



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Histomorfologia da glândea peniana e do báculo de morcegos molossídeos e vespertilionídeos: uma abordagem comparativa (Chiroptera, Mammalia)

Manuela Tosi Comelis

MESTRADO



PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

Biologia
Estrutural

Manuela Tosi Comelis

Histomorfologia da glânde peniana e do báculo de morcegos
molossídeos e vespertilionídeos: uma abordagem comparativa
(Chiroptera, Mammalia)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos 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.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Eliana Morielle
Versute
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Maíra
Góes

São José do Rio Preto
2015

Comelis, Manuela Tosi

Histomorfologia da glânde peniana e do báculo de morcegos molossídeos e vespertilionídeos: uma abordagem comparativa (Chiroptera, Mammalia) / Manuela Tosi Comelis. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2015.

123 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Eliana Morielle Versute

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

Palavra-chave 1. Morfologia peniana, 2. Osso peniano
Palavra-chave. 3. Baculum Palavra-chave. 4. Molossidae,
Palavra chave. 5. Vespertilionidae. I. Morielle-Versute, Eliana. III.
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto
de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - ERRADA

Manuela Tosi Comelis

Histomorfologia da glânde peniana e do báculo de morcegos
molossídeos e vespertilionídeos: uma abordagem comparativa
(Chiroptera, Mammalia)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos 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.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Eliana Morielle Versute
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

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

Prof^a. Dr^a. Sandra Regina de Carvalho Marchesin
UNIP- São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
20 de fevereiro de 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, por estar sempre à frente do meu caminho indicando sempre o melhor a seguir.

Aos meus pais por todas as oportunidades, pelo apoio, torcida e carinho e por sempre me darem bons exemplos a seguir.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Eliana Morielle Versute, por compartilhar seus conhecimentos e forma de trabalho. Pela orientação ao longo desses anos e pela paciência sempre.

Pela co-orientação da Prof^a Dr^a Rejane Maíra Góes, que teve grande importância para o desenvolvimento do trabalho.

Ao suporte técnico concedido pelo Luiz Roberto Falleiros Jr. e pelo Jorge Buchdid.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga pela disponibilização dos recursos de seu laboratório.

Pela ajuda do pessoal do LMM, em especial a Cintia, que sempre esteve disposta a solucionar minhas dúvidas.

As meninas do lab, Lari, Di e Fer, pelo companheirismo e diversão compartilhadas. Por tornarem o ambiente de trabalho um lugar mais leve, pelo compartilhamento de experiências e pelos almoços japoneses.

Ao meu namorado Vinícius, pelo companheirismo e paciência sempre, mesmo nos momentos mais difíceis. Por todo o incentivo, torcida e por nunca ter me deixado desistir. E finalmente pelo exemplo de profissional que me dá sempre.

Aos meus amigos Josi, Kuxt, Molina, Van, Deniel e Mah por todos esses anos de amizade pelo carinho e ajuda sempre.

Aos amigos do basquete, da Física e de turma que tornaram o IBILCE mais divertido.

Ao Programa de Pós-graduação em biologia animal pelo suporte.

Ao apoio financeiro concedido pela CAPES e pela FAPESP.

***Os que desprezam os pequenos
acontecimentos nunca farão
grandes descobertas. Pequenos
momentos mudam grandes rotas.***

Augusto Cury

Sumário

RESUMO.....	- 5 -
ABSTRACT	- 6 -
I. INTRODUÇÃO GERAL.....	- 7 -
II. OBJETIVOS	- 11 -
III. REFERÊNCIAS	- 12 -
IV. CAPÍTULO 1	- 15 -
Penile histomorphology of Argentine Brown Bat <i>Eptesicus furinalis</i> (Vespertilionidae, Chiroptera)	
V. CAPÍTULO 2	- 35 -
Análise comparativa da morfologia peniana em espécies de morcegos dos gêneros <i>Cynomops</i>, <i>Molossops</i> e <i>Neoplatymops</i> (Molossidae, Chiroptera, Mammalia)	
VI. CAPÍTULO 3	- 59 -
Análise da morfologia da glândula e do báculo das espécies <i>Molossus molossus</i>, <i>Molossus rufus</i> e <i>Nyctinomops laticaudatus</i> (Chiroptera: Molossidae)	
VII. CAPÍTULO 4	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
Uma abordagem morfológica sobre a glândula peniana e o báculo em <i>Eumops</i> (Molossidae: Chiroptera)	
VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS	- 109 -
IX. REFERÊNCIAS.....	- 112 -

RESUMO

A morfologia da glânde peniana de 11 espécies de morcegos molossídeos e de uma espécie de morcego vespertilionídeo foi analisada histomorfologicamente após os procedimentos de diafanização, cortes histológicos e colorações por HE e Tushmann's blue. De maneira geral o pênis das espécies analisadas apresenta três tecidos eréteis, sendo dois principais, o tecido cavernoso e o tecido cavernoso difuso e outro menos desenvolvido, o tecido esponjoso da uretra. Os dois primeiros são bem desenvolvidos, compondo a maior parte da massa peniana. Diferenças na quantidade e na localização desses tecidos foram observadas nas espécies em todos os gêneros. Com exceção de *E. furinalis* e das espécies de *Eumops*, as demais apresentaram projeções epidérmicas espiniformes no revestimento externo do pênis, as quais variam pouco em morfologia, diferenciando no tamanho e na distribuição pela glânde. O báculo está presente no interior da glânde nas espécies dos gêneros *Molossus*, *Nyctinomops* e *Eumops*, onde variou significativamente na morfologia e tamanho, e ausente nas espécies dos gêneros *Cynomops*, *Molossops* e *Neoplatimops*. A variabilidade observada no báculo evidencia sua importância como um caráter taxonômico, e indica que as semelhanças morfológicas são observadas nas espécies congêneras. Os resultados evidenciaram um grande potencial por parte da glânde peniana do báculo como caracteres taxonômicos, principalmente em relação ao nível de família e gênero, e também são importantes para distinção de espécies. Em conclusão, os dados do presente estudo geraram informações inéditas sobre a macro e a micro anatomia da glânde peniana em Chiroptera, as quais poderão ser úteis em estudos taxonômicos comparativos e sobre aspectos reprodutivos do grupo que não foram ainda avaliados.

Palavras-chave: Morfologia peniana, Osso peniano, Baculum, Molossidae, Vespertilionidae

ABSTRACT

*The glans penis morphology of eleven molossid and one vespertilionid species of bats were analyzed histomorphologically after diaphanization procedures, histological sections and hematoxylin-eosin and Tushmann's blue staining. In general the penis of the analyzed species has three erectile tissues, with two main, the cavernous tissue and diffuse cavernous tissue and other one with lesser development, the spongy tissue of the urethra. The two first are well developed, making the most part of penile mass. Differences in the number and localization of these tissues were observed in species of genera. Except for *E. furinalis* and species of *Eumops*, the others showed spiniform epidermal projections in the outer covering of the penis, which vary little in morphology, differing in size and distribution over the glans. The baculum is present inside the glans on the species of the genus *Molossus*, *Nyctinomops* and *Eumops* where varied significantly in morphology and size, and were absent in species of the genera *Cynomops*, *Molossops* and *Neoplatimops*. The variability observed in the baculum shows its importance as a taxonomic character, and indicates that the morphological similarities are observed in congeneric species. The results demonstrated a great potential exhibited by the glans penis and baculum as taxonomic characters, mainly to the family and genus level, but also important for species distinction. In conclusion, the present study generated new information about the macro and micro anatomy of the glans penis in Chiroptera, which may be useful in future comparative and taxonomic studies on reproductive aspects of the group that have not been evaluated yet.*

Keywords: Penis morphology, os penis, Baculum, Molossidae, Vespertilionidae.

I. INTRODUÇÃO GERAL

A ordem Chiroptera, atualmente com cerca de 1113 espécies reconhecidas, tem no Brasil grande representação, onde os registros relacionam 167 espécies, agrupadas em 64 gêneros e nove famílias, das quais seis ocorrem somente no Novo Mundo (Costa et al., 2005; Simmons, 2005 a,b; Reis et al., 2007; Peracchi et al., 2011). Essa alta diversidade deve-se principalmente às famílias Phyllostomidae, Molossidae e Vespertilionidae, que são as famílias que agregam o maior número de espécies entre os Chiroptera e, portanto, grande variação e complexidade (Koopman, 1993; Simmons, 2005 a,b).

A família Molossidae é a quarta em número de espécies, e seus representantes distribuem-se nas zonas tropicais e temperadas dos hemisférios Oriental e Ocidental, constituindo um grupo distinto de quirópteros, com adaptações morfológicas e fisiológicas para o voo rápido e eficiente manobrabilidade (Vaughan, 1966). Apesar de sua ampla distribuição, informações detalhadas sobre os diferentes táxons da família são ainda escassas, o que dificulta, principalmente, as interpretações evolutivas e formulações de relacionamento entre os táxons.

Atualmente são reconhecidas para a família 16 gêneros e 110 espécies (Freeman, 1981; Nowak, 1999; Gregorin e Taddei, 2002; Simmons, 2005 a, b; Eger, 2007; Baker et al., 2009; González-Ruíz et al., 2011). No Brasil há registros de ocorrência de 28 espécies representantes de oito gêneros (Gregorin e Taddei, 2002; Peracchi et al., 2011).

Dois clados são atualmente reconhecidos dentro Molossidae: Tomopeatinae e Molossinae (Sudman et al., 1994; Simmons, 1998; Simmons e Geisler, 1998; Simmons, 2005a). Tomopeatinae é monotípico, contendo apenas *Tomopeas ravus*, uma espécie encontrada apenas no Peru. Todos os outros molossídeos pertencem à subfamília Molossinae.

As relações filogenéticas dentro Molossidae foram investigadas usando morfometria (Freeman, 1981), características morfológicas distintas (Legendre, 1984, 1985; Gregorin, 2000), isoenzimas (Sudman et al, 1994), sequências do gene do citocromo b (Sudman et al., 1994) e, mais recentemente, sequências de genes mitocondriais e nucleares (Ammerman et al., 2012).

Os estudos de Jones et al. (2002), através da análise combinada de 105 estimativas de relacionamentos filogenéticos de diferentes gêneros e espécies de Chiroptera, deram suporte à proposta de Freeman (1981) para Molossidae, que reconheceu dois clados de molossídeos, um constituído pelos morcegos semelhantes à *Tadarida* e outro pelos morcegos semelhantes à *Mormoops*. No primeiro clado está incluída a maioria dos gêneros de Molossidae (oito). Apesar de grandiosa, a análise não resolveu todos os interrelacionamentos genéricos e específicos. Diferente deste, nos estudos recentes de Ammerman et al. (2012), poucas foram as concordâncias dos resultados, especialmente com as hipóteses embasadas em análises morfológicas. Na proposição desses autores, diferente de Gregorin (2000) que identificou duas tribos, eles reconheceram quatro tribos, Molossini, Tadarini, Cheiromelini e Mormopterini, sendo a Molossini constituída pelos táxons do Novo Mundo, ou seja, *Molossus*, *Eumops*, *Molossops*, *Cynomops*, *Neoplaticomops*, *Nyctinomops* e *Promops*, cujo clado teve significativo suporte de três dos quatro genes analisados.

As filogenias e classificações derivadas desses estudos são em grande parte incongruentes, mas a maioria concorda que Molossinae seja monofilético (Simmons, 1998; Simmons e Geisler, 1998; Ammerman et al., 2012).

Outra família dentro de Chiroptera que possui grande diversidade e número de espécies é a família Vespertilionidae. Esta é a mais representativa e com maior distribuição geográfica de Vespertilionoidea. (Vizotto e Taddei, 1973). Constitui-se de 48 gêneros e 407 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do globo (Nowak, 1999; Simmons, 2005). Dentro dessa família encontra-se o gênero *Eptesicus*, representado por 24 espécies no mundo (Simmons, 2005), das quais seis ocorrem no Brasil (Peracchi et al., 2011).

O reconhecimento das espécies de *Eptesicus* presentes no Brasil é difícil, pois são simpátricas e, muitos dos caracteres morfológicos utilizados na taxonomia do gênero apresentam sobreposição nas espécies, dificultando assim, a identificação precisa quando são avaliados poucos exemplares. Por essa razão, vários estudos foram dedicados à caracterização dos espécimes reconhecidos como *Eptesicus* sob os mais variados enfoques ou abordagens: morfológica, molecular, ecológica, entre outras (Cabrera, 1958; Simmons e Voss, 1998; Barquez et al., 1999; Reis et al., 2007).

Em decorrência dessa complexidade dos padrões de variação intraespecífica, associados ou não à localização geográfica, o sucesso na taxonomia de Chiroptera tem exigido dos pesquisadores a utilização de múltiplos conjuntos de caracteres nas descrições taxonômicas das populações e espécies.

Uma condição morfológica que se mostrou útil na caracterização de alguns táxons de Chiroptera é a presença e a variação morfológica do báculo ou osso penial (os *pênis* ou *baculum*). O nome *baculum* foi proposto por Thomas (1915), o primeiro mastozoologista a reconhecer o seu valor como um caráter taxonômico. Ele ocorre em pelo menos cinco ordens de mamíferos: Insetivora, Chiroptera, Primates, Carnivora e Rodentia. Recentemente tem reassumido o papel importante que possui como uma característica morfológica distintiva na caracterização dos táxons de mamíferos e na biologia reprodutiva dos grupos (Patterson e Thaeler Jr, 1982).

O desenvolvimento do osso peniano é altamente variável entre as espécies e seu valor adaptativo é ainda controverso (Burt, 1960, Bolton et al., 1996). Apesar disso, a alta variabilidade presente dentro das famílias, e a observação de que o crescimento do báculo atinge uma assíntota no final da vida reprodutiva (Miller et al., 1998), indicam que, pelo menos em algumas espécies, a seleção pode operar sobre o desenvolvimento e manutenção do báculo, o que o torna uma característica de importância evolutiva e, portanto, taxonômica. Em morcegos o báculo é geralmente curto, situado na glândula e

dorsal em relação à uretra, mas, em algumas espécies pode alcançar até 75% do comprimento do pênis (Sinha, 1976).

A glande peniana, assim como o báculo é um caráter de grande variação dentro de Mammalia, tendo sido utilizada para a caracterização de diversos táxons de Rodentia (Lessa e Cook, 1989) e carnívora (Burt, 1960; Long e Frank, 1968; Long, 1969; Baryshnikov et al., 2003). Matthews, (1937; 1942) descreveu dois tipos de glande para os microchiroptera: as simples que possuem prepúcio expesso e vascular e as glandes com morfologia mais complexa, com prepúcio fino e retrátil. Os vespertilionídeos estão agrupados no primeiro tipo enquanto que os molossídeos estão agrupados no segundo. (Figura 1)

Embora a morfologia da glande peniana e do báculo apresente importância taxonômica indiscutível, poucos estudos em quirópteros têm utilizado essas características como ferramenta para propor relações entre os táxons de morcegos (Ryan, 1991 a, b). Isto se deve ao fato de que grande parte da elevada variação interespecífica do pênis de quirópteros não foi completamente estudada (Ryan, 1991a,b).

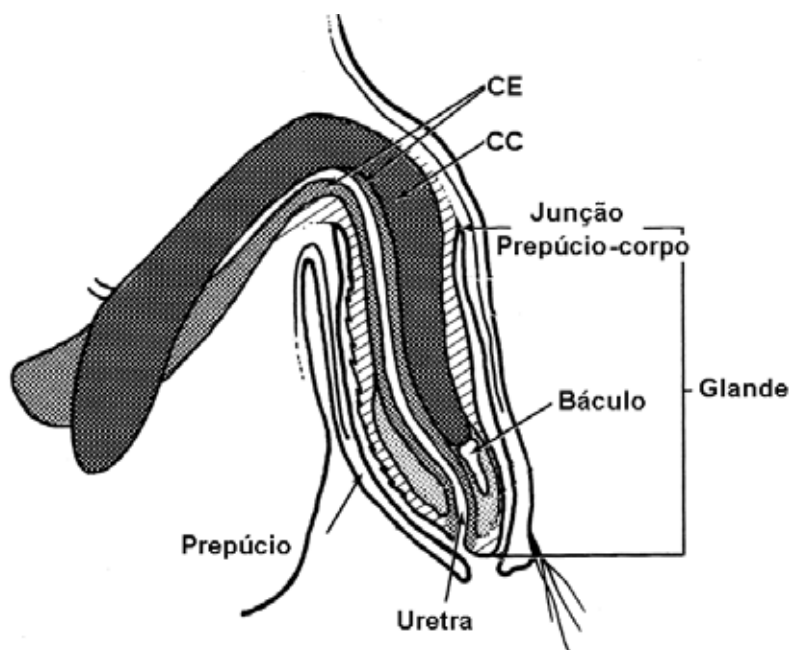


Figura 1: Esquema do pênis em Molossídeos. Modificada de Ryan, 1991.

II. OBJETIVOS

Sabendo da importância do estudo dessas características e da problemática existente na taxonomia das famílias Molossidae e Vespertilionidae o presente estudo teve por objetivos:

- caracterizar histomorfologicamente o pênis e o báculo de uma espécie de Vespertilionidae: *Eptesicus furinalis*,

- caracterizar histomorfologicamente o pênis e o báculo de 11 espécies de Molossidae, estas representantes de seis gêneros: *Cynomops abrasus*, *C. planirostris*, *Eumops auripendulus*, *E. glaucinus*, *E. perotis*, *E. bonariensis*, *Molossops temminckii*, *Neoplatymops matogrossensis*, *Nyctinomops laticaudatus*, *Molossus molossus* e *M. rufus*, dando ênfase para a glande e o osso peniano (báculo),

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

Capítulo 1- Manuscrito: “**Penile histomorphology of Argentine Brown Bat *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae, Chiroptera)**”.

Capítulo 2 - Manuscrito: “**Análise comparativa da morfologia peniana em espécies de morcegos dos gêneros *Cynomops*, *Molossops* e *Neoplatymops* (Molossidae, Chiroptera, Mammalia)**”.

Capítulo 3 - Manuscrito: “**Análise da morfologia da glande e do báculo das espécies *Molossus molossus*, *Molossus rufus* e *Nyctinomops laticaudatus* (Chiroptera, Molossidae)**”.

Capítulo 4 – Manuscrito: **“Uma abordagem morfológica sobre a glândula peniana e o báculo em *Eumops* (Molossidae: Chiroptera)”**.

III. REFERÊNCIAS

- Ammerman, L. K.; Lee, D. N.; Tipps, T. M. 2012. First molecular phylogenetic insights into the evolution of free-tailed bats in the subfamily Molossinae (Molossidae, Chiroptera). *Journal of Mammalogy*. 93:12-28.
- Baker, R. J.; McDonough, M. M.; Swier, V. J.; Larsen, P. A.; Carrera, J. P.; Ammerman, L. K. 2009. New species of bonneted bat, genus *Eumops* (Chiroptera: Molossidae) from the lowlands of western Ecuador and Peru. *Acta Chiropterologica*. 11:1-13.
- Baryshnikov, G. F.; Olaf, R. P. Bininda-Emonds; Abramov, A. V. 2003. Morphological variability and evolution of the baculum (os penis) in mustelidae (carnivora). *Journal of Mammalogy*. 84(2): 673-690.
- Barquez, R. M.; Mares, M. A.; Braun, J. K. 1999. The bats of Argentina. *Special Publications of Museum Texas Tech University*. 42: 1-275.
- Bolton, L.A.; Camby, D.; Boomker, J. 1996. Aberrant migration of *Ancylostoma caninum* to the os penis of a dog. *Journal of South African Veterinary Association*. 67:161-162.
- Burt, W.H. 1960. Bacula of North American mammals. *University of Michigan Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology*. 113: 1-75.
- Cabrera, A. 1958. Catálogo de los mamíferos de América Del Sur. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”*. 4:1-307.
- Costa, L. P.; Leite, Y. L. R.; Mendes, S. L.; Ditchfield, A. D. 2005. Conservação de mamíferos no Brasil. *Megadiversidade*. 1: n. 1.
- Eger, J.L. Family Molossidae P. Gervais, 1856. In *Mammals of South America. Vol. 1, Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*. 2007. P. 399-440. (A.L. Gardner, ed). The University Chicago Press, Chicago, xx+669 pp.
- Freeman, P. W. 1981. A multivariate study of the family Molossidae (Mammalia, Chiroptera): morphology, ecology, evolution. *Fieldiana Zoology*. 7: 1-105.

- González-Ruíz, N.; Ramirez-Pulido, J.; Arroyo-Cabrales, J. A new species of mastiff bat (Chiroptera: Molossidae: *Molossus*) from Mexico. 2011. *Mammalian Biology*. 76:461-469.
- Gregorin, R. *Filogenia de Molossidae Gervais, 1985 (Mammalia: Chiroptera)*. 2000. 247 f. Tese (Doutor em Ciência) - Universidade de São Paulo.
- Gregorin R.; Taddei V.A. 2002. Chave artificial para a identificação de molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). *Journal of Neotropical Mammalogy*. 9: 13-32
- Hosken, D.J.; Jones, K. E.; Chipperfield, K.; Dixson, C.A. 2001. Is the bat os penis sexually selected? *Behavioural Ecology Sociobiology*. 50:450-460.
- Jones, K. E.; Purvis, A.; Mclarnon, A.; Bininda-Emonds, O. R. P.; Simmons, N. B. 2002. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). *Biological Reviews*. 77: 223-259.
- Koopman, K.F. 1993. *Order Chiroptera*. In: Wilson, D.E.; Reeder, D.M. *Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 2^a ed. Washington, Smithsonian Inst. Press. p.137-241.
- Legendre, S. 1984. Identification de deux sous-genres fossils et comprehension phylogénique du genre *Mormopterus* (Molossidae, Chiroptera). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. Série 2, 298:715–720.
- Legendre, S. 1985. Molossidae (Mammalia: Chiroptera) cénozoïques de l'Ancien et du Nouveau Monde: statut systématique; integration phylogénique de données. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Abhandlungen* 170:205–227.
- Lessa, E.P. and J.A. Cook. 1989. Interspecific variation in penial characters in the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Journal of Mammalogy*. 70: 856-860.
- Long, C. A. 1969. Gross morphology of the penis in seven species of the mustelidae. *Mus. Nat. Hist, and Dept. Biology, Wisconsin State Univ. Stevens Point, Wis.*. 1^o edição.v 33.
- Long, C.A.; Frank, T., 1968. Morphometric variation and function in the baculum, with comments on correlation of parts. *Journal of Mammalogy*. 49:32–43.
- Matthews, L. H., 1937. The form of the penis in the British rhinolophid bats, compared with that of the vespertilionid bats. *The Transactions of the Zoological Society of London*. 23:213-223.
- Matthews, L. H., 1942. Notes on the genitalia and reproduction of some African bats. *Journal of Zoology, Proc. Zool. Soc. London Ser. B*. 3:289–346.

