mais aumentada de tecido conjuntivo, a qual é a principal região de desembocadura dos ductos de ambas as regiões. Barra=1mm.

FIGURA 2

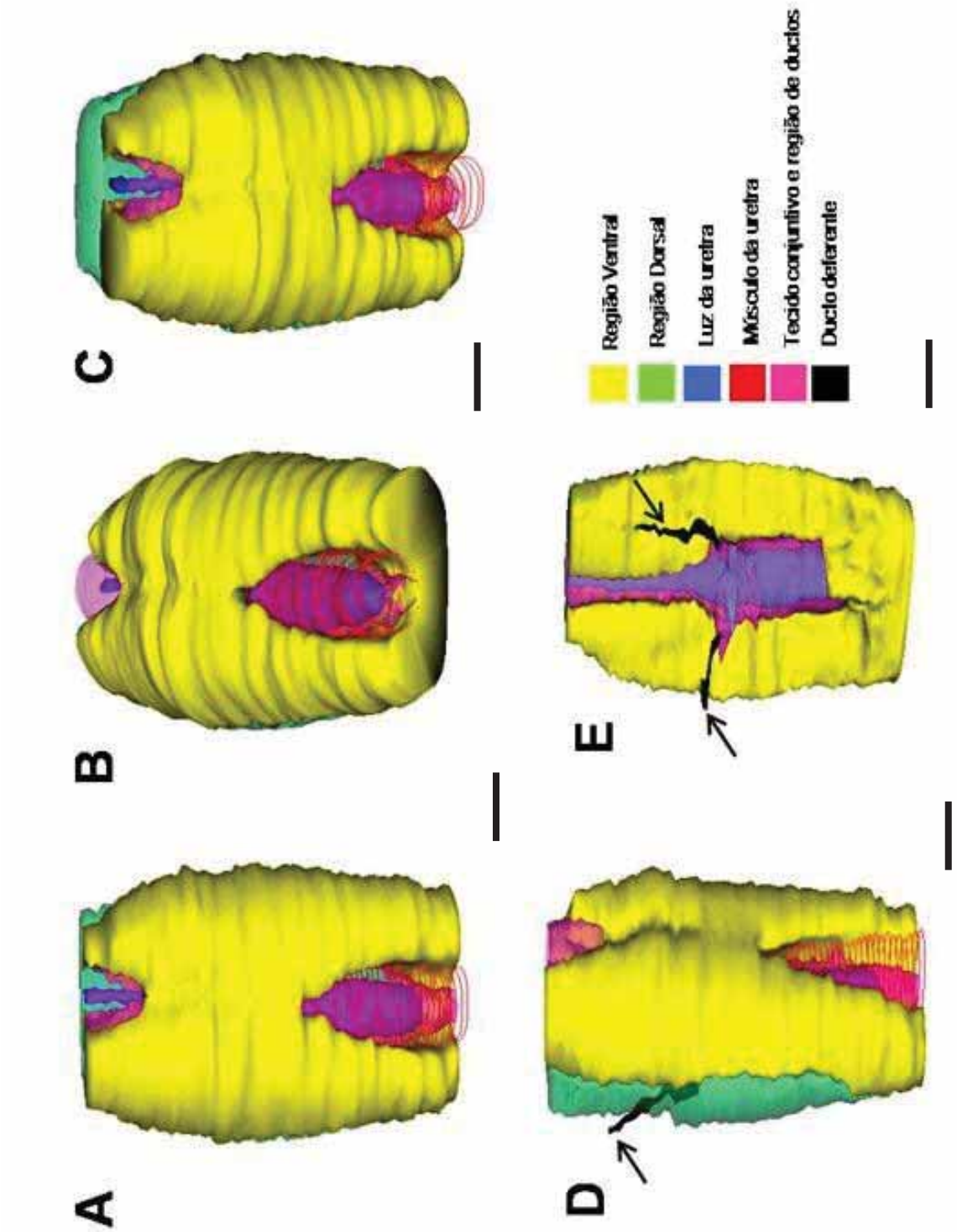

A
B
C
D
E
Região Ventral
Região Dorsal
Luz da uretra
Músculo da uretra
Tecido conjuntivo e região de ductos
Ducto deferente