- Miller, E. H.; Stewart, A. R. J.; Stenson, G. B. 1998. Bacular and testicular growth, allometry, and variation in the harp seal (*Pagophilus groenlandicus*). *Journal of Mammalogy*. 79:502–513.
- Nowak, R. M. 1999. *Walker's mammals of the world*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. 6th edition, 1:253-470.
- Patterson, B. D.; Thaeler, JR. C. 1982. The mammalian baculum: hypotheses on the nature of bacular variability. *Journal of Mammalogy*. 63 1:1-15.
- Peracchi, A. L.; Lima, I. P.; Reis, N. R.; Nogueira, M. R.; Ortêncio Filho, O. Ordem Chiroptera. 2011. In *Mamíferos do Brasil*. 2ªEd. p. 155- 217. (Reis, N., Peracchi, A.L., Pedro, W.A., Lima, I.P. Editores), Londrina, 439 p.
- Reis, N. R.; Peracchi, A. L.; Pedro, W. A.; Lima, I. P. (Eds). 2007. *Morcegos do Brasil*. Londrina. 253p.
- Ryan, J. M., 1991a. Comparative morphology of the glans penis in *Molossus*, *Promops* and *Eumops* (Chiroptera: Molossidae). In Griffiths, T.A., Klingener, D. (Eds.), Contributions to mammalogy in honor of Karl F. Koopman. *Bulletin of American Museum of Natural History*. 206, 122-137.
- Simmons, N. B. 1998. A reappraisal of interfamilial relationships of bats In: Kunk, T. H.; Racey, P. A. (Ed.). *Bat: biology and conservation*. London: Smithsonian Institution Press, p. 3-26.
- Simmons, N. B. Order Chiroptera. In: Wilson, D. E.; Reeder, D. M. (Ed).2005. *Mammal species of the world: A taxonomic and geographia reference*. 3 ed., v. 1, Baltimore: Johns Hopkins University Press, p.312-529.
- Simmons, N. B.; Geisler, J. H. 1998. Phylogenetic relationships of *Icaronycteris*, *Archeonycteris*, *Hassianycteris*, and *Palaeochiropteryx* to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocation and foraging strategies in Microchiroptera. *Bulletin of American Museum of Natural History*. 235:1-182,
- Simmons, N. B.; Voss, R. S. 1998. The mammals of Paracou, French Guiana: a Neotropical lowland rainforest fauna. Part 1. Bats. *Bulletin of American Museum of Natural History*. 237:1-219.
- Sinha Y. P. 1976. Bacula of Rajasthan bats. *Mammalia*. 40:97–103.
- Sudman, P. D.; Barkley, L. J.; Hafner, M. S. 1994. Familial affinity of *Tomopeas rarus* (Chiroptera) based on protein electrophoretic and cytochrome B sequence data. *Journal of Mammalogy*. 75:365-377.

- Thomas, O. 1915. The penis-bone, or “Baculum” as a guide to the classification of certain squirrels. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 8: 493-499.
- Vaughan, T. A. 1966. Morphology and flight characteristics of molossid bats. *Journal of Mammalogy*. 42(2):249-260.
- Vizotto, L. D.; Taddei, V. .. 1973. *Chave para determinação de quirópteros brasileiros*. Universidade Estadual Paulista. 9:249-260.

IV. CAPÍTULO 1

Penile histomorphology of Argentine Brown Bat *Eptesicus furinalis* (Vespertilionidae, Chiroptera)

**Penile histomorphology of Argentine Brown Bat *Eptesicus furinalis*
(Vespertilionidae, Chiroptera)**

Manuela T. Comelis^a, Larissa M. Bueno^a, Rejane M. Góes^b, Eliana Morielle-Versute^{a, *}

^aDepartment of Zoology and Botany and ^bDepartment of Biology, São Paulo State University, UNESP, Campus São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 17 3221 2369; fax: +55 17 3221 2374.

E-mail addresses: morielle@ibilce.unesp.br; emorielle@gmail.com (E. Morielle-Versute).

Artigo submetido à revista: *Zoologischer Anzeiger*

ABSTRACT

External and internal penile morphology have evolved rapidly and divergently in many mammalian orders, which is extremely useful for taxonomic studies, particularly in the recovery of phylogenetic relationships. *Eptesicus furinalis*, a vespertilionid bat, belongs to a taxon in which species recognition is frequently difficult when only using traditional features. Therefore, any feature that may contribute to the more accurate characterization of a taxon is relevant. In this study, we describe the histomorphology of the penis and baculum of this species after analyzing serial transverse sections and three-dimensional (3D) reconstructions. The glans penis was small with no epidermal projections and had an inverted Y-shaped baculum for most of its length. Internally, the penis contained three erectile tissues: corpus cavernosum, accessory cavernous tissue, mostly observed in the prepuce, and corpus spongiosum around the urethra. The internal anatomy of the *E. furinalis* penis displayed the basic mammalian pattern but had some features that were unique to this species, such as accessory cavernous tissue located dorsal and lateral to the tunica

albuginea of the corpora cavernosa, a glans penis with cone morphology, and a marked development of spongy tissue.

Key words: Glans penis; Baculum; Bat; Male reproductive tract

1. Introduction

Bats are unique among mammals particularly because of their ability to fly, and although they are often rare in some areas and occasionally difficult to study in the field, they can provide important models for studying the diversity of form and function.

Several authors have examined the different aspects of bats, mainly their morphology, behavior and ecology, to understand how their morphology relates to their ecology. Some studies have emphasized the importance of recognizing the intra- and interspecific variation in the anatomical structures relative to sexual behavior, feeding habits and reproductive patterns, whereas other studies have aimed to examine the relationships between different taxa (Brown, 1967; Dixon, 1995; Hill and Harrison, 1987; Hosken et al., 2001; Larivière and Ferguson, 2002; Ferguson and Larivière, 2004; Jacobs et al., 2013).

Eptesicus Rafinesque, 1820, is one of five genera of Vespertilionidae located in Brazil. This genus is comprised of 23 species worldwide, six of which occur in Brazil: *E. andinus* (J. A. Allen, 1914), *E. brasiliensis* (Desmarest, 1819), *E. chiriquinus* (Thomas, 1920), *E. diminutus* (Osgood, 1915), *E. furinalis* (d'Orbigny, 1847) and *E. taddeii* (Miranda, Bernardi and Passos, 2006) (Simmons, 2005; Davis and Gardner, 2007; Peracchi et al., 2011). Recognizing some of these species is simple when accounting for the largest (*E. taddei*) and smallest (*E. diminutus*) species and the morphological and morphometrics variations that are generally used to distinguish taxa. However, the variation observed in other taxa, particularly *E. furinalis*, and even the occurrence of sympatry makes it difficult to distinguish species based on these characteristics. Therefore, any feature that may collaborate in a more accurate characterization of taxa is relevant.

The morphology of the glans penis is a primary sex trait with significant variation in male vertebrates, including bats (Matthews, 1937, 1942; Wimsatt and Kallen, 1952; Ryan, 1991a,b; Kamikawa-Miyado et al., 2005; Hoofer et al., 2006). Regarding the morphology of the glans penis in Microchiroptera bats, Matthews (1942) reported the occurrence of two basic patterns: one with an elongated glans and complex structure and a thin and retractable prepuce; and the other with a smaller glans and simpler (less elaborate, less complex) structure and thick and vascular prepuce. Vespertilionids are included in the latter category (Matthews, 1942).

Furthermore, the penis in several mammalian orders contains an os penis or baculum: Chiroptera, Primates, Insectivora, Carnivora and Rodentia (Patterson and Thaeler, 1982; Hosken et al., 2001; Larivière and Ferguson, 2002; Ramm, 2007). The variations in penile and bacular morphologies indicate a high degree of interspecific variation, which has designated the baculum as a relevant taxonomic character (Elder and Shanks, 1962; Patterson and Thaeler, 1982). Although this diversity displayed by the baculum appears to be driven by sexual selection (Hosken et al., 2001; Hosken and Stockley, 2004; Ramm, 2007; Stockley et al., 2013), the precise function of the baculum remains uncertain. According to Dixson (1987, 1995) and Larivière and Ferguson (2002), the baculum may facilitate sperm transfer and may stimulate the cervix, thus inducing ovulation in some species.

Although the morphology of the glans penis and baculum is taxonomically important, few studies in bats have used these features as a tool to propose relationships among bat taxa (Brown, 1967, Brown et al, 1971; Ryan, 1991a,b; Jacobs et al., 2013; Herdina et al., 2014) because most of the large interspecific variation of the bat penis has not been fully studied (Ryan, 1991a,b).

In microchiropteran species the baculum is small when compared with megachiropteran (African) species in which it is greatly elongated. Furthermore, loss of the baculum has also occurred in certain bats, as example, in

phyllostomids species (Smith and Madkour, 1980; Hosken et al., 2001). Functional and evolutive explanations for these variations are lacking.

Recognizing the importance of studying these traits and the difficulty of distinguishing between *Eptesicus* taxa, the present study aimed to histomorphologically characterize the penis and morphologically characterize the baculum of the vespertilionid bat *Eptesicus furinalis*.

2. Material and Methods

2.1. Specimens, aging, and licenses

The penises of nine adult fresh *Eptesicus furinalis* specimens were used for the morphological and histological analyses. The specimens were collected in northwest São Paulo state, Brazil (São José do Rio Preto: 49W 220 4500 20S 490 1100) with authorization from the Brazilian institution responsible for wild animal care (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, IBAMA, Process: 21707-1). The study proposal was approved by the Institutional Ethics Committee for Animal Experimentation (Document: Protocol. 013/2009 CEEA/IBILCE-UNESP). The animals were deposited in the Chiroptera collection (DZSJRP-UNESP).

The glans and bacular morphology were analyzed in five adult males preserved in alcohol in the Chiroptera Collection of São Paulo State University (DZSJRP).

The bats were aged as adults based on body weight, a complete ossification of the metacarpal-phalangeal epiphyses, and degree of tooth wear (De Knegt et al., 2005).

2.2. Animal processing, baculum visualization and slide preparation

The fresh animals were killed by cervical dislocation. The penis was then removed and fixed in buffered paraformaldehyde fixative solution for 48 hours at room temperature, dehydrated in a series of ethanol (50 to 100%), clarified in

xylene, embedded in paraffin, sectioned (5 μ m in microtome Leica RM 2155), and stained with hematoxylin-eosin and Tushmann's blue.

The slides with the stained sections were examined and photographed using a light microscope (Zeiss Axio Imager-A2) and image scanner (Olympus BX-VCB) coupled with a capture and image analysis software (Axiovision Rel 4.8 and VS-ASW software, respectively) to observe the components of the penile tissue structure, position, and shape of the glans.

A three-dimensional reconstruction of the penis was obtained by sectioning the penis (5 μ m) lengthwise and staining with hematoxylin-eosin. Images were captured and processed using VS-ASW and Reconstruct (Fiala 2005 version 1.0.9.9) software. After alignment, the main penile structures (urethra, baculum, corpora cavernosa and spongiosum) were delineated in each image and then processed to obtain a threshold for each interface section to generate a three-dimensional (3D) model.

The penises of specimens preserved in alcohol were removed and diaphanized, placed in a neutralized solution of saturate sodium borate and cleared and softened in an alkaline solution of 5% trypsin in 1% KOH for at least two hours. The prepuce was then removed to expose the glans, and the penis was transferred to a staining solution of Red Alizarin 5% (Taylor, 1967) for 2 hours to identify the bone structure (baculum). The penises were subsequently preserved in a 100% glycerol solution.

The diaphanized penises were analyzed under a Leica MZ 16 stereomicroscope coupled with Leica DFC 295 a digital camera and with capture and image analysis software (Leica Application Suite–LAS, Version 3.8). After the images were obtained, the glans penis was dissected to isolate the baculum. The baculum was photographed, and length (from base to apex) and width (from the more basal region) measurements were recorded.

The descriptions and orientation of the baculum in the glans referred to an unerect and cranially directed organ with a ventral urethral aspect.

To compare the results with published data in mammalian species, we adopted the terminology suggested by Hooper (1958) and Smith and Madkour

(1980) to identify the glans, which indicates that the glans is the distal end of the penis after the glans-prepuce junction.

3. Results

The *E. furinalis* penis showed the typical basic internal structure of a mammalian penis, i.e., a vascular penis with a corpus spongiosum around the urethra and two paired corpora cavernosa. The penis had a thick, vascularized and glandular prepuce and a reduced glans, which was restricted to the more terminal portion of the penis (quarter final), with an absence of epidermal projections (Fig. 1A - C and Fig. 3A and B).

The corpora cavernosa constituted the largest mass of the corpus of the penis and were arranged dorsally, extending through the full length of the penis. The corpora cavernosa were surrounded by the tunica albuginea and separated by a septum along the penile length, only merging in the most apical portion. The corpora cavernosa had a circular shape in the more basal portions of the penis and widened into a semi-lunar shape in the more distal portions, immediately prior to the merger of the septum of the tunica albuginea (Fig. 1 A - D and Fig. 3 A and B). The tunica albuginea was composed of a thick and well-defined layer of non-patterned, dense connective tissue and smooth muscle fibers (Fig. 1 A - D and Fig. 3 B).

The corpus spongiosum, located in the ventral groove formed by the cavernous corpora, was a smaller mass of erectile tissue restricted around the urethra (Fig. 1 A - C and Fig. 2 C and D). The corpus spongiosum was also surrounded by a tunica albuginea with a similar constitution to that observed in the corpora cavernosa but was thinner.

The urethra was composed of a transitional stratified epithelium enclosed in a layer of connective tissue and smooth muscle cells (Fig. 1 A - D, Fig. 2 C and D and Fig. 3 A and B), occurred throughout the penis body length, externalized ventrally, occurred early in the initiation of the penis bone, and was not observed in the glans penis (Fig. 3 B).

Two pairs of major nerves, namely the upper and lower nerves, were observed on the sides of the spongiosum tissue of the urethra (ventral) and in the upper portion of the tunica albuginea (dorsal) (Figs. 1 A - D and 3 A). A third type of erectile tissue, the accessory cavernous tissue, was observed dorsal and bilateral to the tunica albuginea of the corpora cavernosa. The erectile constitution of this tissue was confirmed by staining with Masson Tushmann's blue, which identified the smooth muscle cells surrounding the venous trabeculae (Fig. 1 B - D, Fig. 2 B and Fig. 3 A and C); however, the tissue did not exhibit a surrounding tunica, thus delimiting its contours.

The accessory tissue occurred after the implantation base of the penis in the midline of the ventral face. This tissue increased in size and spread to more lateral and dorsal portions of the penis and decreased in size as it approached more distal regions of the penis and merged with the intermediate portion of the glans before its terminal end (Fig. 3 A and C). This tissue was responsible for the characteristic enlargement of the penis when viewed externally under stereoscopic microscopy (Fig. 3 B - C).

Inside of the glans there was a small bone structure, the baculum or os penis, which was located dorsal to the urethra (Fig. 3 D-F). This bone occurred from the distal portion of the urethra into the middle portion of the glans (Figs. 1 D, 2 A and C, and 3 A and B). The baculum had a triangular morphology or an inverted Y-shape. The baculum apex was rounded and represented the more terminal portion of a short shaft. The base was wide and projected in two lobes because of a bifurcation in the proximal region, which distinguished the proximal and distal regions. The baculum showed a ventral concavity, but the tip was not deflected downward. When viewed laterally, the baculum showed a slightly convex dorsal portion and concave ventral portion, through which the urethra passed. There was a medullary canal extending through the inside of the baculum. This morphology was observed in all specimens analyzed, despite the small variations in the lengths of the major axes, which was an average of 0.63 mm long (variation: 0.47 – 0.72 mm) and 0.46 mm (variation: 0.31 – 0.59 mm).

4. Discussion

Although the structures of bat penises have considerable variation, studies of this structure are relatively scarce and a comprehensive description from a morphological and histological viewpoint is lacking (Wimsatt and Kallen, 1952; Ryan, 1991a,b; Hoofer et al., 2006).

Matthews (1937, 1942) was one of the first researchers to describe the anatomy of the male reproductive tract in microchiropteran bats and recognized two basic penis types, which reflected the complexity of the glans and prepuce proportion and vascularization. *Eptesicus furinalis* fits into Matthew's category, in which the glans is smaller and less complex and surrounded by a thick, highly vascularized prepuce typical of vespertilionid bats.

Similar to other bat species analyzed, the penis of *E. furinalis* exhibited a third erectile tissue, the accessory cavernous tissue, which was additional to the corpora cavernosa and corpus spongiosum, and despite its denomination, i.e., cavernous, it had no relationship or homology with the cavernous tissue. According to Wimsatt and Kallen (1952), this accessory tissue possibly had a specialized and independent development. The origin and function of this tissue have not been studied in Chiroptera, but the presence of this structure in adults may suggest that it had a similar origin to that observed in Insectivora, in which it arose as a result of the independent vascularization of subcutaneous tissues that surrounded the erectile bodies through the branches of the penile dorsal arteries. These authors also considered possible functions for this structure and related it to the triggering of swelling in the terminal region of the glans, which would only occur after the intromission of the penis inside the female vagina. Thus, this tissue would perform a similar function to a dog's *bulbus glandis* and would delay the erection and allow the bats to remain in copulation longer.

The accessory tissue is not a characteristic observed in all bat taxa, and its presence is interpreted as a primitive trait within the group (Smith and Madkour, 1980). Unlike the previous tissue, the cavernous tissue does not extend into the glans but is well developed throughout the length of the penis.

The spongiosum corpus is relatively well developed, particularly compared to taxa of other families of Chiroptera, for example, Molossidae (Ryan, 1991a,b).

The literature indicates that the absence of cavernous tissue in the glans is a derived condition in bats, similar to the reduction of the corpus cavernosum and baculum, and is accompanied by an increase in the spongy body, as observed in the human penis (Smith and Madkour, 1980). Therefore, based on these considerations, the results of the present study examining the penis constitution of *E. furinalis* supports a more ancestral condition for this taxon of vespertilionid. However, *E. furinalis* did not exhibit epidermal projections covering the glans, which is a feature that has also been associated with primitive Chiroptera and Primates penile morphology (Ryan, 1991a,b; Dixon, 2012).

Epidermal projections are observed in many mammalian orders, including some previously analyzed bats (Vamburkar, 1957; Phoenix et al., 1976; Ryan, 1991a,b). The function of these projections has not been fully studied, but the literature suggests a possible relationship with the removal of copulatory plugs, stimulation of the reproductive tract of females, or prolonging copulation in molossids bats (Sachs et al., 1984; Ryan, 1991 a,b; Dixon, 2012). Although vespertilionids do not generally show these specializations, a similar function can be attributed to the thick foreskin and accessory cavernous tissue observed in this family.

Similar to other previously analyzed species of *Eptesicus*, *E. furinalis* presented a baculum with the characteristic morphology of this genus: an arrow or inverted-Y shape with a medullar canal inside, which is a characteristic not yet reported in the literature. We observed variations in the baculum morphometry between individuals, but because of the small number of specimens, it was not possible to determine the extent of this variation. However, our results show that there was a direct relationship between animal size and penile length but no relationship between penile size and baculum length.

Although the presence of a baculum is taxonomically important, little is known about its anatomical relationship with the corpus of the penis or its origin and functional importance during copulation (Kelly, 2000).

The literature indicates that the baculum originates through the ossification of the distal portion of the corpora cavernosa (Smith and Madkour, 1980). A more complex origin is possible, as reported by Glucksmann et al. (1976) and Murakami and Mizuno (1986), who indicated that these two structures share the identical mass of mesenchymal tissue, wherein the progenitor cells of the corpus cavernosum penis and the os penis require the presence of epithelium to differentiate during the embryonic development of the penis in mice.

Researchers have discussed the possible functions of the baculum, but some of these proposed theories have not been supported. These theories include that the ossicle would be the only artifact derived from pleiotropy (Patterson and Thaeler, 1982) but would have significant importance in copulation, the baculum has a direct role in copulation and provides additional support to the penis to involve the corpus spongiosum and urethra (Romer, 1970; Dixon, 1987, 1995), it facilitates the intromission of the penis, thus inducing the opening of the vagina (Long and Frank, 1968), it stimulates the female during copulation, induces ovulation or prepares the uterus for implantation (Patterson and Thaeler, 1982), or in species with elongated bacula it extends or maintain intromission after the ejaculation has occurred (Dixon, 1987).

Larivière and Ferguson (2002) tested the latest hypothesis analyzing species of North American carnivores generating little support. However, Dixon et al. (2004) after analyzing 315 species of carnivores, primates and bats confirmed that elongated bacula characterize those species in which single prolonged intromission occur. Unfortunately, data about intromission duration in bats are rare, thus, the true function of the baculum in bats remains unknown and may be a combination of these previously suggested hypotheses or unrelated. Our data evinced that the baculum in *E. furinalis* is interposed

between two erectile tissues, the spongiosum and the accessory of the urethra, near the urethral opening. This condition support propositions of that between the functions of baculum is to protect the urethra from compression during intromissions (Dixson, 1987, 1995, 2004). Furthermore, we can no fail to mention that many of the species that have the baculum store sperm for prolonged periods, than it is likely that genital morphology and the baculum favor this condition, nonetheless further research is necessary.

Whatever the function of the baculum is in different mammalian species, the results of this study indicate that the internal anatomy of the *E. furinalis* penis maintained the basic mammalian pattern and shared some features with other taxa in its family, such as *Myotis lucifugus* and *Plecotus austriacus* (Wimsatt and Kallen, 1952; Herdina et al., 2010). However, the penis had some features that were not apparent in other species, such as accessory cavernous tissue, which was located dorsal and lateral to the tunica albuginea of the corpora cavernosa, a glans penis with cone morphology, the marked development of spongiosum tissue and the morphology and size of the baculum. These results reinforce the importance of structure as a taxonomic feature to differentiate bat species.

Acknowledgements

The scholarships awarded to Manuela Tosi Comelis by the (CNPq) and FAPESP (2012/24288-0) and the financial support from grants (2009/16181-9 and 2013/11859-2) from the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) and Brazilian National Research and Development Council (CNPq - Processes 302008/2010-1 and 301073/2013-9) to EMV are gratefully acknowledged.

References

- Brown, R. E. 1967. Bacula of some New World molossid bats. *Mammalia* 31:645-667.
- Brown, R.E.; Genoways, H.H.; Jones Jr, J.K. 1971. Bacula of some neotropical bats. *Mammalia*. 35:456-464.
- Davis, W.B., Gardner, A.L., 2007. Genus *Eptesicus* Rafinesque, 1820. In: Gardner, A.L. (Ed). *Mammals of South America, Volume 1, Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats*. The University of Chicago Press, pp. 440-450.
- De Knecht, L. V., Silva, J. A., Moreira, E. C., Sales, G. L., 2005. Morcegos capturados no município de Belo Horizonte, 1999–2003. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57:576-583.
- Dixson, A.F. 1987. Baculum length and copulatory behavior in primates. *Am. J. Primatol.* 7:51-60.
- Dixson, A.F. 1995. Baculum length and copulatory behaviour in carnivores and pinnipeds (Grand Order Ferae). *J. Zool.* 235: 67–76.
- Dixson, A. F.; Nyholt, J.; Anderson, M., 2004. A positive relationship between baculum length and prolonged intromission patterns in mammals. *Acta Zool.* 50:490 -503.
- Dixson, A.F., 2012. Sexual selection and genitalic evolution. In Dixson A.F. (Ed.), *Primate Sexuality: comparative studies of the prosimians, monkeys, apes and humans*. *The Oxford University Press*. pp.334-378.
- Elder, W.H.; Shanks CE. 1962. Age changes in tooth wear and morphology of the baculum in muskrats. *J. Mammal.* 43:144–149.
- Ferguson, S. H.; Larivière, S. 2004. Are long penis bones an adaption to high latitude snowy environments? *Oikos*. 105: 255-267.
- Fiala, J.C. 2005. Reconstruct: A free editor for serial section microscopy. *J Microscopy-Oxford*. 218:52–61.
- Glucksmann, A.; Ooka-Souda, S.; Miura-Yasug, E.; Mizuno, T. 1976. The effect of neonatal treatment of male mice with antiandrogens and of females with androgens on the development of the os penis and os clitoridis. *J. Anat.* 121:363-370.
- Hamiltown, JR. J. 1949. The bacula of some North American vespertilionid bats. *J. Mammal.* 30:97-102.

- Herdina, A. N.; Herzig-Straschil, B.; Hilgers, H.; Metscher, B.D.; Plenk Jr, H. 2010. Histomorphology of the penis bone (baculum) in the gray long-eared bat *Plecotus austriacus* (Chiroptera, Vespertilionidae). *Anat. Rec.* 293:1248-1258.
- Herdina, A.N., Hulva, P., Horáček, I., Benda, P., Mayer, C., Hilgers, H., Metscher, B. D., 2014. MicroCT imaging reveals morphometric baculum differences for discriminating the cryptic species *Pipistrellus pipistrellus* and *P. pygmaeus*. *Acta Chiropterol.* 16:157- 168.
- Hill, J. E., Harrison, D.L., 1987. The baculum in the Vespertilioninae (Chiroptera: Vespertilionidae) with a systematic review, a synopsis of *Pipistrellus* and *Eptesicus*, and the descriptions of a new genus and subgenus. *Bull.br.Mus.nat.Hist.Zool.* 52: 225–305.
- Hooper, S.R.; Van Den Bussche, R.A.; Horáček, I. 2006. Generic status of the american pipistrelles (Vespertilionidae) with description of a new genus. *J. Mammal.* 87: 981–992.
- Hooper, E. T. 1958. The male phallus in mice of the genus *Peromyscus*. *Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Mich.* 105: 1- 40.
- Hosken, D.J.; Jones, K. E.; Chipperfield, K., Dixon, C.A. 2001. Is the bat os penis sexually selected? *Behav. Ecol. Sociobiol.* 50: 450-460.
- Hosken, D.J.; Stockley, P. 2004. Sexual selection and genital evolution. *Trends Ecol. Evol.* 19: 87–93.
- Jacobs, D.S.; Babiker, H.; Bastian, A., Kearney, T.; Van Eeden, R.; Bishop, J.M. 2013. Phenotypic convergence in genetically distinct lineages of a *Rhinolophus* species complex (Mammalia, Chiroptera). *PLoS ONE* 8, (12): e82614.
- Kamikawa-Miyado, M.; Ogi, H.; Ogino, Y.; Katoh, H.; Suzuki, K.; Uemura, M.; Kitoh, J.; Oda, S.; Yamada, G. 2005. The morphological and histological characters of the male external genitalia of the house musk shrew. *Zool. Sci.* 22:463-468.
- Kelly, D. A. 2000. Anatomy of the baculum-corpous cavernosum interface in the norway rat (*Rattus norvegicus*), and implications for force transfer during copulation. *J. Morphol.* 244: 69-77.
- Larivière, S.; Ferguson, S.H.; 2002. On the evolution of the mammalian baculum: vaginal friction, prolonged intromission or induced ovulation? *Mammal Rev.* 32:283–294.
- Long, C.A.; Frank, T., 1968. Morphometric variation and function in the baculum, with comments on correlation of parts. *J. Mammal.* 49:32–43.

- Matthews, L. H., 1937. The form of the penis in the British rhinolophid bats, compared with that of the vespertilionid bats. *Trans. Zool. Soc. Lond.* 23:213-223.
- Matthews, L. H., 1942. Notes on the genitalia and reproduction of some African bats. *J. Zool. Proc. Zool. Soc. London Ser. B.* 3:289-346.
- Murakami, R., Mizuno, T. 1986. Proximal-distal sequence of development of the skeletal tissues in the penis of rat and the inductive effect of epithelium. *J. Embryol. exp. Morph.* 92:133-143.
- Patterson, B.D.; Thaeler Jr. C. 1982. The mammalian baculum: hypotheses on the nature of bacular variability. *J. Mammal.* 63:1-15.
- Peracchi, A. L.; Lima, I. P.; Reis, N. R.; Nogueira, M. R.; Ortêncio Filho, O. 2011. Ordem Chiroptera. In Reis, N., Peracchi, A.L., Pedro, W.A., Lima, I.P. (Eds.), *Mamíferos do Brasil, 2ªEd.*, Londrina, pp. 155-217.
- Phoenix, C.H.; Copenhaver, K.H.; Brenner, R.M. 1976. Scanning electron microscopy of penile papillae in intact and castrated rats. *Horm. Behav.* 7:217-227.
- Ramm, S. A. 2007. Sexual Selection and Genital Evolution in Mammals: A phylogenetic analysis of baculum length. *Am. Nat.* 169:360-369.
- Romer, A. S., 1970. The vertebrate body. Philadelphia: W. B. Saunders.
- Ryan, J. M. 1991a. Comparative morphology of the glans penis in *Molossus*, *Promops* and *Eumops* (Chiroptera: Molossidae). In Griffiths, T.A., Klingener, D. (Eds.), Contributions to mammalogy in honor of Karl F. Koopman. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 206:122-137.
- Ryan, J. M. 1991b. Morphology of the glans penis in four genera of molossid bats (Chiroptera: Molossidae). *J. Mammal.* 72: 658-668.
- Sachs, B. D.; Glater, G. B.; O'Hanlon, J. K. 1984. Morphology of the erect glans penis in rats under various gonadal hormone conditions. *Anat. Rec.* 210:45-52.
- Simmons, N. B. 2005. *Order Chiroptera*. In Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), *Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Baltimore, Johns Hopkins University Press, pp. 312-529.
- Smith, J. D., Madkour, G. 1980. Penial morphology and the question of Chiroptera phylogeny. In Wilson, D.E., Gardner, A.L. (Eds.), *Proceedings of the Fifth International Bat Research Conference*. Texas tech University press, Lubbock, pp. 347-365.

- Stockley P.; Ramm, S.A.; Sherborne, A.L.; Thom, M.D.F.; Paterson, S., Hurst, J.L. 2013. Baculum morphology predicts reproductive success of male house mice under sexual Selection. *BMC Biol.* 11, 66.
- Taylor, W. R. 1967. An enzyme method of clearing and staining small vertebrates. *Proc. U.S. Natl. Mus.* 122:1-17.
- Vamburkar, S. A. 1958. The male genital tract of the Indian Megachiropteran bat *Cynopterus sphinx gangeticus*. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 130:57-77.
- Wimsatt, W. A.; Kallen, F.C. 1952. Anatomy and histophysiology of the penis of a vespertilionid bat, *Myotis lucifugus lucifugus*, with particular reference to its vascular organization. *J. Morphol.* 90: 415-465.

Accession number of the animals analyzed: *Histological analysis:* DZSJRP 1406, DZSJRP 1342, DZSJRP 1341, DZSJRP 1306 DZSJRP, 1337 DZSJRP, 1345 DZSJRP 1410, DZSJRP 18116 DZSJRP 16935, DZSJRP 1399 (juvenile), DZSJRP 1364 (juvenile), DZSJRP 1364 (juvenile); *morphological analysis:* DZSJRP 14429, DZSJRP 11970, DZSJRP 12964, DZSJRP 14308, DZSJRP 16914.

Figures Legends

Figure 1. Penile sections of *Eptesicus furinalis* from base (A) to apical (D) region stained with Masson Thusmann's blue (A) and Hematoxylin-Eosin (B-D). P: prepuce; N: nerve; TC: Tunica albuginea; CC: corpus cavernosum; S: septum of the corpus cavernosum; CS: corpus spongiosum; U: urethra; AT: accessory cavernous tissue. In D the arrow points the ends of the baculum lobes.

Figure 2. Penile sections of *Eptesicus furinalis* stained with Hematoxylin-Eosin (A, C and D) and Masson Tushmann's blue (B). A: at glans penis evincing distal region of the baculum, B: evincing the accessory cavernous tissue (arrow point to smooth muscle cell), C: at distal region of glans evincing the median region of

baculum and, D: evincing the corpus spongiosum. AT: accessory cavernous tissue; B: baculum; CS: corpus spongiosum; G: glans; N: nerve; P: prepuce; TC: tunica albuginea of the corpus cavernosum; TS: tunica albuginea of the corpus spongiosum; U: urethra.

Figure 3. Three-dimensional reconstructions of the penis of *E. furinalis* in ventral (A), lateral (B) and dorsal (C) view, diaphanized glans showing by transparency the baculum inside (D) and schematic representation of the baculum in dorsal (E) and ventral (F) view. Note in (A and C) the greatest proportion of the accessory tissue and in (B) the disposition of the baculum in the glans penis.

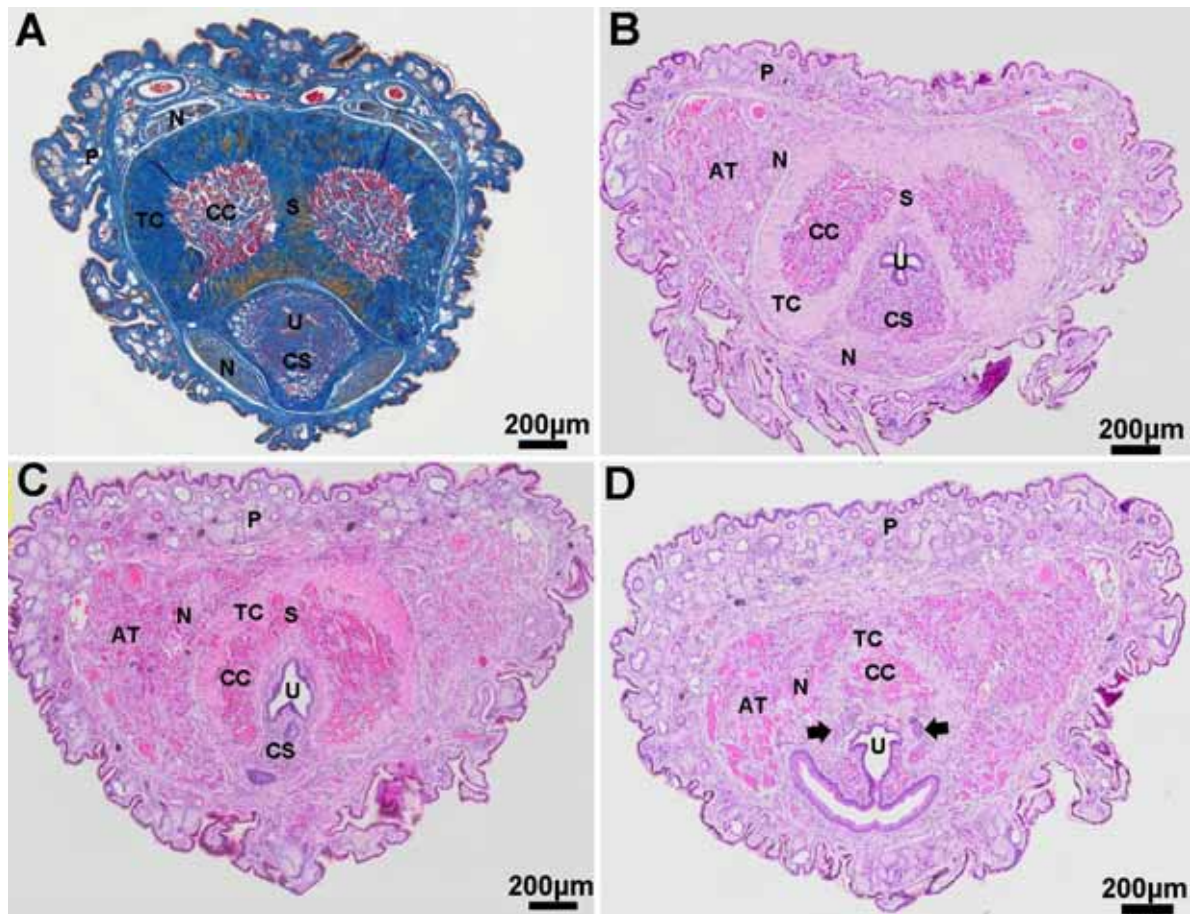


Figure 1. Penile sections of *Eptesicus furinalis* from base (A) to apical (D) region stained with Masson Thusmann's blue (A) and Hematoxylin-Eosin (B-D). P: prepuce; N: nerve; TC: Tunica albuginea; CC: corpus cavernosum; S: septum of the Tunica albuginea; CS: corpus spongiosum; U: urethra; AT: accessory cavernous tissue. In D the arrow points the ends of the baculum lobes.

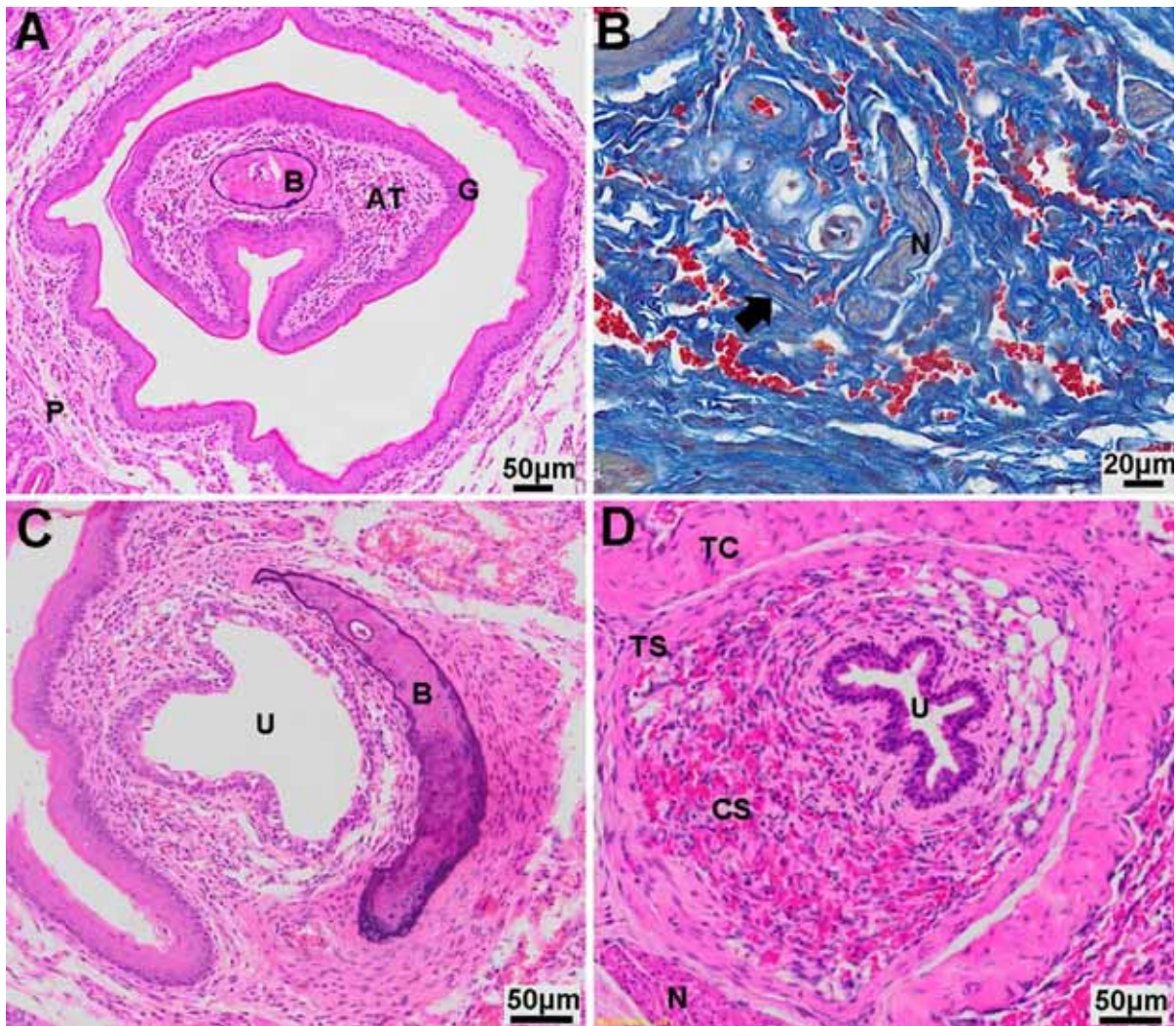


Figure 2. Penile sections of *Eptesicus furinalis* stained with Hematoxylin-Eosin (A, C and D) and Masson Tushmann's blue (B). A: at glans penis evincing distal region of the baculum, B: evincing the accessory cavernous tissue (arrow point to smooth muscle cell), C: at distal region of glans evincing the median region of baculum and, D: evincing the corpus spongiosum. AT: accessory cavernous tissue; B: baculum; CS: corpus spongiosum; G: glans; N: nerve; P: prepuce; TC: tunica albuginea of the corpus cavernosum; TS: tunica albuginea of the corpus spongiosum; U: urethra.

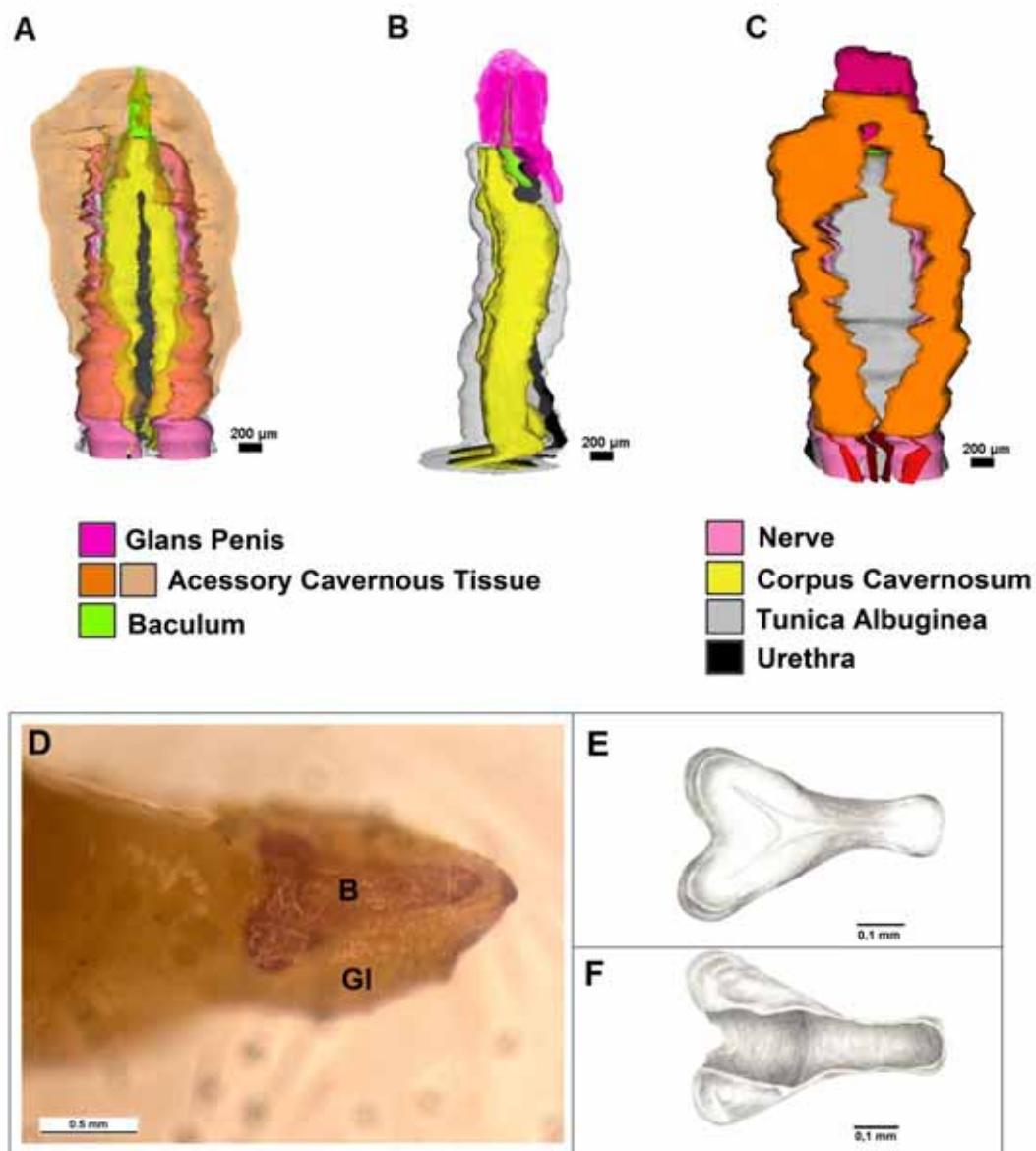


Figure 3. Three-dimensional reconstructions of the penis of *E. furinalis* in ventral (A), lateral (B) and dorsal (C) view, diaphanized glans showing by transparency the baculum inside (D) and schematic representation of the baculum in dorsal (E) and ventral (F) view. Note in (A and C) the greatest proportion of the accessory tissue and in (B) the disposition of the baculum in the glans penis.