Figura 3. Histologia do complexo glandular prostático (CGP) de *Platyrrhinus lineatus* corados com Hematoxilina-eosina (**A-C**); Ácido Periódico de Shiff (**D-G**); Azul de Toluidina (**H-I**) and Reticulina de Gömöri (**J-L**). **A.** Visão geral do CGP, regiões ventral e dorsal. **B.** Região Ventral do CPG, note a morfologia do epitélio. **C.** Região dorsal do CPG, note o epitélio pseudoestratificado colunar com as células secretoras (S) e basais (B). **D.** Estrutura geral da região dorsal do CGP, note os diferentes tipos de secreções nesta região. **E.** Região ventral, observe no lúmen a secreção granular PAS positiva. **F.** Região dorsal, na seta as vesículas de secreção, basófilas. **G.** Ácino da região dorsal com uma secreção mista, PAS positiva e basófila. **H.** Região ventral, observe que esta região apresenta a maioria dos núcleos com uma massa de cromatina condensada em um único ponto (seta clara) e alguns concentrada em dois pontos (seta escura). **I.** Região dorsal, na seta observe que as células secretoras da região dorsal apresentam a cromatina dispersa no núcleo, associada ao envelope nuclear. **J.** Estrutura geral do CGP, na seta observe que a cápsula de tecido conjuntivo reveste ambas as regiões do CGP. **K-L.** Região ventral e dorsal, respectivamente, note o grande número de fibras reticulares arranjadas em paralelo (setas claras), e as fibras de colágeno tipo I (setas escuras). (B, células basais; DR, região dorsal; Ep, epitélio; L, lúmen; VR, região ventral; S, células secretoras; Es, estroma).

FIGURA 3.