V. CAPÍTULO 2

**Análise comparativa da morfologia peniana em
espécies de morcegos dos gêneros *Cynomops*,
Molossops e *Neoplatymops* (Molossidae,
Chiroptera, Mammalia)**

**Análise comparativa da morfologia peniana em espécies de morcegos
dos gêneros *Cynomops*, *Molossops* e *Neoplatymops* (Molossidae,
Chiroptera, Mammalia)**

Comelis, M. T.^a, Góes, R. M.^b, Morielle-Versute, E.^{a, *}

^aDepartamento de Zoologia e Botânica e ^bDepartamento de Biologia, Universidade do Estado de São Paulo, UNESP, Campus São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brasil.

*Autor correspondente. Tel.: +55 17 3221 2369; fax: +55 17 3221 2374.

E-mail: morielle@ibilce.unesp.br; emorielle@gmail.com (E. Morielle-Versute)

Palavras chave: Glande; Projeções epidérmicas; Monte bacular; Baculum

Manuscrito a ser submetido à *Anatomical Records*

Resumo

Características penianas têm se mostrado úteis na distinção de diferentes táxons de Mammalia, assumindo papel importante nas considerações taxonômicas em Chiroptera. Entretanto, informações sobre as variações intra e interespecíficas da morfologia peniana, da presença ou ausência de báculo (osso peniano) nas espécies são ainda restritas, quando se considera especialmente a composição dentro dos clados de gêneros e famílias, fato que dificulta qualquer tentativa de interpretação desta característica em nível de filogenia. *Cynomops*, *Molossops* e *Neoplatymops* são táxons complexos de Molossidae, por isso, com o objetivo de fornecer novas informações sobre eles o presente estudo analisou e comparou a morfologia interna e externa da glande peniana das espécies *C.abrasus*, *C. planirostris*, *M. temminckii* e *N. mattogrossensis*, por meio de análises histológica e morfológica. Os resultados mostram que o pênis nessas espécies está constituído por três tecidos eréteis, o corpo cavernoso, o corpo esponjoso e o corpo cavernoso difuso, condição que é compartilhada com outras espécies

de morcegos. Apesar disso há variação na representação destes tecidos na composição do pênis das diferentes espécies. Em nenhuma das espécies foi observada a ocorrência do báculo, condição que aproxima esses táxons, quando comparados a outros de molossídeos, contudo, as diferenças observadas entre eles são suficientes para a manutenção dos três gêneros como distintos.

1. Introdução

Características penianas têm se mostrado úteis na distinção de diferentes táxons de Mammalia, com destaque para alguns gêneros de roedores, como *Ctenoniys* (Lessa e Cook, 1989), *Apodemus* (Williams et al., 1980) e *Oligoryzomys* (Machado et al., 2011), para espécies de carnívoros da família Mustelidae (Burt, 1960; Long e Frank, 1968; Long, 1969; Baryshnikov et al., 2003) e para gêneros de primatas, como *Galagoides* (Perkin, 2007) e *Macaca* (Fooden, 2006). Em Chiroptera, apesar de algumas poucas publicações apresentadas nas décadas de 70 a 90, apenas mais recentemente a análise das características penianas tem assumido papel importante nas considerações taxonômicas dos grupos (Chimimba e Kitchener 1991; Thomas et al., 1994; Benda e Tsytsulina 2000; Cotterill 2002, Herdina et al., 2014). Entretanto, informações sobre as variações intra e interespecíficas da morfologia peniana, da presença ou ausência de báculo (osso peniano) entre espécies intimamente relacionadas são ainda, restritas a poucas espécies quando se considera especialmente a composição dentro dos clados de gêneros e famílias, fato que dificulta qualquer tentativa de interpretação desta característica em análises filogenéticas.

As estruturas macro e microscópicas do sistema reprodutivo masculino evoluíram e divergiram rapidamente nos diferentes grupos de mamíferos (Ryan, 1991). As características relacionadas à estrutura do falo (ou pênis) estão entre as mais complexas e evoluíram mais divergentemente que as

relacionadas aos órgãos não intromitentes (Arnqvist, 1997). Apesar de se ter conhecimento desses fatos, e levando em conta a generalidade e a forma de evolução genital relativa a outros domínios de adaptação morfológica, pouco se sabe acerca dos reais mecanismos que levaram à evolução genital (Arnqvist, 1997).

Os estudos mais amplos envolvendo a morfologia do pênis de morcegos foram realizados por Ryan (1991 a,b). Nas duas publicações foram apresentadas informações sobre a morfologia peniana em microscopia eletrônica de varredura, de dez espécies da família *Molossidae*, fornecendo informações úteis para o reconhecimento de diversas características dentro do grupo.

A família *Molossidae* é terceira em representação de táxons dentro de *Chiroptera*. Suas 110 espécies reconhecidas estão agrupadas em 19 gêneros e duas subfamílias, *Tomopeatinae*, que é monotípica e constituída por *Tomopeas ravyus*, e *Molossinae*, que engloba todas das demais espécies (Simmons, 2005, Solari e Martínez-Arias, 2014). Apesar dessa categorização para os clados superiores ao nível genérico, há para quase cerca de 50% das espécies muitas incertezas taxonômicas, com o reconhecimento de várias subespécies. Entre os gêneros que ocorrem no Brasil e para os quais são reconhecidas subespécies estão: *Cynomops*, *Eumops*, *Molossops*, *Molossus* e *Neoplatymops* (Reis, Perachi e Pedro, 2006; Reis, Perachi e Pedro, 2007; Gardiner, 2008).

Cynomops foi descrito por Thomas (1920) e, posteriormente, Cabrera (1958) o incluiu como um subgênero de *Molossops*. Essa incerteza quanto à categoria de *Cynomops* e *Molossops* fez com que vários autores ora os reconhecessem como gêneros (Emmons, 1997), ora um como subgênero do outro (Freeman, 1981; Koopman, 1993, 1994; Simmons e Voss, 1998). Atualmente *Cynomops* é reconhecido como um gênero válido e apresenta cinco espécies no Brasil: *C. abrasus* (Temminck 1827), com quatro subespécies reconhecidas, *C. greenhalii* (Goodwin, 1958), *C. milleri* (Osgood, 1914), *C. paranus* Thomas, 1901, e *C. planirostris* (Peters, 1865). O

reconhecimento do gênero foi suportado entre outras características, por dados morfológicos e moleculares (Barquez et al., 1999; Peters et al., 2002; Gregorin e Taddei, 2002; Simmons 2005; Ammerman et al., 2012) e dados citogenéticos (Morielle-Versute et al., 1996; Leite-Silva et al., 2003; Faria et al., 2009).

Mesmo após o reconhecimento de *Cynomops* como gênero, *Molossops* continuou um gênero complexo, pois além de *Cynomops*, outros três subgêneros eram reconhecidos: *Molossops*, *Cabreramops* e *Neoplatymops*. Destes, *Neoplatymops* foi elevado a gênero, e é representado por apenas uma espécie (monotípico), *N. matogrossensis* (Acosta et al., 2006), que ocorre no Brasil. Para os demais há, contudo, fortes evidências morfológicas, cromossômicas e moleculares que sugerem que estes táxons derivaram de linhagens diferentes justificando o *status* genérico para eles (Peters et al., 2002; Ammerman et al., 2012). *Molossops neglectus* e *M. temminckii*, para a qual são reconhecidas três subespécies, são as duas espécies do gênero *Molossops stricto sensu* que ocorrem no Brasil (Reis, Perachi e Pedro, 2006; Reis, Perachi e Pedro, 2007; Gardiner, 2008).

Com o objetivo de fornecer novas informações sobre esses três táxons, ou seja, *Cynomops*, *Molossops* e *Neoplatymops*, o presente estudo analisou e comparou a morfologia interna e externa da glândula peniana das espécies *C. abrasus*, *C. planirostris*, *M. temminckii* e *N. matogrossensis*.

2. Material e Métodos

Foram analisados no presente estudo 22 espécimes machos adultos representantes das espécies *Cynomops abrasus*, *C. planirostris*, *Molossops temminckii* e *Neoplatymops matogrossensis*, conforme discriminado na Tabela 1. Os espécimes fixados foram obtidos da coleção científica de Chiroptera do IBILCE/UNESP de São José do Rio Preto (DZSJRP), e os vivos por meio de captura com redes tipo “mist-nets” armadas em áreas urbanas e rural da região noroeste do estado de São Paulo, Brasil (49W22’45”

20S49'11''), com autorização do IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (Processo: 02027.001957/2006-02). Os espécimes foram mantidos aclimatados e com água até o momento do sacrifício, que ocorreu por meio de constrição cervical, sendo posteriormente depositados na coleção científica (DZSJRP) como espécimes-testemunho.

Para facilitar comparações posteriores e com as pesquisas já realizadas sobre a morfologia da genitália masculina, adotou-se, para a diferenciação da glândula peniana, a terminologia utilizada por Hooper (1958) e Smith e Madkour, (1980), onde o termo glândula aplica-se apenas para a parte distal do pênis após a junção glândula-prepúcio.

Tabela 1: Discriminação dos espécimes utilizados de acordo com o estudo realizado.

Gênero	Espécie	Histologia	Morfologia	Total (22)
<i>Cynomops</i>	<i>C. abrasus</i>	0	3	3
	<i>C. planirostris</i>	2	4	6
<i>Molossops</i>	<i>M. temminckii</i>	3	5	8
<i>Neoplatymops</i>	<i>N. mattogrossensis</i>	0	5	5

2.1 Análise da morfologia externa: glândula e báculo

O procedimento de diafanização foi aplicado somente a espécimes colecionados (fixados) conforme Tabela 1. Os pênis dos indivíduos foram retirados e submetidos aos procedimentos para diafanização, os quais envolveram uma desidratação em álcool etílico (50% e 100%), neutralização em solução de borato de sódio saturado e digestão dos tecidos com solução

alcalina de tripsina (solução de borato de sódio saturada + tripsina 5%). Em seguida foram corados com Alizarina Vermelha (solução de KOH 1% + solução alizarina vermelha 1%), por pelo menos duas horas, para a identificação da estrutura óssea (báculo). Após a coloração foram transferidos para uma solução de glicerina (60%) em KOH (1%), onde permaneceram por uma semana. Enquanto analisados foram preservados em solução de glicerina 100%.

2.2 Análise histológica

Esta análise foi aplicada aos cinco espécimes obtidos vivos e representantes das espécies *C. planirostris* (n= 02) e *M. temminckii* (n= 03), para os quais preparadas lâminas.

Os pênis foram retirados e fixados em paraformoldeído tamponado por 48h. Em seguida foram desidratados em uma série de etanol (50% a 100%) e xilol e então incluídos em parafina histológica. Os blocos resultantes foram cortados transversalmente (5µm de espessura) em micrótomo Leica RM 2155. As secções resultantes foram coradas com Hematoxilina-Eosina (Ribeiro e Lima, 2000) e tricrômico de Tushmman's blue (Delbès et al., 2006). As lâminas resultantes foram analisadas e fotografadas em microscopia óptica (Scanner de imagens Olympus BX-VCB), com auxílio de software de captura e análise de imagem (*software* VS-ASW), para observação dos tecidos componentes da estrutura peniana, posição, forma e composição do báculo.

3. Resultados

3.1 Descrição geral do pênis

O pênis dos molossideos constitui-se de duas porções, o corpo e a glândula. O corpo engloba toda a porção pendulosa do pênis, incluindo a glândula e o prepúcio; a glândula por sua vez, limita-se à porção distal final do corpo, após

a separação deste e do prepúcio, que é uma bainha de tecido coberta de pelos que recobre toda a superfície externa do pênis. Para a glândula foram observadas variações na morfologia externa em todas as espécies analisadas.

A constituição histológica do pênis das duas espécies analisadas, *C. planirostris* e *M. temminckii*, é muito semelhante. A maior parte da glândula é composta por tecido cavernoso difuso (ou tecido cavernoso acessório), que se estende por toda a extensão da glândula, sendo o único tipo tecidual presente nas porções mais apicais. (Figura 1). Os corpos cavernosos (CC), localizados latero-dorsalmente no pênis de *M. temminckii* apresentaram maior desenvolvimento, quando comparado a *C. planirostris*, onde ele tem uma distribuição mais ventral (Figura 1 A-D). O corpo esponjoso (CE) restringiu-se a uma pequena massa de tecido ao redor da uretra (Figura 1 A-D). Ambos os corpos eréteis são delimitados por suas respectivas túnicas albugíneas, que é mais espessa e melhor definida no corpo cavernoso que no corpo esponjoso. As túnicas são constituídas de tecido conjuntivo denso não modelado e fibras musculares lisas.

Foi observado no epitélio da glândula um revestimento queratinoso que dá origem a pequenas projeções espiniformes, mais largas na base e estreitas e afiladas no ápice (Figura 1). Não foi observada na glândula das duas espécies qualquer estrutura óssea, ou seja, osso peniano (báculo).

3.2 morfologia externa da glândula: variações interespecíficas

3.2.1 *Cynomops abrasus* e *C. planirostris*

O comprimento da glândula em *C. abrasus* atinge cerca de 4,00 mm e em *C. planirostris* 1,74 mm. Morfologicamente a glândula de *C. abrasus* e de *C. planirostris* apresenta um formato elipsóide com a porção mais apical arredondada (Figura 2). Na superfície dorsal da glândula de *C. planirostris* há um sulco mediano profundo, que percorre todo o seu comprimento separando-a em duas regiões equivalentes. Embora o sulco alcance a porção mais

arredondada distal, ele não se estende em direção à superfície ventral (Figura 2 C e E). Em *C. abrasus* a superfície dorsal é marcada por dois sulcos laterais, que formam uma projeção mediana dorsal cilíndrica (PD), que percorre todo comprimento da glândula. Essa projeção é dividida ao meio pela presença de um sulco mediano dorsal (Figura 2 D e F).

A superfície ventral em ambas as espécies apresenta duas pregas medianas que têm formato semelhante a uma ampulheta, mais largas na porção proximal, estreitas na região mediana, alargando-se novamente em direção ao ápice, onde terminam em uma projeção mediana elevada (PV) de formato lanceolado, que termina pouco antes do ápice. As pregas medianas ventrais são mais profundas em *C. abrasus* que em *C. planirostris*. A projeção lanciforme ventral é mais comprida e estreita em *C. planirostris*, apresentando lateralmente dois pares de domos de epitélio (D), um interno menor e um externo maior (Figura 2 A). Em *C. abrasus* esta projeção é mais curta e espessa, e os domos pareados encontrados em *C. planirostris* estão ausentes (Figura 2B).

Toda superfície externa da glândula de ambas as espécies é recoberta por pequenas projeções epidérmicas, relativamente estreitas. As projeções estão ausentes apenas na projeção lanciforme ventral de *C. abrasus* e na superfície dos domos ventrais em *C. planirostris* (Figura 2). Não foi observado báculo ou osso peniano no interior da glândula das espécies.

3.2.2 *Molossops temminckii*

O comprimento da glândula peniana de *M. temminckii* é de aproximadamente 2,26 mm. Em decorrência da proporcionalidade de suas partes ela tem uma morfologia retangular, possuindo na sua região distal dobras e pregas com sulcos profundos que lhe confere uma aparência digiforme. (Figura 3 A e B). Ela é composta por três lóbulos, sendo dois latero-ventrais e um dorsal. A superfície dorsal possui dois sulcos laterais pareados e maiores, que percorrem toda a extensão da glândula, e dois sulcos pareados

centrais menores, que estendem-se por aproximadamente até o terço final do seu comprimento separando o lóbulo dorsal dos outros lóbulos laterais (Figura 3 B). Na superfície ventral, uma profunda fenda central, o meato urinário (MU), separa os outros dois lóbulos latero-ventrais. Esta fenda percorre cerca de dois terços finais da superfície ventral, a qual, conseqüentemente, apresenta uma aparência digiforme (Figura 3 A). A porção externa da glândula é recoberta de pequenas projeções espiniformes, mais largas na base e com a porção final voltada para a região proximal. Não foi observado báculo ou osso peniano no interior da glândula.

3.2.3 *Neoplatymops mattogrossensis*

É a espécie que apresenta a menor glândula, com média de 1mm de comprimento. De maneira similar às outras espécies também apresenta pequenas projeções epidérmicas espiniformes revestindo externamente a glândula. Esta possui formato triangular, e um profundo sulco mediano-dorsal, que se estende por praticamente todo comprimento da superfície dorsal da glândula, dividindo-a em duas partes iguais. Estas, por sua vez, são distalmente divididas por pequenas ranhuras dorso-laterais, que dão aparência digitiforme ao ápice dessa região (Figura 3 D). O sulco mediano-dorsal se estende até a superfície ventral onde expande-se em direção as laterais da glândula formando uma profunda fenda mediano-ventral (FV). No interior desta fenda há uma projeção mediano-ventral em forma lanceolada, com ausência de revestimentos epidérmicos (Figura 3 C). Assim como nas outras espécies, não foi observada qualquer estrutura óssea no interior da glândula.

4. Discussão

Os avanços ocorridos nos estudos taxonômicos em Chiroptera decorrem dos diversos estudos que têm sido realizados, os quais têm se baseado nos princípios da filogenética. Ao considerar os diferentes estudos, nota-se a

extensa amplitude nos métodos empregados, ou seja, os diferentes enfoques ou “ferramentas de análise” utilizadas no reconhecimento e avaliação das características que revelam os padrões evolutivos exibidos pelos morcegos. Essa natureza diversificada dos dados quando avaliada conjuntamente acabam por produzir estudos com resultados robustos.

Avaliando as publicações recentes evidencia-se que as análises de condições ou caracteres morfológicos ainda são muito importantes na identificação e caracterização das espécies de Chiroptera, com destaque para os táxons de Molossidae e Vespertilionidae.

O aumento recente no número de espécies de Molossidae devido a novas descrições e revalidações (Solari e Martínez-Arias, 2014) deveu-se em parte, a um aumento nas análises morfológicas, que melhor detalharam as variações observadas nos espécimes, e que inicialmente levaram os autores a reconhecerem a ocorrência de subespécies dentro dos táxons. Essas análises mais aprofundadas permitiram reconhecer ou revalidar espécies. Um exemplo foi a revalidação de *Promops davisoni* por Gregorin e Chiquito (2010), que embasados principalmente no tamanho e na coloração da pelagem reconheceram *P. davisoni* como uma espécie válida. Da mesma forma, González-Ruíz et al. (2011), embasados em análises morfológicas propuseram o reconhecimento de uma nova espécie de *Molossus*, *M. alvarezi*, que apesar de muito semelhante a *M. sinaloae* tem distribuição disjunta desta última.

Muito embora a análise da morfologia da glândula e do báculo seja ainda pouco representativa nos estudos envolvendo as análises morfológicas em táxons de Chiroptera, os resultados foram importantes no reconhecimento dos táxons e até mesmo na proposição dos relacionamentos evolutivos (Long e Jones, 1966; Hill e Harrison, 1987; Ryan 1991a, b; Thomas et al., 1994; Smirnov e Tsytsulina, 2003; Hofer et al., 2006; Herdina et al., 2010; 2014; Jacobs et al., 2013).

Apesar das semelhanças na composição e arranjo dos tecidos dos pênis de *C. planirostris* e *M. temminckii*, não é possível afirmar que as quatro espécies analisadas apresentam o mesmo padrão de organização peniana.

Contudo, pela análise da glândula, fica evidente que nenhuma das espécies apresenta no seu interior qualquer estrutura óssea, ou seja, o báculo ou osso peniano, que aparece em outras espécies de molossídeos, com diferentes representações em tamanho e forma (Comelis et al., 2015 *in preparação*).

Por outro lado, a glândula apresentou, nas quatro espécies analisadas, grande variabilidade morfológica, até mesmo entre as espécies congêneras *C. abrasus* e *C. planirostris*, que apesar de apresentarem semelhanças morfológicas e cranianas características do gênero, podem ser facilmente distinguidas pela análise do pênis.

A morfologia diferenciada da glândula das quatro espécies, por tratar-se de uma estrutura reprodutiva com importante papel no sucesso reprodutivo, corrobora a distinção dessas espécies, bem como a manutenção das mesmas em gêneros diferentes.

O pênis penduloso, com prepúcio fino e retrátil é uma característica marcante em molossídeos (Matthews, 1937, 1941), e foi à condição observada nas espécies analisadas. Somando-se a estas características está ainda, a presença de projeções epidérmicas no revestimento externo da glândula (Ryan, 1991), as quais também foram exibidas pelas quatro espécies analisadas.

Projeções espiniformes no revestimento do pênis são também observadas em espécies de outras ordens de Mammalia, como primatas roedores e carnívoros, e tem sido considerada uma característica primitiva dentro do clado dos Chiroptera (Ryan, 1991). A origem e função dessas estruturas em Chiroptera não foram ainda avaliadas, contudo, estudos realizados em gatos domésticos, ratos murídeos e ratos winstar sugerem uma possível relação com o prolongamento da cópula, por meio do intumescimento dessas estruturas formando um bloqueio de coito, assim como estímulo do trato reprodutivo da fêmea induzindo a ovulação e a remoção de plugs copulatórios previamente depositado no trato reprodutivo das fêmeas (Arosen e Cooper, 1967; Sachs et al, 1984; Kruttsch e Crichton, 1987; Kelly, 2000).

Sabe-se apenas que essas estruturas possuem relação direta com a concentração de andrógenos no plasma, uma vez que o aumento dos níveis

séricos de testosterona provoca o crescimento e o surgimento dessas estruturas em indivíduos pré-púberes e castrados, e a diminuição provoca o desaparecimento destas (Aronson e Cooper 1967, Dixon, 1991; Stockley, 2002; Hosken e Stockley, 2004; Armstrong, 2005). Aronson e Cooper (1967) registram em seu estudo com gatos domésticos uma relação entre a duração da cópula e a presença dessas estruturas, onde animais castrados que possuíam redução dos espinhos epidérmicos apresentavam menor tempo de cópula que animais com os espinhos intactos.

Outra característica histológica interessante observada nas espécies analisadas e compartilhada com espécies de outras famílias de Chiroptera foi a presença de um terceiro tipo de tecido erétil, além dos corpos cavernosos e do corpo esponjoso. Este tecido chamado cavernoso difuso apresentou grande representatividade no pênis de *C. planirostris* e *M. temminckii*, onde compôs a maior parte da glândula. De maneira diferente ao que foi observado em outras espécies de molossídeos como *Molossus molossus* e *M. rufus* (Comelis, 2015 *in preparação*), o corpo cavernoso não está muito desenvolvido nessas espécies, e apresenta uma localização lateral. Tanto em *C. planirostris* quanto *M. temminckii* os corpos cavernosos estão fundidos em porções mais basais, separados apenas por septos da túnica albugínea, mas em porções mais apicais estão completamente separados.

A natureza erétil do tecido difuso foi confirmada na coloração pelo tricrômico de Tuchman's blue, que marcou as células musculares lisas presentes nas trabéculas. Podemos inferir a partir desses dados que o intumescimento do pênis nesses animais deve-se principalmente ao tecido difuso e não aos corpos eréteis tradicionais, que estão pouco representados. Essas características: presença do tecido difuso e baixa representatividade do corpo esponjoso da uretra têm sido consideradas primitivas para o grupo dos Chiroptera (Smith e Madkour, 1980; Ryan, 1991a).

Este tecido difuso foi previamente denominado de cavernoso acessório (Rauther, 1903; Matthews, 1937, 1941; Winssat e Kallen, 1952; Ercolani, 1868; Smith e Madkour, 1980; Ryan, 1991), porém devido a alta frequência e

representatividade deste tecido nas espécies de molossídeos já analisadas, da evidente falta de homologia com os outros corpos eréteis (Winssat e Kallen, 1952) e do desenvolvimento independente desse tecido (Matthews, 1941; Winssat e Kallen, 1952; Kruttsch, 1975; Kruttsch e Crichton, 1987) julgamos que a denominação “cavernoso acessório” possa não evidenciar a devida importância desse tecido no pênis, e para o mecanismo geral de ereção. A denominação de tecido cavernoso difuso foi uma proposta nossa justificada pela ausência de uma túnica ao seu redor.

Estudos da literatura apontam uma homologia do tecido difuso com alguns corpos eréteis encontrados no pênis de *Insectivora*, possivelmente apresentando um desenvolvimento primitivo, porém especializado (Winssat e Kallen, 1952). Quanto à função, admite-se a sua importância para a cópula em morcegos vespertilionídeos, onde ele provavelmente forma um bloqueio de coito com função análoga ao *bulbus glandis* encontrado em cães, ajudando assim a diminuta glândula a permanecer mais tempo dentro da vagina da fêmea, garantindo a eficácia da cópula (Winssat e Kallen, 1952).

Diversos pesquisadores sugerem que a seleção sexual seja a principal causa para a evolução da morfologia peniana, de modo a melhor se adaptar aos genitais femininos, entretanto poucos trabalhos abordam a morfologia de genitália feminina, dificultando as interpretações corretas sobre esse tema (Winssat e Kallen, 1952; Short, 1979; Harcourt et al., 1981; Patterson e Thaeler, 1982; Kenagy e Trombulak, 1986; Dixon 1987, 1976, 1995; Moller, 1988; Dahl et al., 1993; Arnqvist, 1997; Dixon et al., 2004; Ramm, 2007). O presente trabalho não avaliou o nível de especificidade entre os órgãos copulatórios de machos e fêmeas, porém acreditamos que uma análise destas estruturas possa colaborar na compreensão e elucidação de diversas dúvidas sobre a morfologia e evolução da genitália masculina.

Em conclusão, os dados do presente estudo geraram informações inéditas sobre a macro e a micro anatomia da glândula peniana de *C. abrasus*, *C. planirostris*, *M. temminckii* e *N. mattogrossensis*. Esses resultados permitiram a descrição em detalhe da estrutura da glândula dessas espécies,

bem como verificar que elas não possuem o osso peniano, comum a outras espécies de molossídeos. Essas diferenças, em associação com as variações morfológicas exibidas pelas espécies justificam os seus reconhecimentos como espécies distintas e dão reforço à diferenciação dos três gêneros dentro de Molossidae.

Agradecimentos

Pela bolsa de mestrado concedida pela FAPESP (2012/24288-0), pelo apoio financeiro das agências de fomento FAPESP (2009/16181-9 e 2013/11859-2) e CNPq - Processos 302008/2010-1 e 301073/2013-9. Ao suporte técnico concedido por Luiz Roberto Falleiros Júnior.

Referências

- Acosta, S. L.; Sánchez, G. H. A.; Cortez, E. Primer registro *Neoplatymops mattogrossensis* (Vieira, 1942) (Chiroptera), em Bolivia. 2006. *Kemffiana*. 2 (1): 134-139.
- Ammerman, L.K.; Lee, D.N.; Tipps, T.M. 2012. First molecular phylogenetic insights into the evolution of free-tailed bats in the subfamily Molossinae (Molossidae, Chiroptera). *Journal of Mammalogy*. 93: 12-28,
- Armstrong, K. N. 2005. A description and discussion of the penile morphology of *Rhinonictis aurantius* (Gray, 1845) (Microchiroptera: Hipposideridae). *Australian Mammalogy*. 27: 161-167
- Arnqvist, G. 1997. The evolution of animal genitalia distinguishing between hypotheses by single species studies. *Biological journal of Linnean Society*. 60: 365-379
- Aronson, L. R.; Cooper, M. L. 1967. Penile spines of the domestic cat: their endocrine-behavior relations. *Anatomical Records*. 157: 71-78
- Barquez, R. M.; Mares M. A.; Braun, J. K. 1999. The bats of Argentina. *Special Publications of Museum Texas Tech University*. 42: 1-275.
- Baryshnikov, G. F.; Olaf, R. P. Bininda-Emonds; Abramov, A. V. 2003. Morphological variability and evolution of the baculum (os penis) in mustelidae (carnivora). *Journal of Mammalogy*. 84(2): 673-690.

- Benda, P.; Tsytsulina K. 2000. Taxonomic revision of *Myotis mystacinus* group (Mammalia: Chiroptera) in the western Palearctic. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*. 64: 331-398.
- Burt, W.H. 1960. Bacula of North American mammals. *University of Michigan Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology*. 113: 1–75.
- Chimimba, C. T.; Kitchener, D. J. 1991. A systematic revision of Australian Emballonuridae (Mammalia: Chiroptera). *Records of the Western Australian Museum*. 15: 203-266.
- Cotterill, F. P. D. 2002. A new species of horseshoe bat (Microchiroptera: Rhinolophidae) from south-central Africa: with comments on its affinities and evolution, and the characterization of rhinolophid species. *Journal of Zoology*. 256:165-179.
- Dahl, J. E, Gould, K. G.; Nadler, R. D. 1993. Testicle size of orangutans in relation to body size. *American Journal Physical Anthropology*. 90: 229-236.
- Delbès, G.; Levacher, C.; Habert, R. 2006. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction Review*. 132:527–538.
- Dixon, A. F. (1976). Effects of testosterone on the sternal cutaneous glands and genitalia of the male greater galago (*Galago crassicaudatus crassicaudatus*). *Folia primatologica*. 126:207-212.
- Dixon, A.F.1987. Baculum length and copulatory behavior in primates. *American Journal of Primatology*. 7:51-60.
- Dixon, A. F. 1991. Penile spines affect copulatory behavior in a primate (*Callithrix jacchus*). *Physiology & Behavior*. 49(3):557-62
- Dixon, A.F. 1995. Baculum length and copulatory behaviour in carnivores and pinnipeds (Grand Order Ferae). *Journal of Zoology*. 235: 67–76.
- Dixon, A. F.; Nyholt, J.; Anderson, M. 2004. A positive relationship between baculum length and prolonged intromission patterns in mammals. *Acta Zoologica*. 50:490 -503.
- Emmons, L. H. and F. Feer. 1997. *Neotropical rainforest mammals: a field guide*. 2nd edition. The University of Chicago Press, Chicago
- Ercolani, G. B. 1868. Dei tessuti e degli organi crittilli. *Mem. Dell'Accad. Dell. Scienze*. 2,8:281-362.
- Faria, K. C.; Marchesin, S. R. C.; Moreira, P. R. L.; Beguelini, M. R.; Morielle-Versute, E. 2009. Short Communication. New insights into telomeric DNA sequence (TTAGGG) in location in bat chromosomes. *Genetics and Molecular Research*. 8(3):1079 – 1084.
- Freeman, P. W. 1981. A multivariate study of the family Molossididae (Mammalia, Chiroptera): morphology, ecology, evolution. *Fieldiana Zoology*. 7:1-105,

- Fooden, J. 2006. Comparative Review of Fascicularis-group Species of Macaques (primates: Macaca). *Fieldiana Zool.* 107:1-43.
- Gardner, A.L. (ed.). 2008. *Mammals of South America. Vol. 1. Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats*. Chicago University Press, Chicago.
- González-Ruíz, N.; Ramirez-Pulido, J.; Arroyo-Cabrales, J. 2011. A new species of mastiff bat (Chiroptera: Molossidae: *Molossus*) from Mexico. *Mammalian Biology*. 76:461-469.
- Gregorin R.; Taddei V.A. 2002. Chave artificial para a identificação de molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). *Journal of Neotropical Mammalogy*. 9:13-32
- Gregorin, R.; Chiquito, E. A. Revalidation of *Promops davisoni* Thomas (Molossidae). 2010. *Chiroptera Neotropical*. 16: 648-659.
- Harcourt, A. H.; Harvey, P. H.; Larson, S. G.; Short. R. V. 1981. Testis weight, body weight and breeding system in primates. *Nature*. 293:55-57.
- Herdina, A. N.; Herzig-Straschil, B.; Hilgers, H.; Metscher, B.D.; Plenk Jr, H. 2010. Histomorphology of the penis bone (baculum) in the gray long-eared bat *Plecotus austriacus* (Chiroptera, Vespertilionidae). *Anatomical Records*. 293:1248–1258.
- Herdina, A.N.; Hulva, P.; Horáček, I.; Benda, P.; Mayer, C.; Hilgers, H.; Metscher, B. D. 2014. MicroCT imaging reveals morphometric baculum differences for discriminating the cryptic species *Pipistrellus pipistrellus* and *P. pygmaeus*. *Acta Chiropterologica*. 16: 157- 168.
- Hill, J. E.; Harrison, D. L. 1987. The baculum in the Vespertilioninae (Chiroptera: Vespertilionidae) with a systematic review, a synopsis of *Pipistrellus* and *Eptesicus*, and the descriptions of a new genus and subgenus. *Bull. Br. Museum Nat Hist*. 52:225–305
- Hoofer, S. R.; Van Den Bussche, R. A. and Horáček, I. 2006. Generic status of the American *Pipistrellus* (Vespertilionidae) with description of a new genus. *Journal of mammalogy*. 87:981-992.
- Hooper, E. T. 1958. The male phallus in mice of the genus *Peromyscus*. *Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan*. 105:1-24.
- Hosken, D. J.; Stockley, P. 2004. Sexual selection and genital evolution. *Trends in Ecology and Evolution*. 19(2):87-93
- Jacobs, D.S.; Babiker, H.; Bastian, A.; Kearney, T.; van Eeden, R.; Bishop, J.M. 2013. Phenotypic convergence in genetically distinct lineages of a *Rhinolophus* species complex (Mammalia, Chiroptera). *Plos One*. 8(12):e82614.

- Kelly, D. A., 2000. Anatomy of the baculum-corpous cavernosum interface in the norway rat (*Rattus norvegicus*), and implications for force transfer during copulation. *Journal of Morphology*. 244: 69-77.
- Kenagy, G. J.; Trombulak, C. 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *Journal of Mammalogy*. 67:1-22.
- Koopman, K. F. Order Chiroptera. In: Wilson, D.E.; Reeder, D.M. 1993. *Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 2^a ed. Washington, Smithsonian Inst. Press. p.137-241.
- Koopman, K.F. 1994. *Chiroptera: systematics*. *Handbuch der Zoologie. Mammalia*. 8 parte 60. 217 pp.
- Krutzsch, P.H. 1975. Reproduction of the canyon bat, *Pipistrellus hesperus*, in Southwestern United States. *American Journal of Anatomy*. 143:163-200.
- Krutzsch, P. H.; Crichton, E.G. 1987. Reproductive biology of the male little mastiff bat, *Mormopterus planiceps* (Chiroptera: Molossidae), in southeast Australia. *American Journal of Anatomy*. 178: 352-368.
- Leite-Silva, C.; Santos, N.; Fagundes, V.; Yonenaga-Yassuda, Y.; Souza, M.J. 2003. Karyotypic characterization of the bat species *Molossus ater*, *M. molossus* and *Molossops planirostris* (Chiroptera, Molossidae) using FISH and banding techniques. *Hereditas*. 138:94-100.
- Lessa, E. P. and Cook, J. A. 1989. Interespecific variation in penial characters in the genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy*. 70:856- 860.
- Long, C. A. 1969. Gross morphology of the penis in seven species of the mustelidae. *Mus. Nat. Hist, and Dept. Biology, Wisconsin State Univ. Stevens Point, Wis.*. 1^o edição.v 33.
- Long, C.A.; Frank, T.1968. Morphometric variation and function in the baculum, with comments on correlation of parts. *Journal of Mammalogy*. 49: 32–43.
- Long, C. A., and C. J. Jones. 1966. Variation and frequency of occurrence of the baculum in a population of Mexican free-tailed bats. *Southwestern Association of Naturalists*. 11: 290-295.
- Machado, L. F.; Paresque, R.; Christoff, A. U. 2011. Anatomia comparada e morfometria de *Oligoryzomys nigripes* e *O. flavescens* (rodentia, sigmodontinae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pap. Avulsos Zool. (São Paulo)* [online]., n.3 51:29-47.

- Matthews, L. H., 1937. The form of the penis in the British rhinolophid bats, compared with that of the vespertilionid bats. *The Transactions of the Zoological Society of London*. 23: 213-223.
- Matthews, L. H., 1942. Notes on the genitalia and reproduction of some African bats. *Journal of Zoology, Proc. Zool. Soc. London Ser. B*. 3: 289–346.
- Morielle-Versute E.; Varella-Garcia M. and Taddei V.A. 1996. Karyotypic patterns of seven species of molossid bats (Molossidae, Chiroptera). *Cytogenetics and Cell Genetics*. 72: 26-33.
- Moller, A. P. 1988. Ejaculate quality, testes size and sperm competition in primates. *Journal of Human Evolution*. 17:479-488.
- Patterson , B.D.; Thaeler Jr., C. 1982. The mammalian baculum: hypotheses on the nature of bacular variability. *Journal of Mammalogy*. 63: 1-15.
- Perkin, A. 2007. Comparative penile morphology of East African galagos of the genus *Galagoides* (family Galagidae): implications for taxonomy. *American Journal of Primatology*. 69(1):16-26.
- Peters, S.L.; Lim, B.K.; Engstrom, M.D. 2002. Systematics Of Dog-Faced Bats (*Cynomops*) Based On Molecular And Morphometric Data. *Journal of Mammalogy*. 83(4):1097-1110
- Ramm, S. A., 2007. Sexual Selection and Genital Evolution in Mammals: A phylogenetic analysis of baculum length. *American Naturalist*. 169:360-369.
- Rauther, M. 1903. Bemerkungen über den Gentalapparat und die Analdriisen der Chiropteren. *Anat. Anz*. 23:508-524.
- Reis, N.L.; Perachi, A.L. Pedro, W.A. e Lima, I.P. (eds.). 2006. *Mamíferos do Brasil*. Universidade Estadual de Londrina, Brazil.
- Reis, N.L.; Perachi, A.L. Pedro, W.A. e Lima, I.P. (eds.). 2007. *Morcegos do Brasil*. Universidade Estadual de Londrina, Brazil
- Ribeiro, M. G.; Lima, S.R. 2000. Iniciação às técnicas de preparação de material para o estudo e pesquisa em morfologia. Belo Horizonte: SEGRAC-Editora e Gráfica Limitada. p 106.
- Ryan, J. M., 1991a. Comparative morphology of the glans penis in *Molossus*, *Promops* and *Eumops* (Chiroptera: Molossidae). Contributions to mammalogy in honor of Karl F. Koopman. *Bulletin of American Museum of Natural History*. 206: 122-137.
- Ryan, J. M., 1991b. Morphology of the glans penis in four genera of molossid bats (Chiroptera: Molossidae). *Journal of Mammalogy*. 72:658-668.

- Sachs, B. D.; Glater, G. B.; O'Hanlon, J. K. 1984. Morphology of the erect glans penis in rats under various gonadal hormone conditions. *Anatomical Records*. 210:45-52.
- Short, R. V. 1979. Sexual selection and its components, somatic and genital selection, as illustrated by man and the great apes. *Advances in the Study of Behavior*. 9:131-158.
- Smith, J. D.; Madkour, G. 1980. Penial morphology and the question of Chiroptera phylogeny. In Wilson, D.E., Gardner, A.L. (Eds.), Proceedings of the Fifth International Bat Research Conference. *Texas tech University press*. pp. 347-365.
- Smirnov DG, Tsytsulina K. 2003. The ontogeny of the baculum in *Nyctalus noctula* and *Vespertilio murinus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Acta Chiropterologica* 5: 117–123.
- Simmons, N. S.; Voss, R. S. 1998. The mammals of Paracou, French Guiana: a Neotropical lowland rainforest fauna. Part 1. Bats. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* n. 237:1-219.
- Simmons, N. B., 2005. Order *Chiroptera*. In Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference. *Johns Hopkins University Press*. pp. 312-529.
- Solari, S.; Martínez-Arias, V. Cambios recientes en la sistemática y taxonomía de murciélagos Neotropicales (Mammalia: Chiroptera). 2014. *Therya*. 5(1): 167-196
- Stockley, P. 2002. Sperm competition risk and male genital anatomy: comparative evidence for reduced duration of female sexual receptivity in primates with penile spines. *Evolutionary Ecology*. 16: 123–137.
- Williams, S.L.; Hafner, J.C.; Dolan, P.G. 1980. Glans penis and bacula of five species of *Apodemus* (Rodentia: Muridae) from Croatia, Yugoslavia. *Mammalia*. 44 (2): 245-258
- Wimsatt, W. A.; Kallen, F.C. 1952. Anatomy and histophysiology of the penis of a vespertilionid bat, *Myotis lucifugus lucifugus*, with particular reference to its vascular organization. *Journal of Morphology*. 90: 415-465.

Legendas das Figuras

Figura 1. Cortes histológicos da glânde de *Cynomops planirostris* (A, C e E) e *Molossops temminckii* (B, D e F) em diferentes níveis, do mais basal (A, B) para o mais apical (E, F). Coloração por Hematoxina Eosina e Tricrômico de Tushmman's blue. Cabeça de Setas: projeções epidérmicas; asterísco: tecido cavernoso difuso; UM: meato urinário; P: prepúcio; cc: corpo cavernoso; U uretra, seta: corpo esponjoso.

Figura 2. Imagem da glândula peniana de *C. abrasus* (A-C) e *C. planirostris* (D-F) após o procedimento de diafanização. A e D vista ventral; B e E vista dorsal; C e F vista lateral. PV: projeção ventral; D: domos; seta branca: sulco mediano ventral; seta preta: sulcos laterais; asterisco: sulco mediano dorsal; PD: projeção dorsal.

Figura 3. Imagem da glândula peniana de *M. temminckii* (A e B) e *Neoplatymops mattogrossensis* (C e D) após procedimento de diafanização. A e C representam a vista ventral e B e D a vista dorsal. MU: meato urinário; seta: sulcos laterais pareados (B) e sulcos pareados centrais menores (D); cabeça de seta: sulcos pareados centrais menores (B) e ranhuras dorso-laterais (D); asterisco: projeção mediana ventral; VF: fenda mediano-ventral.

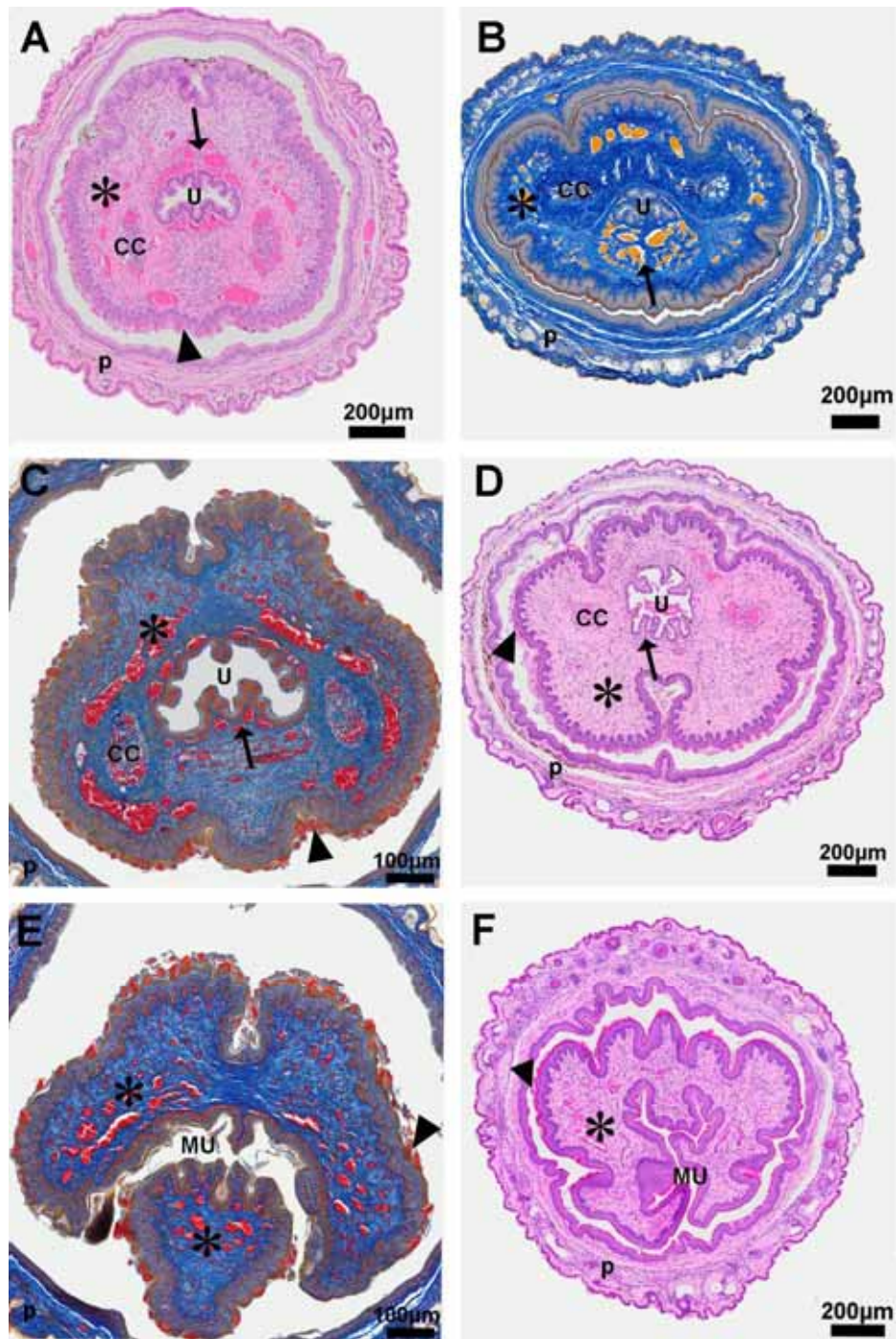


Figura 1. Cortes histológicos da glândula de *Cynomops planirostris* (A, C e E) e *Molossops temminckii* (B, D e F) em diferentes níveis, do mais basal (A, B) para o mais apical (E, F). Coloração por Hematoxina Eosina e Tricrômico de Tushmman's blue. Cabeça de Setas: projeções epidérmicas; asterísco: tecido cavernoso difuso; UM: meato urinário; P: prepúcio; cc: corpo cavernoso; U uretra, seta: corpo esponjoso.