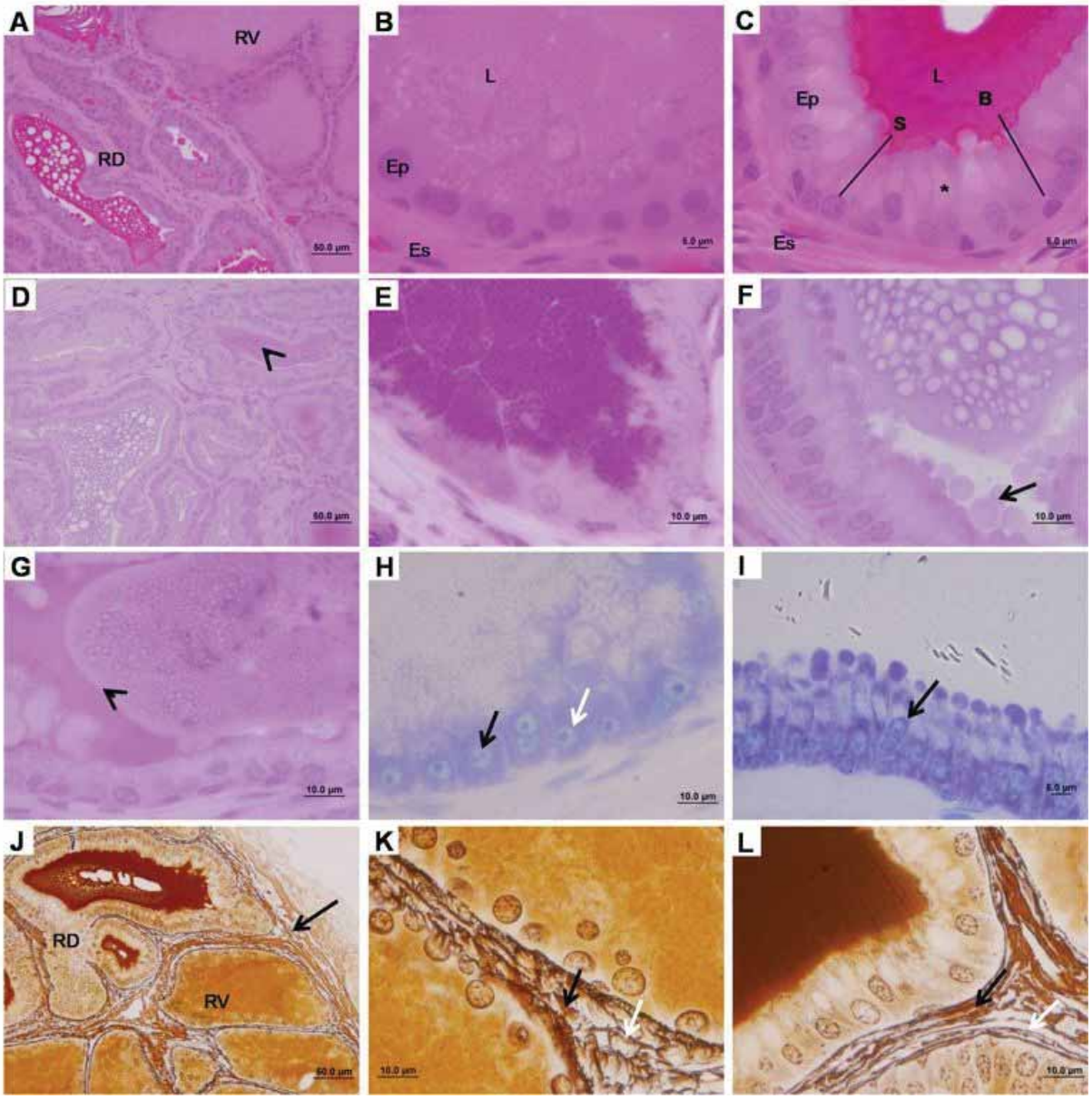
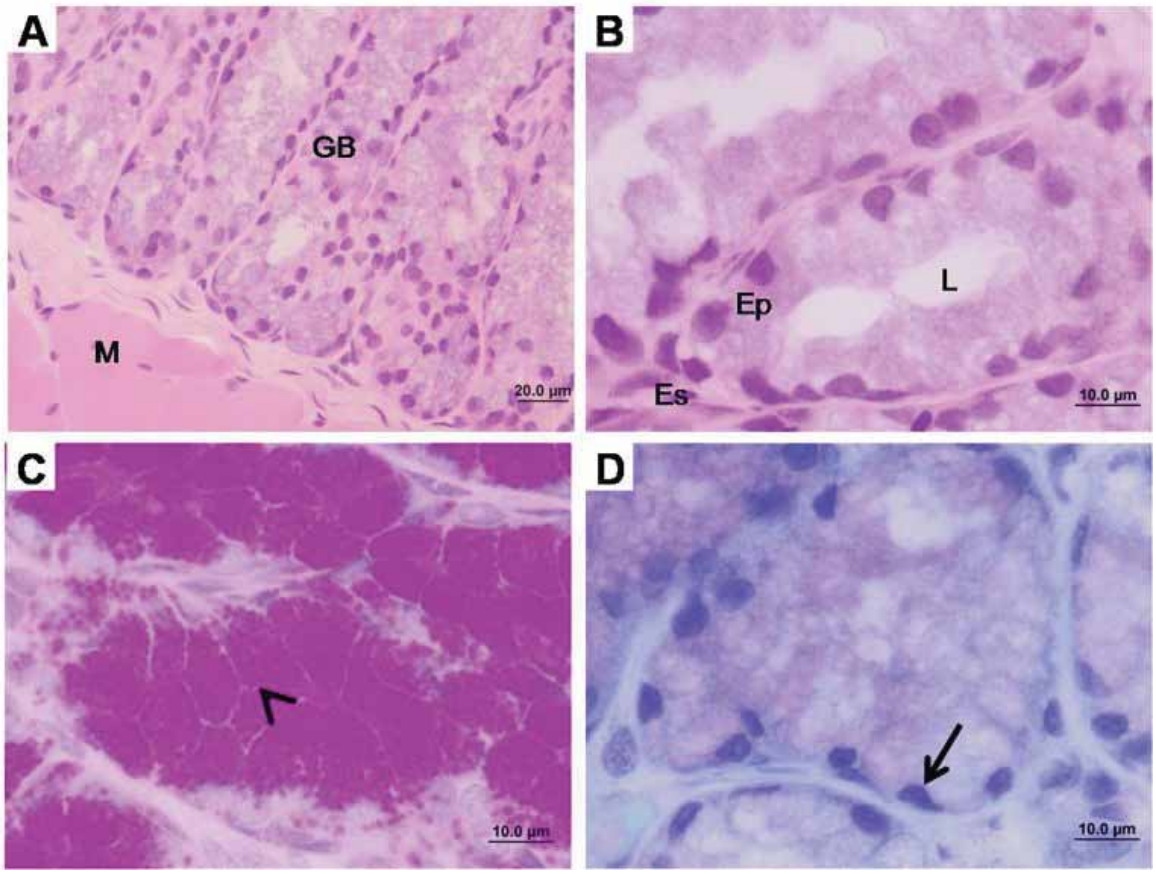