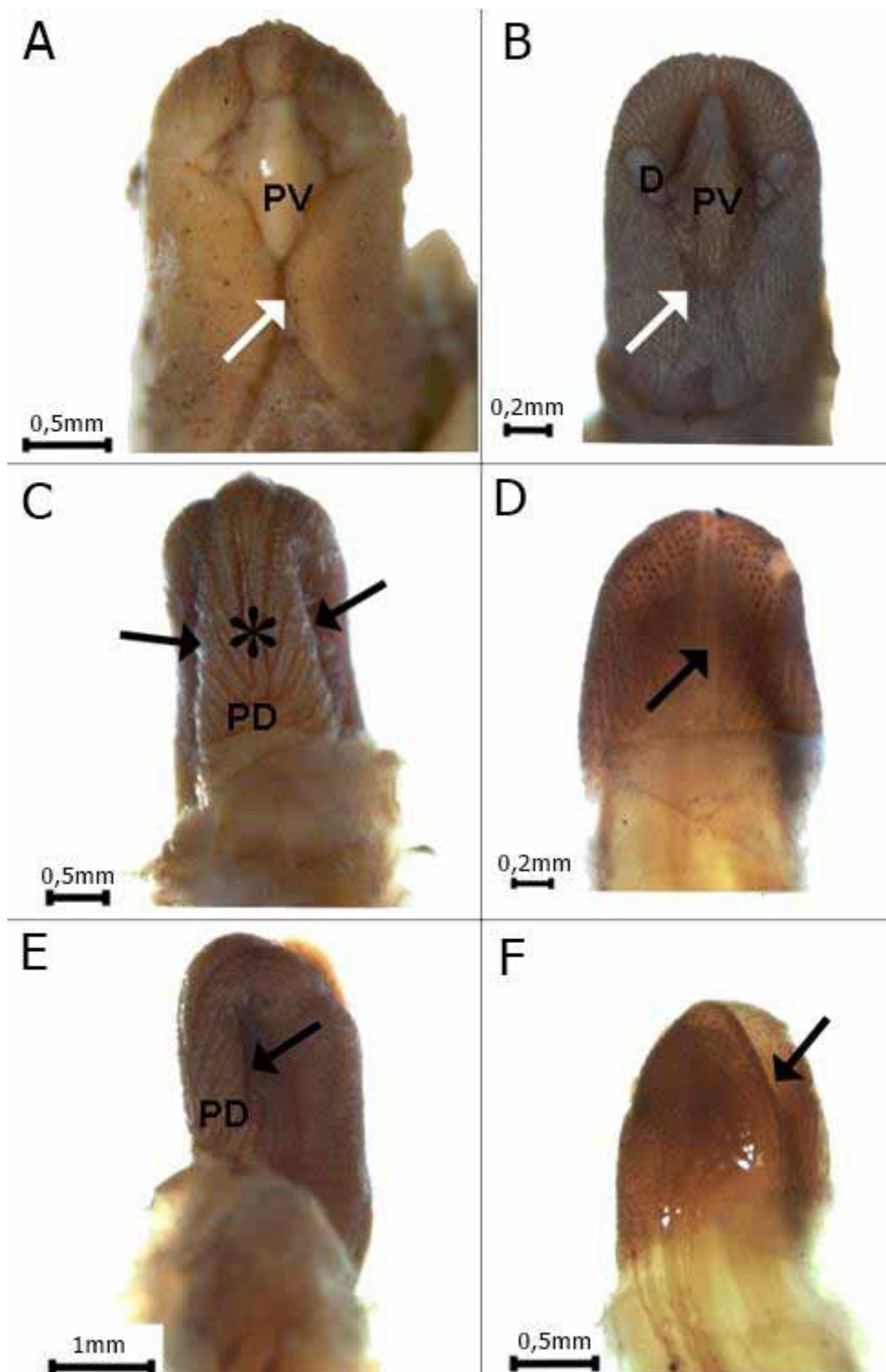


Figura 2. Imagem da glânde peniana de *C. abrasus* (A, C e E) e *C. planirostris* (B, D e F) após o procedimento de diafanização. A e B vista ventral; C e D vista dorsal; E e F vista lateral. PV: projeção ventral; D: domos; seta branca: sulco mediano ventral; seta preta: sulcos laterais; asterisco: sulco mediano dorsal; PD: projeção dorsal.

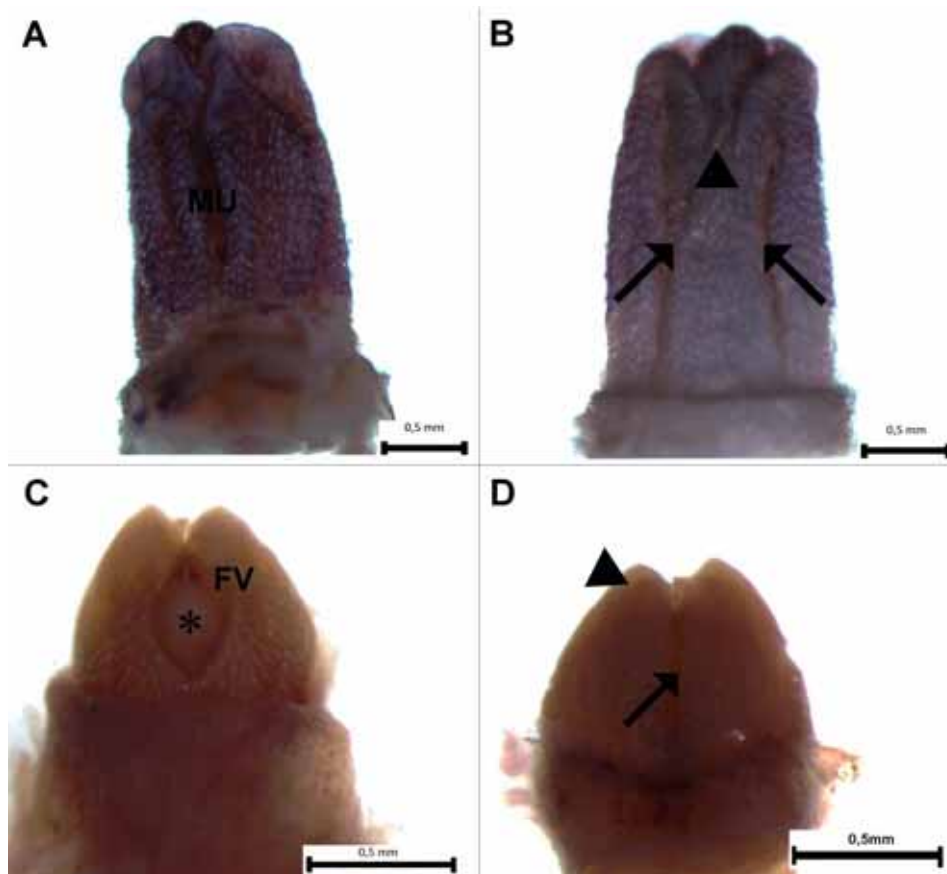


Figura 3. Imagem da glânde peniana de *M. temminckii* (A e B) e *Neoplatymops mattogrossensis* (C e D) após procedimento de diafanização. A e C representam a vista ventral e B e D a vista dorsal. MU: meato urinário; seta: sulcos laterais pareados (B) e sulcos pareados centrais menores (D); cabeça de seta: sulcos pareados centrais menores (B) e ranhuras dorso-laterais (D); asterisco: projeção mediana ventral; VF: fenda mediano-ventral.

VI.CAPÍTULO 3

**Análise da morfologia da glânde e do báculo das
espécies *Molossus molossus*, *Molossus*
rufus e *Nyctinomops laticaudatus*
(Chiroptera: Molossidae)**

**Análise da morfologia da glânde e do báculo das
espécies *Molossus molossus*, *Molossus
rufus* e *Nyctinomops laticaudatus* (Chiroptera: Molossidae)**

Comelis, M. T.^a, M.^a, Góes, R. M.^b, Morielle-Versute, E.^{a,*}

^aDepartamento de Zoologia e Botânica e ^bDepartamento de Biologia, Universidade do Estado de São Paulo, UNESP, Campus São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brasil.

*Autor correspondente. Tel.: +55 17 3221 2369; fax: +55 17 3221 2374.

E-mail: morielle@ibilce.unesp.br; emorielle@gmail.com (E. Morielle-Versute).

Palavras chave: Osso peniano; Genitália masculina; Pênis;

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Journal of Morphology*

Resumo

Molossus e *Nyctinomops* são constituídos por espécies exclusivamente neotropicais que apresentam grande similaridade entre si, distinguindo-se umas das outras, principalmente no tamanho das características diagnósticas principais. A dificuldade em delimitar essas e outras espécies de Chiroptera indicam a necessidade de uma melhor caracterização desses táxons. Duas características pouco exploradas e que provém caracteres taxonômicos são as morfologias da glânde peniana e do baculum, as quais têm auxiliado os taxonomistas na formulação de propostas de relacionamentos evolutivos em roedores, carnívoros e morcegos. Por isso, o objetivo do presente estudo foi analisar qualitativamente a morfologia do falo e do báculo de três espécies de morcegos desses gêneros, provendo dados adicionais para análises taxonômicas, bem como nos estudos da evolução da genitália de mamíferos. Os pênis das espécies foram analisados quanto à morfológica e histologia. Os resultados mostraram diferenças significativas na morfologia do báculo das espécies dos dois gêneros, porém pouca diferença entre as duas espécies de *Molossus*. Contudo, o padrão histológico do pênis foi similar nas três espécies. Em suma nossos resultados mostraram informações inéditas sobre a

histomorfologia da glândula peniana das espécies apresentadas, como por exemplo, a exata localização do tecido difuso e a morfologia dos báculos indicando que as características penianas são úteis aos estudos taxonômicos e sobre reprodução.

1. Introdução

Muitos dos caracteres taxonômicos utilizados para a identificação das espécies de Chiroptera referem-se à morfologia de estruturas externas e cranianas (Vizotto e Taddei, 1973; Yoshiyuki, 1989; Simmons, 2005). A essas se associam, em menor representação, caracteres morfológicos internos e mais recentemente, os estudos de moléculares, com ênfase para a sequência de genes ribossomais e nucleares (Freeman, 1981; Morielle-Versute et al., 1996; Barquez et al., 1999; Gregorin e Taddei, 2002; Lin, et al., 2002; Peters et al., 2002; Leite-Silva et al., 2003; Simmons 2005; Faria et al., 2009; Ammerman et al., 2012).

Alguns caracteres morfológicos refletem apenas a adaptação do animal a diferentes nichos ecológicos, o que dificulta a identificação da espécie e o estabelecimento de hipóteses de relacionamentos evolutivos. Em contrapartida, há muitos caracteres morfológicos que são pouco influenciados por fatores ambientais, podendo-se destacar, por exemplo, os caracteres morfológicos reprodutivos, especialmente a morfologia e constituição do pênis (Ryan, 1991; Armstrong, 2005; Herdina, 2010).

Molossus e *Nyctinomops* representam dois dos cerca de 20 gêneros que compõem a família Molossidae e são exclusivamente neotropicais (Simmons, 2005). O reconhecimento do número de espécies para o gênero *Molossus* é controverso: Freeman (1981) considerou oito, Koopman (1993) cinco, Dolan (1989), Nowak (1999) e Eger (2007) reconheceram sete e Simmons (2005) reconheceu oito e, recentemente, embasados em análises morfológicas González-Ruiz et al (2011) propuseram o reconhecimento de uma nova espécie,

M. alvarezii, que é muito semelhante a *M. sinaloae*. De forma geral os desacordos no reconhecimento dos táxons devem-se ao fato de que as espécies de *Molossus* são morfologicamente muito semelhantes, diferindo apenas no tamanho das características, não apresentando também variação nos seus cariótipos (Morielle-Versute et al., 1996; Leite-Silva et al., 2003).

Semelhante a *Molossus*, as espécies reconhecidas de *Nyctinomops* apresentam grande similaridade entre si, distinguindo-se umas das outras, principalmente no tamanho das características diagnósticas principais, representadas pelo comprimento do antebraço e medidas cranianas (Jones et al. 1972; Silva-Taboada, 1979; Koopman, 1982; Dolman et al., 2009). Presentemente são reconhecidas quatro espécies para o gênero, *N. aurispinosus* (Peale, 1848), *N. laticaudatus* (E. Geoffroy, 1805), *N. macrotis* (Gray, 1839) e *N. femorosaccus* (Merriam, 1889). *Nyctinomops laticaudatus* é a menor espécie do gênero, e variações morfológicas associadas à variação geográfica têm sido responsáveis pelo reconhecimento de subespécies para essa espécie (Simmons, 2005; Eger, 2007).

A dificuldade em delimitar essas e outras espécies de Chiroptera indica que a realização de diferentes estudos que possam contribuir no conhecimento detalhado dos táxons são necessários, especialmente para as espécies da América do Sul (Gregorin, 2000).

Duas características pouco exploradas e que provém caracteres taxonômicos são a morfologia da glândula peniana e do baculum ou osso peniano. Características exibidas por essas duas estruturas têm auxiliado diversos taxonomistas a formular propostas de relacionamentos evolutivos para táxons de roedores (Burt, 1936; Anderson, 1960; Machado et al., 2011) e carnívoros (Burt, 1960; Long e Frank, 1968; Long, 1969; Baryshnikov et al., 2003). Entretanto, poucos estudos têm utilizado a morfologia dessas estruturas para avaliações taxonômicas em Chiroptera, apesar destas se mostrarem importantes na categorização de alguns táxons deste grupo (Chimimba e Kitchener 1991; Ryan,

1991; Thomas et al., 1994; Benda e Tsytsulina 2000; Cotterill 2002; Herdina et al., 2014).

O báculo é considerado o osso mais diverso presente em vertebrados (Romer, 1970), contudo o seu valor adaptativo ainda é controverso (Burt, 1960; Bolton et al., 1996), assim como sua origem e função(ões). Apesar de não haver descrições de elementos fósseis desta estrutura, supõe-se que devido à ocorrência generalizada deste em diversos grupos de Mammalia (Carnivora, Primates, Chiroptera, Insectivora e Carnivora) ele não seja uma aquisição recente (Burt e Barkalow, 1946).

Assim como o báculo, a morfologia da glândula peniana difere consideravelmente entre as espécies de mamíferos, mesmo quando a morfologia geral apresenta pouca variação (Arnqvist, 1997), e pouco ainda se sabe sobre a evolução das características da genitália externa nos diferentes grupos. Recentemente muitos pesquisadores têm tentado elucidar essa questão (Dixon, 1989; Eberhard e Cordeiro, 1995; Hufford, 1996; Arnqvist, 1998; Cayetano et al., 2011) e basicamente três teorias foram elaboradas; a hipótese de chave-fechadura, a hipótese da pleiotropia e por último a hipótese de seleção sexual, que atualmente vem sendo mais discutida.

O que se tem muito claro, é que para qualquer interpretação sobre a evolução dos caracteres, se faz necessário primeiramente, identificar e descrever as características para os diferentes táxons e sexos. Por isso, o objetivo do presente estudo foi analisar qualitativamente a morfologia do falo e do báculo de três espécies de morcegos molossídeos: *Molossus rufus*, *Molossus molossus* e *Nyctinomops laticaudatus* provendo dados adicionais para serem utilizados nas análises taxonômicas destes gêneros, bem como nos estudos da evolução da genitália de mamíferos.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

Vinte e dois espécimes machos adultos representantes dos táxons *M. molossus* (8), *M. rufus* (8) e *N. laticaudatus* (6) foram utilizados nas análises. Para melhor eficácia dos procedimentos aplicados separamos os espécimes em dois grupos: recém-coletados e colecionados, sendo os primeiros, utilizados nas análises histológicas e os últimos nas análises morfológicas.

Os espécimes vivos foram coletados entre 2013 e 2014 (IBAMA Processo: 02027.001957/2006-02) com a utilização de redes do tipo “mist-nets” dispostas nas saídas dos abrigos. Os animais coletados foram transportados para o laboratório onde foram mantidos em gaiolas *ad libitum* até serem processados. Após a obtenção do material necessário para o estudo os animais foram fixados com formol e depositados como espécimes-testemunho na Coleção Científica de Chiroptera (DZSJRP) do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP) de São José do Rio Preto, SP. Os espécimes colecionados (fixados e preservados em álcool) foram provenientes da mesma coleção.

Para comparação com outros trabalhos sobre o assunto foi adotada a terminologia sugerida por Hooper (1958) e Smith e Madkour, (1980) no reconhecimento da glândula do pênis de mamíferos, onde esta representa apenas a parte distal do pênis após a separação do prepúcio e da glândula.

2.2. Análise histológica

Na análise histológica foram utilizados três espécimes de cada espécie. Após a morte dos animais por constrição cervical o pênis de cada indivíduo foi retirado por meio de um corte na base da implantação e fixado em paraformaldeído tamponado (48h). Este foi então desidratado em uma série de etanol (50% a 100%) e xilol e então incluído em parafina. Os pênis foram seccionados transversalmente a uma espessura de 5µm (micrótomo Leica RM 2155), e as secções, após serem colocadas sobre lâminas de vidro foram

coradas com Hematoxilina-Eosina (Ribeiro e Lima, 2000) para a identificação da estrutura geral da glândula peniana e tricrômico de Tushmman's blue (Delbès et al., 2004), para a marcação das células musculares lisas.

As lâminas com os cortes corados foram analisadas e fotografadas em microscopia óptica (Scanner de imagens Olympus BX-VCB), com auxílio de software de captura e análise de imagem (*software* VS-ASW), para observação dos tecidos componentes da estrutura peniana, posição, forma e composição do báculo.

2.3. Análise morfológica da glândula e do báculo

Para análise morfológica da glândula e do báculo, os pênis de cinco indivíduos de cada espécie foram retirados e submetidos ao processo de diafanização.

O protocolo do procedimento envolveu a desidratação do órgão em álcool etílico (50% e 100%), a neutralização em solução de borato de sódio saturado e a digestão dos tecidos com solução alcalina de tripsina (solução de borato de sódio saturada + tripsina 5%), seguida da coloração com Alizarina Vermelha (solução de KOH 1% + solução alizarina vermelha 1%), por duas horas, para a identificação da estrutura óssea (báculo). Em seguida foram transferidos para uma solução de glicerina (60%) em KOH (1%), onde permaneceram por uma semana e, posteriormente, foram mantidos preservados em solução de glicerina 100%. Para maior eficácia do procedimento após a digestão tecidual retirou-se o prepúcio dos pênis, expondo a glândula, de modo a facilitar a penetração do corante no osso peniano.

3. Resultados

4.1. Morfologia externa da glânde

4.1.1. *Molossus molossus* e *M. Rufus*

A glânde de *M. molossus* e *M. rufus* são muito semelhantes, possuindo o formato cônico, que se afila em direção à extremidade distal (Figura 1 A-D), com média aproximada de 5,59mm e 4,47mm respectivamente. A glânde é arredondada na base, e a cerca de 2/3 do comprimento da superfície dorsal há um sulco profundo, o sulco mediano-dorsal (SD), em formato de V, que se amplia em direção à porção mais apical, e circunda a porção subapical da glânde até a superfície ventral, onde compõe, juntamente com a porção terminal dos corpos cavernosos acessórios, a borda superior do meato urinário (Figura 1 A-D). O sulco mediano-dorsal apresenta uma pequena crista mediana em seu interior, que percorre todo comprimento do sulco até a porção mais apical trilobulada da glânde, onde se torna mais espessa e forma a crista mediana do lóbulo central. Em *M. rufus* a crista apresenta uma fileira de projeções epidérmicas espiniformes, condição compartilhada por *M. molossus* (Figura 1 A e C). Ainda no nível do sulco, a crista mediana é circundada por duas ranhuras pareadas, que percorrem as porções mediano-terminais do sulco.

A extremidade distal é trilobulada sendo um lóbulo central ou mediano (LM), e dois lobulos laterais: um direito (LD) e um esquerdo (LE) (Figura 1 A e C). O lóbulo central apresenta na sua superfície dorsal uma crista mediana, e em sua superfície ventral um acúmulo de tecido: o monte bacular, que engloba o báculo (Figura 1 B e D).

A superfície ventral da glânde apresenta dois sulcos laterais profundos (SL) que percorrem toda sua extensão, até a constrição do meato urinário, e na região central, uma elevação em formato cilíndrico (PV), que abriga em seu interior a uretra e o corpo esponjoso. Esta elevação percorre toda a porção

ventral, até a porção do meato subapical, onde a uretra se exterioriza (Figura 1 B-D).

Externamente, a glândula apresenta-se revestida por estruturas epidérmicas espiniformes, mais largas na base, com as extremidades voltadas para a região proximal e dispostas em fileiras ao longo de todo o comprimento da glândula (Figura 1 A-D). Apenas a porção interna do sulco mediano-dorsal e o monte bacular não apresentam as projeções.

O baculo, localizado no lóbulo mediano (monte bacular) da extremidade trilobulada da glândula é representado por uma estrutura óssea com média aproximada de 0,26mm em *M. molossus* e 0,24mm em *M. rufus*. A morfologia é semelhante nas duas espécies: em forma de um bastão ou haste com as extremidades arredondadas (Figura 2 A-E).

4.1.2. *Nyctinomops laticaudatus*

A glândula de *N. laticaudatus* possui aproximadamente 2,73mm de comprimento e, de maneira semelhante às espécies de *Molossus*, apresenta a forma cônica, mais larga na base afinando-se sutilmente em direção ao ápice, onde termina em um monte bacular arredondado. Também é revestida externamente por projeções epidérmicas espiniformes, porém estas são menores e mais esparsas que em *M. molossus* e *M. rufus*. As projeções epidérmicas estão ausentes apenas no monte bacular e na fenda do meato urinário. (Figura 1 E-F).

Ventralmente a glândula é marcada por vários sulcos longitudinais, sendo o sulco mediano o mais profundo (SV). Na região subapical encontra-se uma fenda circular que envolve toda a porção ventral, o meato urinário, que separa ventralmente a porção terminal da glândula em uma pequena ponta arredondada, o monte bacular. Dorsalmente a glândula é marcada pela presença de um par de sulcos medianos (SD) que percorrem toda a extensão da glândula (Figura 1 E-F)

O báculo foi visualizado na porção mais apical da glândula, e tem um comprimento médio de 0,64mm. Apenas a parte final deste encontra-se no monte bacular. A morfologia do báculo é de difícil descrição. Quando visto lateralmente é estreito e retilíneo até dois terços do comprimento total, alargando-se lateralmente na direção ventral no terço restante. Quando visto dorsal ou ventralmente apresenta a forma de uma seta com a base triangular e o meio e o ápice retilíneos. (Figura 2 F-H)

4.2. Morfologia interna

A constituição histológica da glândula é muito semelhante nas três espécies analisadas. O epitélio da glândula possui espessa camada de queratina, que forma a maior parte das projeções epidérmicas presentes nessas espécies (Figuras 3 e 4). Estas possuem formato de cabeça de seta ou triângulo, sendo mais largas na base de implantação e mais estreitas no ápice.

O corpo cavernoso está localizado dorsalmente. Nas espécies de *Molossus* ele está dividido por um septo, quando é observada a região proximal do pênis e por dois septos quando observada a região intermediária da glândula (Figura 3 A-D). Em *Nyctinomops laticaudatus* o corpo cavernoso é dividido por um septo em toda extensão da glândula (Figura 4 A e B). Este tecido é bem desenvolvido, preenchendo a maior parte da porção dorsal da glândula peniana, e estendendo-se por quase todo o seu comprimento, não sendo visualizado apenas na porção mais apical, nos lóbulos apicais em *Molossus* e no monte bacular em *Nyctinomops* (Figuras 3 E e F e 4 C-E). Delimitando-o está a túnica albugínea, uma espessa camada de tecido conjuntivo denso não modelado e fibras musculares lisas (Figuras 3 A-D e 4 A e B).

Ventralmente e circundando a uretra está o tecido esponjoso da uretra. Ele é formado por uma massa de tecido erétil consideravelmente menos desenvolvida que os corpos cavernosos (Figuras 3 A-C e 4 A e B). Está presente por quase toda a glândula peniana, não sendo mais visível após o meato urinário, quando a uretra exterioriza-se. Sua túnica albugínea apresenta

constituição semelhante à túnica do tecido cavernoso sendo, porém, vizivelmente menos espessa que esta.

A uretra é constituída de epitélio estratificado de transição (Figuras 3 A-C e 4 A e B), e percorre grande parte do comprimento da glândula, exteriorizando-se ao nível do meato urinário, a nível subapical na superfície ventral do pênis.

Além dos dois tecidos eréteis já citados, as três espécies apresentam ainda, uma terceira massa de tecido éretil, o qual foi denominado tecido erétil difuso, por apresentar um grau menor de organização, quando comparado aos outros, e de não estar delimitado por uma túnica. Ele foi observado em toda a extensão da glândula, circundando esta dorsalmente em porções mais basais e formando duas massas teciduais nas laterais e nas porções mais intermediário-apicais da glândula, voltando a se unificar na porção mais apical.

A localização do báculo foi confirmada. Nas espécies de *Molossus* ele está localizado totalmente no monte bacular da porção terminal trilobulada da glândula, e em *N. laticaudatus* no último terço apical da glândula, sendo que apenas a porção final do báculo alcança o monte bacular. O báculo possui constituição essencialmente óssea, não apresentou canal medular e possui uma espessa e bem delimitada camada de periósteo ao seu redor (Figura 2 F-H). Ele está ainda circundado pela parte final do tecido erétil difuso e por tecido conjuntivo.

5. Discussão

As espécies *M. molossus* e *M. rufus* são muito semelhantes em morfologia externa, diferindo em poucas características, em geral por variações no tamanho. Ambas podem ser distinguidas de *N. laticaudatus*, por não possuírem o lábio superior acentuadamente pregueado, condição compartilhada apenas por *Nyctinomops* e *Tadarida* (Gregorin e Taddei, 2002), o que fez com que *N. laticaudatus* fosse sinonimizada de *Tadarida laticaudata* por Jones e Alvarez (1962).

Os resultados do presente estudo apesar de revelarem similaridades entre elas, também mostraram algumas diferenças. Quando se considera a composição e o arranjo histológico da glândula, o que se observou foi uma grande similaridade, evidenciada na disposição dos tecidos cavernosos e difuso na glândula e no espesso periósteo encontrado ao redor do báculo de todas as espécies. Esta última característica não havia sido observada em nenhuma outra espécie de Molossidae já analisada. Contudo, ao se observar a glândula externamente e também a morfologia do báculo, verifica-se que as três espécies apresentam diferenças, que são mais significativas quando se comparam as espécies de gêneros diferentes.

Wrobel e Bergmann (2006), baseando-se na predominância de tecido erétil ou conectivo do pênis classificaram-no em três tipos: vascular, onde predominam os tecidos eréteis, fibroelástico, onde prevalecem os tecidos fibroelásticos e intermediário, onde não há prevalência de um tecido sobre o outro. O pênis dos espécimes analisados foi classificado como vascular característica típica encontrada na maioria dos mamíferos.

Embora a estrutura peniana interna seja classificada apenas nessas três categorias, a morfologia da glândula e do báculo apresenta grande variação morfológica entre as espécies de mamíferos. O báculo está presente em pelo menos cinco ordens de Eutheria: Rodentia, Insectivora, Chiroptera, Carnivora e Primates, e em muitos casos sugere-se que a morfologia do báculo controla a morfologia da glândula peniana (Kitchener et al., 1996). Um exemplo em Chiroptera é o que se observou em *Hipposideros bicolor* em que o báculo bifurcado é acompanhado por um inchaço distal da glândula (Kitchener et al., 1996).

No presente estudo, não é possível afirmar que a morfologia do báculo controla ou define a morfologia da glândula, mas isso parece ser verdade, tendo em vista que nas duas espécies de *Molossus*, em que o báculo é muito semelhante, a glândula também é, enquanto que em *N. laticaudatus*, a morfologia do báculo é muito diferente ao das outras espécies, e a glândula acompanha essa diferenciação.

Ryan (1991 a,b), embora tenha utilizado a denominação de monte bacular para a região da glândula associada ao báculo, na maioria das espécies de molossídeos que analisou, denominou diferentemente a estrutura similar observada em *Nyctinomops*, atribuindo-lhe o nome de “capuz uretral”. No nosso estudo optamos por manter a terminologia aplicada às demais espécies, por acreditarmos se tratar da mesma estrutura. A diferença na aplicação dos nomes às estruturas semelhantes pode ser consequência das diferenças morfológicas observadas pelo autor nessas estruturas. O trabalho de Ryan foi pioneiro, apesar disso, ele carece de informações visuais mais detalhadas, especialmente dos báculos. O nosso trabalho é o primeiro a apresentar imagens reais (não esquemáticas) dos báculos de *M. molossus*, *M. rufus* e *N. laticaudatus*. O mesmo pode ser dito para a constituição histológica da estrutura da glândula, que mostrou muitas semelhanças entre as espécies, inclusive para a representação do tecido difuso, que Ryan disse variar nessas espécies.

Burt (1936) propôs que a variação interespecífica observada no báculo deve-se a pleiotropia, porém após novas informações serem acrescentadas evidenciando mais detalhes sobre o báculo Patterson e Thaeler (1982) concluíram que essa teoria não era apropriada, e sugeriram que o báculo possivelmente apresenta uma função espécie-específica na reprodução, e por isso teria um possível papel no isolamento reprodutivo. Juntamente com essa ideia outros autores propuseram que o báculo teria uma implicação taxonômica restrita a espécies, uma vez que os mecanismos de isolamento reprodutivo tendem a serem altamente divergentes entre espécies simpátricas ou intimamente relacionadas. Consequentemente, estes seriam úteis na diagnose de espécies, mas teriam valor limitado a níveis mais elevados de classificação (Howell, 1938; Marler, 1957; Callahan, 1976).

Diferentes dos autores acima, Burt (1936), Hamilton (1946) e Anderson (1960), acreditavam que o báculo teria um valor maior para o agrupamento das espécies no nível genérico. Os resultados do nosso estudo corroboram esse pressuposto, pois conforme verificamos, as diferenças mais significativas na

morfologia das estruturas analisadas ocorreram entre as espécies dos dois gêneros, enquanto pouca diferença foi detectada no nível específico. Trabalhos anteriores (Ryan, 1991 a,b; Comelis et al., in preparação) onde foram avaliadas espécies de outros gêneros de Chiroptera obtiveram resultados semelhantes corroborando também com essa proposta dos autores

Em contrapartida, a função do báculo é difícil de ser estabelecida. Apesar de não se conhecer a sua exata função, varias propostas têm sido atribuídas a ele como, por exemplo, que possui papel direto na cópula provendo suporte adicional ao pênis ao envolver o corpo esponjoso e a uretra (Romer, 1970; Dixson, 1987, 1995) que facilitaria a intromissão do pênis, facilitando a abertura da vagina da fêmea (Ruth, 1934; Long e Frank, 1968) ou ainda, que estimularia a fêmea durante a cópula, induzindo a ovulação ou preparando o útero para a implantação (Patterson e Thaeler, 1982).

Qualquer adaptação que facilite a penetração na fêmea deve ser considerada, principalmente em conjunto para um melhor entendimento da cópula nesses animais. Assim tanto a presença do báculo quanto a morfologia da glândula e da genitália feminina devem ser analisadas conjuntamente para uma melhor compreensão da função.

As explicações tradicionais para a evolução genital envolvem conceitos dos mecanismos de chave-fechadura, evitando a formação de híbridos e a acumulação de efeitos pleiotrópicos, onde a genitália teria evoluído de forma neutra e teria acumulado uma porcentagem de variações interespecíficas (Patterson e Thaeler 1982; Eberhard 1985; Edwards 1993).

Atualmente uma das teorias mais discutidas para a evolução genital é a da seleção sexual (Hosken e Stockley, 2004; Ramm, 2007; Rowe e Arnqvist, 2011; Simmons, 2014). Esta poderia agir por mecanismos pré- ou pós-copulatórios. No primeiro pela atração de fêmeas e garantia da cópula (Bertin e Fairbairn 2005; Langerhans et al., 2005), no segundo, por meio da competição de esperma e escolha crítica da fêmea para “genes melhores” ou “filhos mais sexys” ou mais competitivos (Eberhard 1985; Hosken e Stockley 2004; Ramm, 2007).

Esses processos de co-evolução genital são mais intensos em espécies promiscuas que em espécies monogâmicas, onde a morfologia genital evolui mais lentamente (Arnqvist 1998). Análises em primatas e carnívoros não felídeos revelam que o báculo tende a ser maior e a genitália mais complexa em espécies onde as fêmeas copulam com diversos machos (Dixon 1987; Verrell 1992; Ferguson e Larivière 2004). De maneira similar, níveis maiores de competição espermática aparentemente favorecem o aumento do comprimento do pênis em roedores (Ramm, 2007). Porém, as análises para morcegos não encontraram um elo entre competição espermática e comprimento do báculo, o que sugere a presença de múltiplos fatores influenciando a evolução genital, e que a importância de cada um deles possivelmente varia entre os grupos (Ramm, 2007).

Comparativamente a humanos, a glândula em morcegos se constitui de maneira diferente. O corpo esponjoso percorre toda a glândula até a exteriorização da uretra no nível do meato urinário, tornando-se mais fino e em pouca concentração em porções mais superiores. Como consequência não há a dilatação final encontrada em humanos para formar uma glândula peniana verdadeira. Assim, de acordo com o proposto por Hooper (1958) e Smith e Madkour, (1980), a glândula seria apenas a parte distal do pênis após a separação do prepúcio e da glândula. O baixo grau de desenvolvimento do tecido esponjoso da uretra é considerado uma característica primitiva para o grupo.

Os molossídeos têm sido caracterizados pela presença nos táxons, de um pênis penduloso com prepúcio fino e retrátil (Matthews 1937, 1941) e com a presença de projeções epidérmicas no revestimento externo da glândula (Ryan, 1991), condição observada nas espécies analisadas.

Estruturas espiniformes - projeções epidérmicas - no revestimento externo da glândula têm sido encontradas em diversas ordens em Mammalia e em táxons específicos de Chiroptera, sendo uma característica compartilhada entre a maioria dos táxons de molossídeos (Ryan, 1991 a,b; Comelis et al., *in preparação*), porém não é compartilhada por todas as famílias de Chiroptera,

pois não foram observadas nas espécies de Vespertilionidae e Miniopteridae analisadas (Winsatt e Kallen, 1952; Ryan, 1991; Comelis, et al., in preparação). Em algumas espécies de molossídeos eles foram substituídos por fileiras de papilas modificadas como em *Tadarida brasiliensis* e *T. aegyptiaca* (Ryan, 1991) condição que dá suporte a proposta de Freeman (1981) para separação de *Tadarida* e *Nyctinomops*. Assim como para espécies de primatas, a presença das projeções epidérmicas em Chiroptera é considerada uma condição mais basal. Entre as funções atribuídas às projeções espiniformes estão à remoção de plugs copulatórios, a estimulação do trato reprodutivo da fêmea e a manutenção do coito (Arosen e Cooper, 1967; Sachs et al., 1984; Kruttsch e Crichton, 1987).

Outra característica comum à glândula de molossídeos é a presença do tecido erétil difuso, que é encontrado em vários táxons de Molossidae, como *Molossops*, *Neoplatymops* e *Cynomops* (Comelis, et al., in preparação). Porém, assim como para as projeções esta característica não está uniformemente distribuída pelo clado (Smith e Madkour, 1980; Ryan, 1991). Dados da literatura apontam que a presença deste tecido também representa uma característica basal para o grupo dos Chiroptera.

Assim, constatamos que a glândula peniana das espécies apresentadas possuem muitas características atribuídas à família Molossidae, apoiando a validade dessas características como caracteres taxonômicos. Constatamos também a diferença existente na morfologia do báculo entre os gêneros, sugerindo que possa sim vir a ser utilizado para taxonomia do grupo, e que maiores pesquisas envolvendo mais espécies de Chiroptera são necessárias para se comprovar o real valor da característica e a que nível taxonômico melhor se aplica. Em suma nossos resultados mostraram informações ainda não exibidas sobre a histomorfologia da glândula peniana de *M. molossus*, *M. rufus* e *N. laticaudatus* que podem ser úteis em futuros estudos sobre reprodução, morfologia da genitália e que podem colaborar para a taxonomia no grupo.

Agradecimentos

Pela bolsa de mestrado concedida pela FAPESP (2012/24288-0), pelo apoio financeiro das agências de fomento FAPESP (2009/16181-9 e 2013/11859-2) e CNPq - Processos 302008/2010-1 e 301073/2013-9. Ao suporte técnico concedido por Luiz Roberto Falleiros Júnior.

Referências

- Ammerman, L.K.; Lee, D.N.; Tipps, T.M. 2012. First molecular phylogenetic insights into the evolution of free-tailed bats in the subfamily Molossinae (Molossidae, Chiroptera). *Journal of Mammalogy*. 93:12-28.
- Anderson, S. 1960. The baculum in microtine rodents. Univ. Kansas Publ., Mus. Nat. Hist. 12:181-216
- Armstrong, K. N. 2005. A description and discussion of the penile morphology of *Rhinonictis aurantius* (Gray, 1845) (Microchiroptera: Hipposideridae). *Australian Mammalogy*. 27: 161-167
- Arnqvist, G., Thornhill, R. and Rowe, L. 1997. Evolution of animal genitalia morphological correlates of fitness components in water strider. *Journal of Evolutionary Biology*. 10:613-640
- Arnqvist, G. 1998. Comparative evidence for the evolution of genitalia by sexual selection. *Letters to Nature*. 393:748-786.
- Aronson, L. R.; Cooper, M. L. 1967. Penile spines of the domestic cat: their endocrine-behavior relations. *Anatomical Records*. 157: 71-78
- Baryshnikov, G.F.; Olaf R.; Bininda-Emonds, P.; Abramov, A. V. 2003. Morphological variability and evolution of the baculum (os penis) in mustelidae (carnivora). *Journal of Mammalogy*. 84(2): 673-690.
- Barquez, R. M.; Mares, M. A.; Braun, J. K. 1999. The bats of Argentina. *Special Publications of Museum Texas Tech University*. 42: 1-275.
- Benda, P.; Tsytsulina, K. 2000. Taxonomic revision of *Myotis mystacinus* group (Mammalia:Chiroptera) in the western Palearctic. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*. 64: 331-398.

- Bertin, A.; Fairbairn, D. J. 2005. One tool, many uses: precopulatory sexual selection on genital morphology in *Aquarius remigis*. *Journal of Evolutionary Biology*. 18:949–961.
- Bolton, L.A.; Camby, D.; Boomker, J. 1996. Aberrant migration of *Ancylostoma caninum* to the os penis of a dog. *Journal of South African Veterinary Association*. 67:161-162.
- Burt, H. W. 1936. A study of the baculum in the genera *Perognathus* and *Dipodomys*. *Journal of Mammalogy*. 17: 145-156.
- Burt, W. H.; Barkalow Jr. F. S. 1946. A Comparative Study of the Bacula of Wood Rats (Subfamily Neotominae). *Journal of Mammalogy*. 23(3): 287-297
- Burt, W.H. 1960. Bacula of North American mammals. *University of Michigan Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology*. 113:1–75.
- Callahan, J. R. 1976. *Systematics and biogeography of the Eutamias obscurus complex (Rodentia: Sciuridae)*. Unpubl. Ph.D. dissert., Univ. Arizona, Tucson, 184 pp.
- Cayetano, L.; Maklakov, A. A.; Brooks, R. C.; Bonduriansky, R. 2011. Evolution of male and female genitalia following release from sexual selection. *Evolution*. 65-8:2171–2183
- Chimimba, C. T.; Kitchener, D. J. 1991. A systematic revision of Australian Emballonuridae (Mammalia: Chiroptera). *Records of the Western Australian Museum*. 15: 203-266.
- Cotterill, F. P. D. 2002. A new species of horseshoe bat (Microchiroptera: Rhinolophidae) from south-central Africa: with comments on its affinities and evolution, and the characterization of rhinolophid species. *Journal of Zoology*. 256:165-179.
- Dixon, A.F., 1987. Baculum length and copulatory behavior in primates. *American Journal of Primatology*. 7:51-60.
- Dixon, A. F. 1989. Sexual Selection, Genital Morphology, and Copulatory Behavior in Male Galagos. *International Journal of Primatology*. 10 n° 1.
- Dixon, A.F. 1995. Baculum length and copulatory behaviour in carnivores and pinnipeds (Grand Order Ferae). *Journal of Zoology*. 235:67–76.
- Dolman, R. W. 2009. *Molecular Systematics Of Nyctinomops (Chiroptera: Molossidae)*. Tese de mestrado.
- Dolan, P. G. 1989. Systematics of Middle American Mastiff Bats (*Molossus*). *Special Publications The Museum Texas Tech University*. 29(1): 1-71.
- Eberhard, W. G. 1985. Sexual selection and animal genitalia. *Harvard Univ. Press*, Cambridge, MA.
- Eberhard, W. G.; Cordero, C. 1995. Sexual selection by cryptic female choice on male seminal products - a new bridge between sexual selection and reproductive physiology. *Trends in Ecology & Evolution*. 10(12):493-6.