Figura 4. Secções histológicas da glândula bulbouretral de *Platyrrhinus lineatus* coradas com Hematoxilina-eosina (**A-B**), PAS (**C**) e Azul de toluidina (**D**). **A.** Estrutura geral, observe o tecido muscular que circunda parcialmente esta glândula. Em, (**B**) note o epitélio cilindrico simples da glândula, com núcleos basais. **C.** Observe na seta que secreção desta glândula é granular e PAS positiva. **D.** Note que a cromatina se encontra dispersa. (Ep, epitélio; Es, estroma; GB, glândula bulbouretral; L, lúmen).

FIGURE 4.



VI- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quanto à morfologia das GRAs

-As glândulas reprodutivas acessórias masculinas de ambas as espécies analisadas são compostas por: um par de glândulas bulbouretrais, um complexo glandular prostático e glândulas parauretrais dispersas na submucosa da uretra;

-O complexo glandular prostático, em ambas as espécies, está localizado logo abaixo da vesícula urinária circundando a uretra, e este é composto por duas regiões distintas, uma ventral e outra dorsal, as quais são diferentes nos níveis morfológico, histoquímico e histoenzimológico;

-Assim, quando comparamos as duas espécies podemos concluir que ambas apresentam o mesmo padrão morfofisiológico, o que indica uma conservação desta estrutura ao longo da filogenia de morcegos, mostrando que as GRAs de morcegos se assemelham quando comparamos grupos mais próximos, podendo usar a sua morfologia como caractere filogenético.

Quanto às análises sazonais...

-O complexo glandular prostático quando analisado sazonalmente, nos revelou uma grande variação de ambas as regiões glandulares, sendo esta mudança muito mais drástica na região ventral;

-O complexo glandular prostático e os testículos são regulados pela testosterona circulante, em um *feed back* positivo, já que o peso de ambos os órgãos e os níveis de testosterona aumentaram sincronicamente do outono até o verão;

-Cada região do CGP (ventral e dorsal) apresenta características únicas e distintas, como por exemplo: a região ventral apresenta o lúmen como componente glandular predominante, em contrapartida a dorsal apresenta o epitélio; a imunorreatividade à fosfatase ácida foi observada no epitélio de todos os ácinos da região dorsal, mas apenas no estroma da região ventral; além de que as duas regiões respondem diferentemente as variações do ambiente e da testosterona circulante;

-As avaliações realizadas na região ventral nos permitiram concluir que esta glândula é do tipo holócrina, fato este nunca descrito para GRAs de qualquer outro mamífero;

-Concluímos assim que *A. planirostris* apresenta um padrão de reprodução poliéstrico bimodal para espécimes do noroeste do estado de São Paulo e que esse padrão aparenta ser intimamente regulado por um aumento gradativo da taxa de testosterona circulante, que estimula ambas as regiões prostáticas a se prepararem para os dois períodos reprodutivos. Ainda confirmamos a natureza prostática da região dorsal e a holócrina da região ventral, fato este nunca antes descrito para a glândula prostática.

VII- REFERÊNCIAS

AGUIAR, M.S.; TADDEI, V.A. A newsletter of the neotropical section of the IUCN/SSC Chiroptera specialist group. **Chiroptera Neotropical.** Belo Horizonte, v. 1 (2), p. 24-34, 1995.

AUMULLER, G.; SEITZ, J. Protein secretion and secretory process in male accessory sex glands. **Int Ver Cytol.** v. 121, p. 127-231, 1990.

BEGUELINI, M.R.; MOREIRA, P.R.L.; FARIA, K.C.; MARCHESIN, S.R.C.; MORIELLE-VERSUTE, E. Morphological Characterization of the Testicular Cells and Seminiferous Epithelium Cycle in Six Species of Neotropical Bats. **J Morphol.** v. 270, p. 943-953, 2009.

BRASS, D.A. **Rabies in bats, Natural history and public health implications.** Ridgefiels: Livia Press. 1994, 352 p.

COOKE, O.S.; YOUNG, P., CUNHA, G.R. Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. **Endocrinology.** v. 128, p. 2867-2873, 1991.

CRICHTON, E. G.; KRUTZSCH, P. H. **Reproductive biology of bats.** London: Academic Press, 2000. 510 p.

CUNHA, G.R.; DONJACOUR, A.A.; COOKE, P.S.; MEE, S.; BIGSY, R.M.; HIGGINS, S.J.; SUGIMURA, Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocr Rev.** v. 8, p. 338-362, 1996.

DA SILVA, S.S.P.; GUEDES, P.G.; PERACCHI, A.L. Levantamento preliminar dos morcegos do Parque Nacional de Ubajara (Mammalia, Chiroptera), Ceará, Brasil. **Rev Bras Zool.** v. 18, p. 139–144, 2001.

DAVIS, W. B.; DIXON, J. R. Activity of bats in a small village clearing near Iquitos, Peru. **J Mammal.** v. 57, p. 747–749, 1976.

DOUNJACOUR, A.A.; CUNHA, G.R. The effect of androgen deprivation on branching morphogenesis in the mouse prostate. **Dev. Biol.** v.128, p. 1-14, 1988.

EISENBERG, J.F.; REDFORD. K.H. **Mammals of the Neotropics, The Central Neotropics.** Chicago, The University of Chicago Press, v. 3, 1999, 609p.

ENCARNAÇÃO, J.A.; DIETZ, M.; KIERDORF, U. Reproductive condition and activity pattern of male Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*) in the summer habitat. **Mamm Biol.** v. 69, p. 163-172, 2004.

FENTON, M.B. **Bats.** New York: Facts On File, Inc., 1992, 207p.

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.

GRAHAM, G.L. **Seasonality of reproduction in Peruvian bats.** Pp. 173–181. In Studies in Neotropical mammalogy, essays in honor of Philip Hershkovitz (B. D. Patterson and R. M. Timm, eds.). Fieldianna: Zoology (New Series) v. 39, p. 1–506, 1987.

GREGORY, W.K. The order of mammals. **Bulletin of American Museum of Natural History.** Nova Iorque, v. 27, p. 1-524, 1910.

HAND, S.J. First Tertiary molossid (Microchiroptera: Molossidae) from Australia: Its phylogenetic and biogeografic implications. **Memoirs of the Queensland Museum. Queensland.** v. 28, p. 175-192, 1990.

HAPPOLD, D.C.; HAPPOLD, M. Reproduction of Angola free-tailed bats (*Tadarida condylura*) and little free-tailed bats (*Tadarida pumila*) in Malawi (Central Africa) and elsewhere in Africa. **J Reprod Fertil.** v. 85, p. 133-149, 1989.

HAYASHI, N.; SUGIMURA, Y.; KAMAMURA, J.; DONCAJOUR, A. A.; CUNHA, G. R. Morphological and fuctional hetereogeneity in the rat prostatic gland. **Biol Reprod.** v. 45, p. 308-321, 1991.

HAYWARD, S.W.; ROSEN, M.A.; CUNHA, G.R. Stromal-epithelial interations in the normal and neoplasic prostate. **Br J Urol.** v. 79 (Suppl. 2), p. 18-26, 1997.

HEIDEMAN, P.D.; DEORAJ, P.; BRONSON, F.H. Seasonal reproduction of a tropical bat, *Anoura geoffroyi*, in relation to photoperiod. **J Reprod Fertil.** v. 96, p. 765-773, 1992.

HOOD, C.S.; SMITH, J.D. Sperm storage in a tropical nectar-feeding bat, *Macroglossus minimus* (Pteropodidae). **J Mammal.** v. 70, p. 404-406, 1989.

KRUTZSCH, P. H.; NELLIS, D. W. Reproductive anatomy and cyclicity of the male *Brachyphylla cavernarum* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Acta Chiropterologica.** v. 8 (2), p. 497-507, 2006.

KRUTZSCH, P.H. Reproduction of the canyon bat, *Pipistrellus hesperus*, in Southwestern United States. **Am J Anat.** v. 143, p. 163-200, 1975.

KRUTZSCH, P.H.; CRICHTON, E.G. Reproductive biology of the male little mastiff bat, *Mormopterus planiceps* (Chiroptera: Molossidae), in Southeast Australia. **Am J Anat.** v. 178, p. 352-368, 1987.

KRUTZSCH, P.H.; WATSON, R.H.; LOX, C.D. Reproductive biology of the male leaf-nosed bat, *Macrotus waterhousii* in Southwestern United States. **Anat Rec.** v. 184, p. 611-635, 1976.

KUROHMARU, M.; SARUWATARI, T.; KIMURA, J.; MUKOHYAMA, M.; WATANABE, G.; TAYA, K.; HAYASHI, Y. Seasonal changes in spermatogenesis of Japanese Lesser Horseshoe Bat, *Rhinolophus cornutus* from a morphological viewpoint. **Okajimas Folia Anat. Jpn.** v. 79, p. 93-100, 2002.

LEE, J.H. Cell differentiation and ultrastructure of the seminiferous epithelium in *Myotis macrodactylus*. **Kor J Elec Micro.** v. 33(1), p. 25-39, 2003.

McGUCKIN, M.A.; BLACKSHAW, A.W. Cycle of the seminiferous epithelium in the grey-headed fruit bat, *Pteropus poliocephalus*. **Aust J Biol Sci.** v. 40, p. 203-210, 1987.

MOKKAPATI, S.; DOMINIC, C.J. Sites of production of fructose and citric acid in the accessory reproductive glands of three species of male chiropterans. **Biol Reprod.** v. 14(5), p. 627-9, 1976.

MORIGAKI, T.; KUROHMARU, M.; KANAI, Y.; MUKOHYAMA, M.; HONDO, E.; YAMADA, J.; AGUNGPRIYONO, S.; HAYASHI, Y. Cycle of the seminiferous epithelium in the Java Fruit Bat (*Pteropus vampyrus*) and the Japanese Lesser Horseshoe Bat (*Rhinolophus cornutus*). **J Vet Med Sci.** v. 63(7), p. 773- 779, 2001.

NIKAIDO, M.; HARADA, M.; CAO, Y.; HASEGAWA, M.; OKADA, N. Monophyletic origin of the order chiroptera and its phylogenetic position among Mammalia, as inferred from the complete sequence of the mitochondrial DNA of a japanese megabat, ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*). **J Mol Evol.** Nova Iorque, 51: 318-328, 2000.

NOVACEK, M.J. Aspects of morphology of the cochlea in microchiropteran bats: an investigation of character transformation. **Bulletin American Museum of Natural History.** Nova Iorque, v. 206, p. 84-100, 1991.

NOWAK, R.M. **Walker's Mammals of the World.** Baltimore, Johns Hopkins University, v. 1, 1999, 836p.

PERACCHI, A.L.; DE ALBUQUERQUE, S.T. Lista provisória dos quirópteros dos estados do Rio de Janeiro e Guanabara, Brasil (Mammalia, Chiroptera). **Rev Brasil Biol.** v. 31, p. 405-413, 1971.

PERACCHI, A.L.; LIMA, I.P.; REIS, N.R.; NOGUEIRA, M.R.; HORTÊNCIO-FILHO, H. **Ordem Chiroptera.** In: Mamíferos do Brasil. Org.: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. Londrina: Nélio R. dos Reis. p. 153-230, 2006.

PETTIGREW, J.D. Flying primates? Megabats have the advanced pathway from eye to midbrain. **Science.** Washington, v. 231 (4743), p. 1304-1306, 1986.

PIERSON, E.D. **Molecular systematics of the Microchiroptera: higher taxon relationships and biogeography.** Ph.D. dissertation, University of California, Berkeley, 1986.

PRICE, D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. **Natl Cancer lnst Monogr.** v. 12, p. 1-27, 1963.

PRICE, D.; ORTIZ, E. In "Organogenesis". R. L. Dehaan and H. Ursprung, eds. Holt, New York. pp. 629-652. *Apud* CUNHA, G.R. Epithelial-stromal interactions in development of the urogenital tract. **lnt Rev Cytol.** v. 47, p. 137-194, 1976.

RACEY, P.A. The prolonged storage and survival of spermatozoa in Chiroptera. **J Reprod Fertil.** v. 56, p. 391-402, 1979.

RACEY, P.A. The viability of spermatozoa after prolonged storage by male and female European bats. **Period Biol.** v. 75, p. 201-205, 1973.

RACEY, P.A. Viability of bat spermatozoa after prolonged storage in the epididymis. **J. Reprod Fertil.** v. 28, p. 309-311, 1972.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Morcegos do Brasil.** Londrina: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. 2007. 253 p

ROCHEL, S. S.; BRUNI-CARDOSO, A.; TABOGA, S. R.; VILAMAIOR, P. S. L.; GÓES, R. M. Lobe Identity in the Mongolian GerbiL Prostatic Complex: A New Rodent Model for Prostate Study. **Anat Rec.** v. 290, p. 1233-1247, 2007.

ROSAI, J. Male reproductive system. *In*: **Ackerman's Surgical Pathology.** 8ed, ROSAI, J. eds. Mosby-Year, St. Louis-USA, VoI. I, p.1221-1256, 1996.

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

SCATENA, M. P. **Análise molecular em morcegos do gênero *Artibeus* Leach, 1821 (Chiroptera, Phyllostomidae) a partir de espécimes depositados em coleção científica.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – São José do Rio Preto, 2006, 60 f.

SHARIFI, M.; GHORBANI, R.; AKMALI, V. Reproductive cycle in *Pipistrellus kuhlii* (Chiroptera, Vespertilionidae) in western Iran. **Mammalia.** v. 68(4), p. 323-327, 2004.

SIMMONS, N. B. A reprasial of interfamilial relationships of bats. p.3-26. In: KUNZ, T.H.; RACEY, P.A. (Eds), **Bats: Phylogeny, Morphology, Echolocation and Conservation Biology.** Smithsonian Institution Press, London, 1998, 365p.

SIMMONS, N. B. **Order Chiroptera.** In: WILSON, D .E.; REEDER, D. M. (Eds). Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference. 3 ed. v. 1. Baltimore: Johns Hopkins University Press, p. 312-529, 2005.

SINGH, UP; KRISHNA, A. 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.** v. 287(1), p.54-61, 2000.

SINGWI, M.S.; LALL, S.B. Spermatogenesis in the non-scrotal bat – *Rhinopoma kinneari* Wroughton (Microchiroptera: Mammalia). **Acta Anat.** v. 116, p. 136-145, 1983.

SMITH, J.D. Chiropteran evolution. 1976. **Special Publications, The Museum, Texas Tech University.** Austin, 10: 49-69.

SWAMI, D.R.; LALL, S.B. Histoenzymological comparison of the prostate gland of sexually 'quiescent' and 'active' *Taphozous melanopogon melanopogon* Temmnick (Microchiroptera: Mammalia). **Acta Anat.** v. 113(2), p. 128-34, 1982.

TADDEI, V. A. **Phyllostomidae da Região Norte-ocidental do Estado de São Paulo.** Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – São José do Rio Preto, São Paulo, 1973, 249 f.

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

THOMSON, A.A.; FOSTER, B.A.; CUNHA, G.R. Analyses of growth factor and receptor mRNA levels during development of the rat seminal vesicle and prostate. **Development.** v. 124, p. 2431-2439, 1997.

VAN DEN BUSSCHE, R. A.; HOOFER, S. R. Phylogenetic relationships among recent chiropteran families and the importance of choosing appropriate out-group taxa. **J Mammal.** v. 85 (2), p. 321-330, 2004.

VAN DER MERWE, M.; RAUTENBACH, I.L. Reproduction in the rusty bat, *Pipistrellus rusticus*, in the northern Transvaal bushveld, South Africa. **J Reprod Fertil.** v. 89, p. 537-542, 1990.

VAN VALEN, T. A. **The evolution of bats. Evolutionary Theory.** v. 4, p. 104-121, 1979.

WILLIG, M. R. **A comparative ecological study of Caatingas and Cerrado chiropteran communities: composition, structure, morphometrics, and reproduction.** Ph.D. dissertation, University of Pittsburg, Pennsylvania, 324 pp, 1982.

WILLIG, M. R. Composition, microgeographic variation, and sexual dimorphism in Caatingas and Cerrado bat communities from northeast Brazil. **Bulletin of Carnegie Museum of Natural History.** v. 23, p. 1–131, 1983.

WILLIG, M. R. Reproductive patterns of bats from Caatingas and Cerrado biomes in northeast Brazil. **J Mammal.** v. 66, p. 668–681, 1985.

WILSON, D.E.; FINDLEY, J.S. Spermatogenesis in some Neotropical species of *Myotis*. **J. Mammal.** v. 52(2), p. 420-426, 1971.