- Edwards, R. 1993. Entomological and mammalogical perspectives on genital differentiation. *Trends in Ecology & Evolution*. 8:406–409.
- Eger, J. L. Family Molossidae. (P. Gervais, 1856). 2007. In *Mammals of South America. Vol. 1, Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*. P. 399-440. (A.L. Gardner, ed). The University Chicago Press, Chicago, xx+669 pp.
- Faria, K. C.; Marchesin, S. R. C.; Moreira, P. R. L.; Beguelini, M. R.; Morielle-Versute, E. 2009. Short Communication. New insights into telomeric DNA sequence (TTAGGG) in location in bat chromosomes. *Genetics and molecular research*. 8:1079 – 1084.
- Ferguson, S. H., and S. Larivière. 2004. Are long penis bones an adaptation to high latitude snowy environments? *Oikos*. 105:255– 267.
- Freeman, P. W. 1981. A multivariate study of the family Molossidae (Mammalia, Chiroptera): morphology, ecology, evolution. *Fildiana Zool.* 7:1-105
- Gregorin, R. *Filogenia de Molossidae Gervais, 1856 (Mammalia: Chiroptera)*. 247 f. Tese (Doutor em Ciência) - Universidade de São Paulo, 2000.
- Gregorin R.; Taddei V.A. 2002. Chave artificial para a identificação de molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). *Journal of neotropical mammalogy*. 9: 13-32
- González-Ruíz, N.; Ramirez-Pulido, J.; Arroyo-Cabrales, J. 2011. A new species of mastiff bat (Chiroptera: Molossidae: *Molossus*) from Mexico. *Mammalian Biology*. 76:461-469.
- Hamilton, W. J. JR. 1946. A study of the baculum in some North American Microtinae. *Journal of Mammalogy*. 27:378-387.
- Herdina, A. N.; Herzig-Straschil, B.; Hilgers, H.; Metscher, B.D.; Plenk Jr, H. 2010. Histomorphology of the penis bone (baculum) in the gray long-eared bat *Plecotus austriacus* (Chiroptera, Vespertilionidae). *Anatomical Records*. 293:1248–1258.
- Herdina, A.N., Hulva, P., Horáček, I., Benda, P., Mayer, C., Hilgers, H., Metscher, B. D. 2014. MicroCT imaging reveals morphometric baculum differences for discriminating the cryptic species *Pipistrellus pipistrellus* and *P. pygmaeus*. *Acta Chiropterologica*. 16:157- 168.
- Howell, A. H. 1938. Revision of the North American ground squirrels, with a classification of the North American Sciuridae. *North American Fauna*. 56:1-256.
- Hooper, E. T. 1958. The male phallus in mice of the genus *Peromyscus*. *Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan*. 105:1-24.
- Hosken, D. J. and Stockley, P. 2004. Sexual selection and genital evolution. *Trends in Ecology & Evolution*. 19(2):87-93

- Hufford, L. 1996. The Morphology and Evolution of Male Reproductive Structures of Gnetales. *International Journal of Plant Sciences*. 157(6): S95-S112
- Jones, J. K. JR.; Choate, J. R. and Cadena, A. 1972. Mammals from the Mexican state of Sinaloa. II. Chiroptera. *Occasional Papers. Museum of Natural History*. University of Kansas 6:1-29.
- Jones, Jr., J. K. and T. Alvarez. 1962. Taxonomic status of the free-tailed bat, *Tadarida yucatanica* Miller. *University of Kansas Publications, Museum of Natural History* 9:125–133.
- Kitchener, D. J., Y. Konishi, and K. Suyanto. 1996. Morphological variation among eastern Indonesian island populations of *Hipposideros bicolor* (Chiroptera: Hipposideridae), with descriptions of three new subspecies. *Records of the Western Australian Museum*, 18: 179–192.
- Koopman, K. F. 1982. Biogeography of the bats of South America. *Special Publications Series, Laboratory of Ecology*, University of Pittsburgh. 6:1-539.
- Koopman, K.F. Order Chiroptera. In: Wilson, D.E.; Reeder, D.M. 1993. *Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 2^a ed. Washington, Smithsonian Inst. Press. p.137-241.
- Krutzsch, P. H.; Crichton, E. G. 1987. Reproductive biology of the male little mastiff bat, *Mormopterus planiceps* (Chiroptera: Molossidae), in southeast Australia. *American Journal of Anatomy*. 178:352-368.
- Langerhans, R. B., C. A. Layman, and T. J. DeWitt. 2005. Male genital size reflects a tradeoff between attracting mates and avoiding predators in two live-bearing fish species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102:7618–7623.
- Leite-Silva, C.; Santos, N.; Fagundes, V.; Yonenaga-Yassuda, Y.; Souza, M.J. 2003. Karyotypic characterization of the bat species *Molossus ater*, *M. molossus* and *Molossops planirostris* (Chiroptera, Molossidae) using FISH and banding techniques. *Hereditas*. 138:94-100.
- Lin, L-K., Motokawa, M. and Harada, M. (2002) Karyology of Ten Vespertilionid Bats (Chiroptera: Vespertilionidae) from Taiwan. *Zoological Studies*. 41(4): 347-354.
- Long, C. A. 1969. Gross morphology of the penis in seven species of the mustelidae. *Mus. Nat. Hist, and Dept. Biology, Wisconsin State Univ. Stevens Point, Wis.*. 1^o edição.V. 33

- Long, C.A.; Frank, T., 1968. Morphometric variation and function in the baculum, with comments on correlation of parts. *Journal of Mammalogy* 49:32–43.
- Machado, L. F.; Paresque, R.; Christoff, A. U. 2011. Anatomia comparada e morfometria de *deoligoryzomys nigripes* e *o. flavescens* (rodentia, sigmodontinae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pap. Avulsos Zool. (São Paulo)* [online]. 51(3):29-47.
- Matthews, L. H. 1937. The form of the penis in the British rhinolophid bats, compared with that of the vespertilionid bats. *Transactions of the Zoological Society of London*. 23:213-223.
- Matthews, L. H. 1942. Notes on the genitalia and reproduction of some African bats. *Journal of Zoology. Proc. Zool. Soc. London Ser. B*. 3:289–346.
- Marler, P. 1957. Specific distinctiveness in the communication signals of birds. *Behaviour*. 11:13-39.
- Morielle-Versute, E.; Varella-Gracia, E. M.; and Taddei, V. A. 1996. Karyotypic patterns of seven species of molossid bats (Molossidae, Chiroptera). *Cytogenet Cell Genet*. 72(1):26-33.
- Nowak, R. M. 1999. *Walker's mammals of the world*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. 6th edition. I: 253-470.
- Patterson, B.D.; Thaler Jr., C. 1982. The mammalian baculum: hypotheses on the nature of bacular variability. *Journal of Mammalogy*. 63:1-15.
- Peters, S.L.; Lim, B.K.; Engstrom, M.D. 2002. Systematics Of Dog-Faced Bats (*Cynomops*) Based On Molecular And Morphometric Data. *Journal of Mammalogy*. 83(4):1097-1110
- Ramm, S. A., 2007. Sexual Selection and Genital Evolution in Mammals: A phylogenetic analysis of baculum length. *The American Naturalist*. 169:360-369.
- Ribeiro, M. G.; Lima, S.R. 2000. Iniciação às técnicas de preparação de material para o estudo e pesquisa em morfologia. Belo Horizonte: *SEGRAC-Editora e Gráfica Limitada*. p 106.
- Romer, A. S. 1970. The vertebrate body. W. B. Saunders, Philadelphia, 601 pp.
- Rowe, L.; and Arnqvist, G. 2011. Sexual selection and the evolution of genital shape and complexity in water striders. *Evolution*. 66-1: 40–54.
- Ruth, E. B. 1934. The os priapi: a study in bone development. *Anat. Rec*. 60:231-244.
- Ryan, J. M., 1991a. Comparative morphology of the glans penis in *Molossus*, *Promops* and *Eumops* (Chiroptera: Molossidae). Contributions to mammalogy in honor of Karl F. Koopman. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist*. 206:122-137.

- Ryan, J. M., 1991b. Morphology of the glans penis in four genera of molossid bats (Chiroptera: Molossidae). *Journal of Mammalogy*. 72:658-668.
- Sachs, B. D.; Glater, G. B.; O'Hanlon, J. K. 1984. Morphology of the erect glans penis in rats under various gonadal hormone conditions. *Anatomical Records*. 210: 45-52.
- Silva-Taboada, G. 1979. Los mureielagos de Cuba. *Editorial Academia*. Havana, Cuba.
- Simmons, N. B. 2005. Order Chiroptera. Pp. 312-529 in *Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference*. 3rd ed., vol 1. (D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds.) Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland.
- Simmons, L. W. 2014. Sexual selection and genital evolution. *Austral Entomology*. 53:1–17.
- Smith, J. D.; Madkour, G. 1980. Penial morphology and the question of Chiroptera phylogeny. In Wilson, D.E., Gardner, A.L. (Eds.), *Proceedings of the Fifth International Bat Research Conference*. Texas tech University press. pp. 347-365.
- Thomas, N. M.; Harrison, D. L.; Bates, P. J. J. 1994. A study of the baculum in the genus *Nycteris* (Mammalia, Chiroptera, Nycteridae) with consideration of its taxonomic importance. *Bonner Zoologische Beitrage*. 45:17-31.
- Verrell, P. A. 1992. Primate penile morphologies and social systems: further evidence for an association. *Folia Primatologica*. 59:114–120
- Vizotto, L. D.; Taddei, V. 1973. *Chave para determinação de quirópteros brasileiros*. Universidade Estadual Paulista. 9:249-260.
- Wimsatt, W. A.; Kallen, F.C. 1952. Anatomy and histophysiology of the penis of a vespertilionid bat, *Myotis lucifugus lucifugus*, with particular reference to its vascular organization. *Journal of Morphology*. 90:415-465.
- Wrobel, K. H. & M. Bergmann, 2006. Male reproductive system. In: *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*, Blackwell Publishing, USA, pp. 233–255.
- Yoshiyuki, M. 1989. A systematic study of the Japanese Chiroptera. *National Science Museum monographs*. 7:1-242.

Legendas das figuras

Figura 1: Glânde peniana de *M. rufus* (A e B), *M. molossus* (C e D) e *N. laticaudatus* (E-F) após diafanização. A, C e E vista dorsal, B, D e F: vista ventral. LE: Lóbulo esquerdo; LM: Lóbulo mediano; LD: Lóbulo direito; Seta fina: Crista mediana; Seta grossa: Ranhuras do sulco dorsal; SD: Sulco dorsal;

asterisco: Báculo; Cabeça de seta: Meato urinário; SL: Sulco lateral; PV: Projeção ventral.

Figura 2: Imagem da glândula e do báculo de *M. molossus* (A e B), *M. rufus* (C-E) e *N. laticaudatus* (F-H) após procedimento de diafanização. A, C e F: glândula evidenciando o báculo em seu interior (em vermelho); B, D, E, G, H: báculo corado com alizarina vermelha.

Figura 3: Cortes transversais da glândula peniana de *M. rufus* e *M. molossus* em diferentes alturas. A, C e F coloração por Tushmman's blue; B, D e E: coloração por HE. CE: Corpo esponjoso; U: uretra; TC: túnica do tecido cavernoso; CC: corpo cavernoso; B: báculo; setas: tecido difuso; P: prepúcio; cabeça de seta: túnica do tecido esponjoso; asterisco: projeções epidérmicas espiniformes.

Figura 4: Cortes transversais em diferentes alturas da glândula peniana de *N. laticaudatus*. A e B: coloração por tushmman's blue; C-F: coloração por HE. Maiores detalhes no texto. Setas: Corpo esponjoso; U: uretra; TC: túnica do tecido cavernoso; CC: corpo cavernoso; B: báculo; P: prepúcio; cabeça de seta: perióstio; asterisco: tecido difuso; Setas largas: Projeções epidérmicas espiniformes; N: nervo.

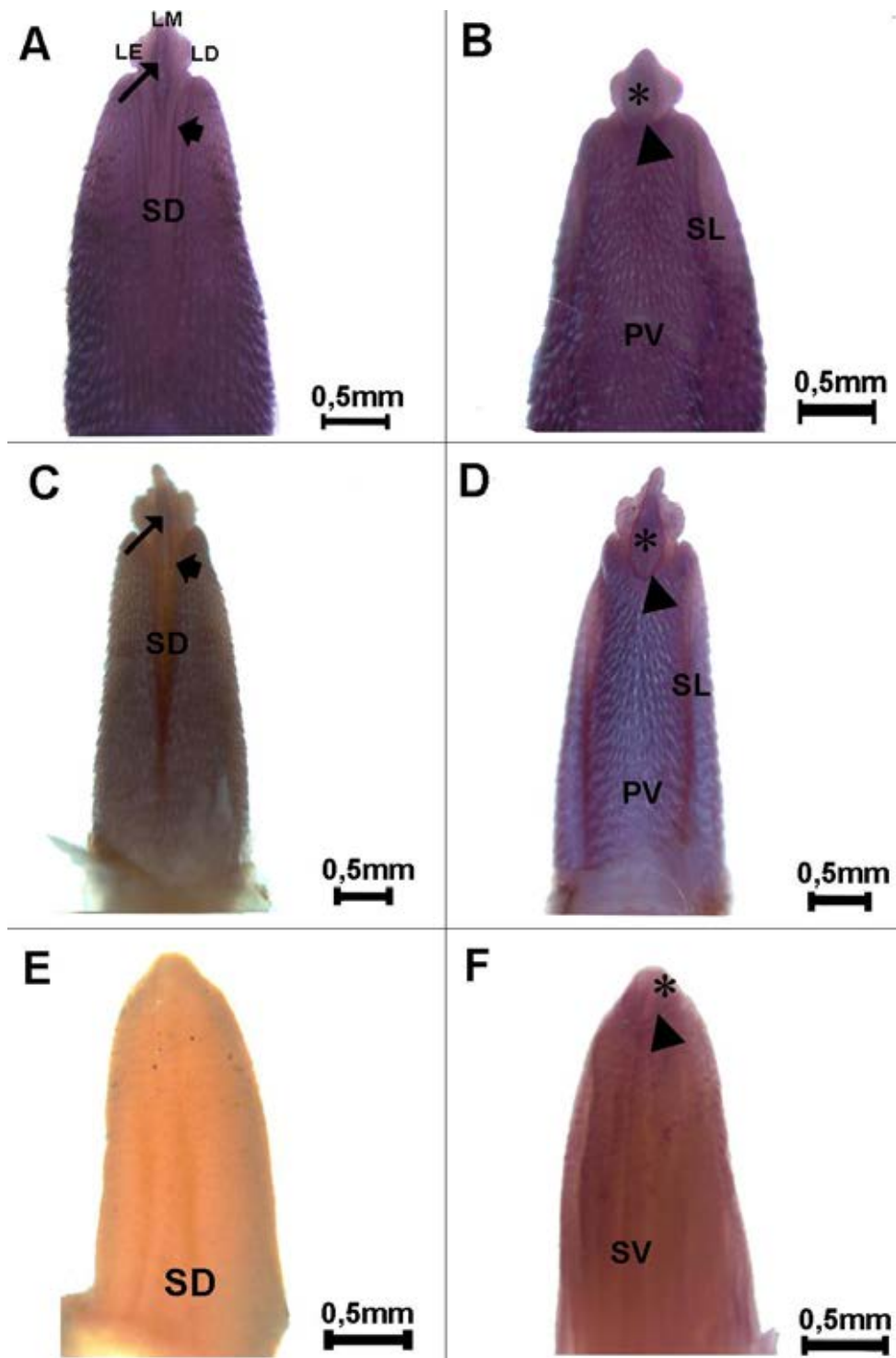


Figura 1: Glânde peniana de *M. rufus* (A e B), *M. molossus* (C e D) e *N. laticaudatus* (E-F) após diafanização. A, C e E: vista dorsal, B, D e F: vista ventral. LE: Lóbulo esquerdo; LM: Lóbulo mediano; LD: Lóbulo direito; Seta fina: Crista mediana; Seta grossa: Ranhuras do sulco dorsal; SD: Sulco dorsal; asterisco: Báculo; Cabeça de seta: Meato urinário; SL: Sulco lateral; PV: Projeção ventral.

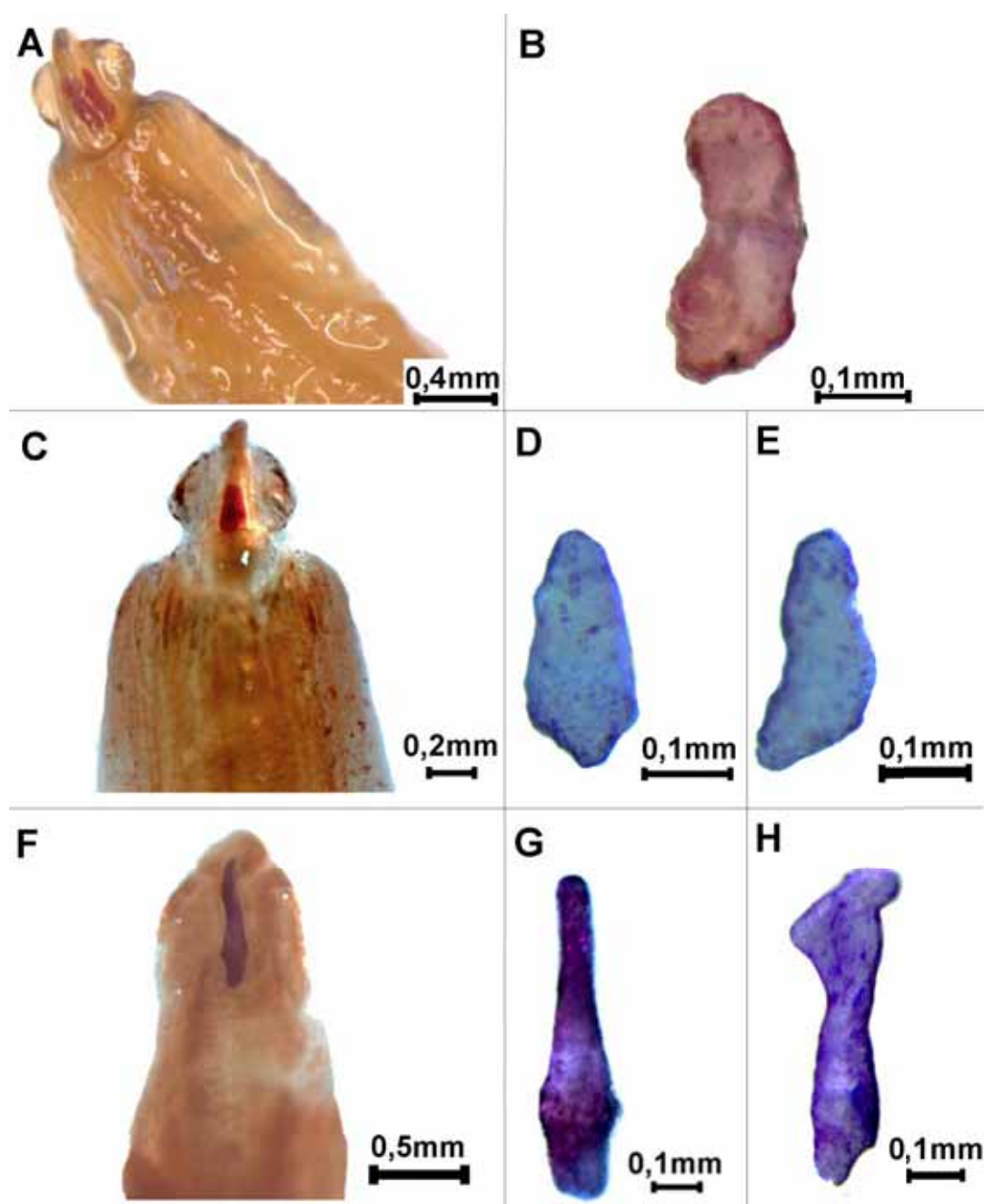


Figura 2: Imagem da glânde e do báculo de *M. molossus* (A e B), *M. rufus* (C-E) e *N. laticaudatus* (F-H) após procedimento de diafanização. A, C e F: glânde evidenciando o báculo em seu interior (em vermelho); B, D, E, G, H: báculo corado com alizarina vermelha.

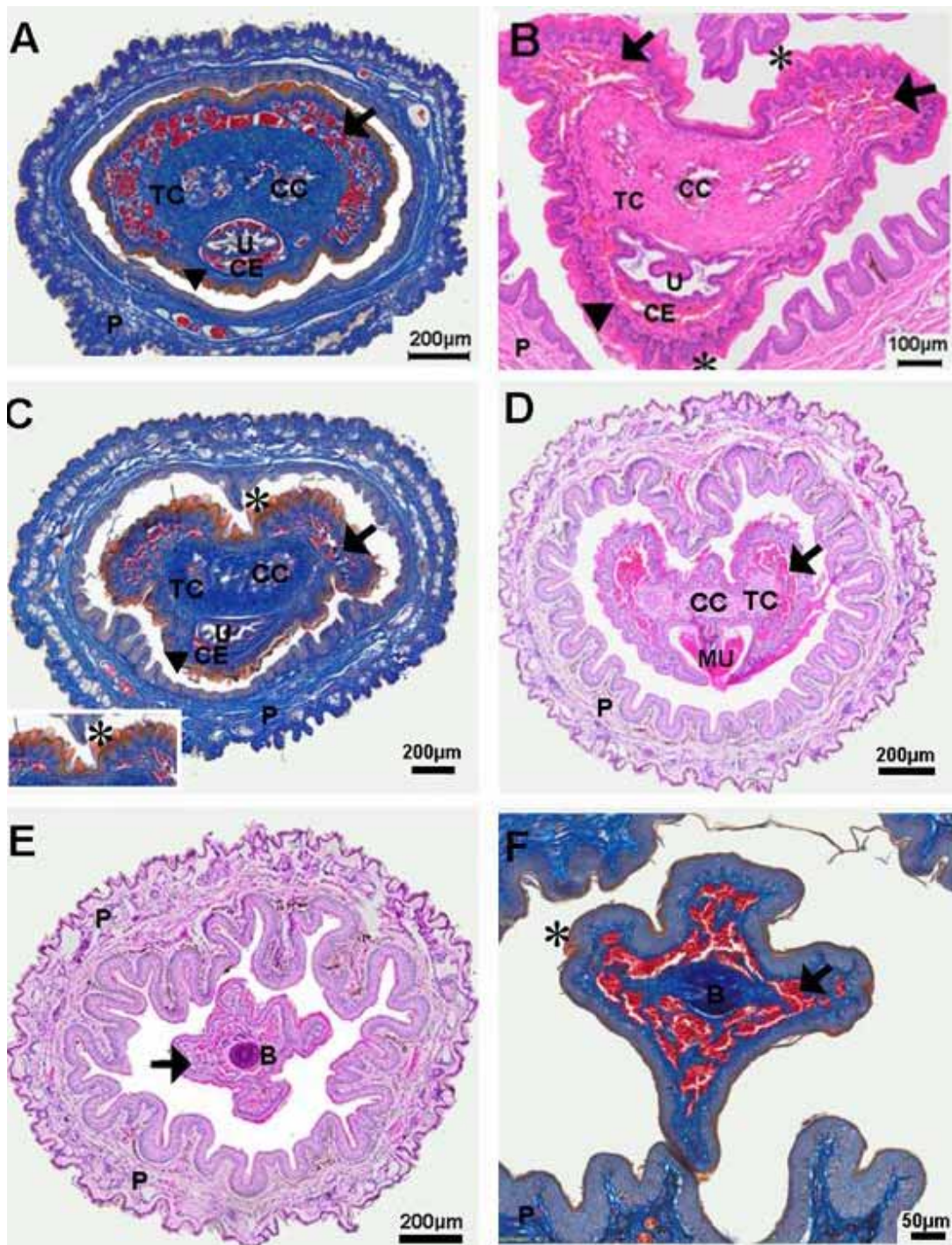


Figura 3: Cortes transversais da glânde peniana de *M. rufus* e *M. molossus* em diferentes alturas. A, C e F coloração por Tushmman's blue; B, D e E: coloração por HE. CE: Corpo esponjoso; U: uretra; TC: túnica do tecido cavernoso; CC: corpo cavernoso; B: báculo; setas: tecido difuso; P: prepúcio; cabeça de seta: túnica do tecido esponjoso; asterísco: projeções epidérmicas espiniformes.

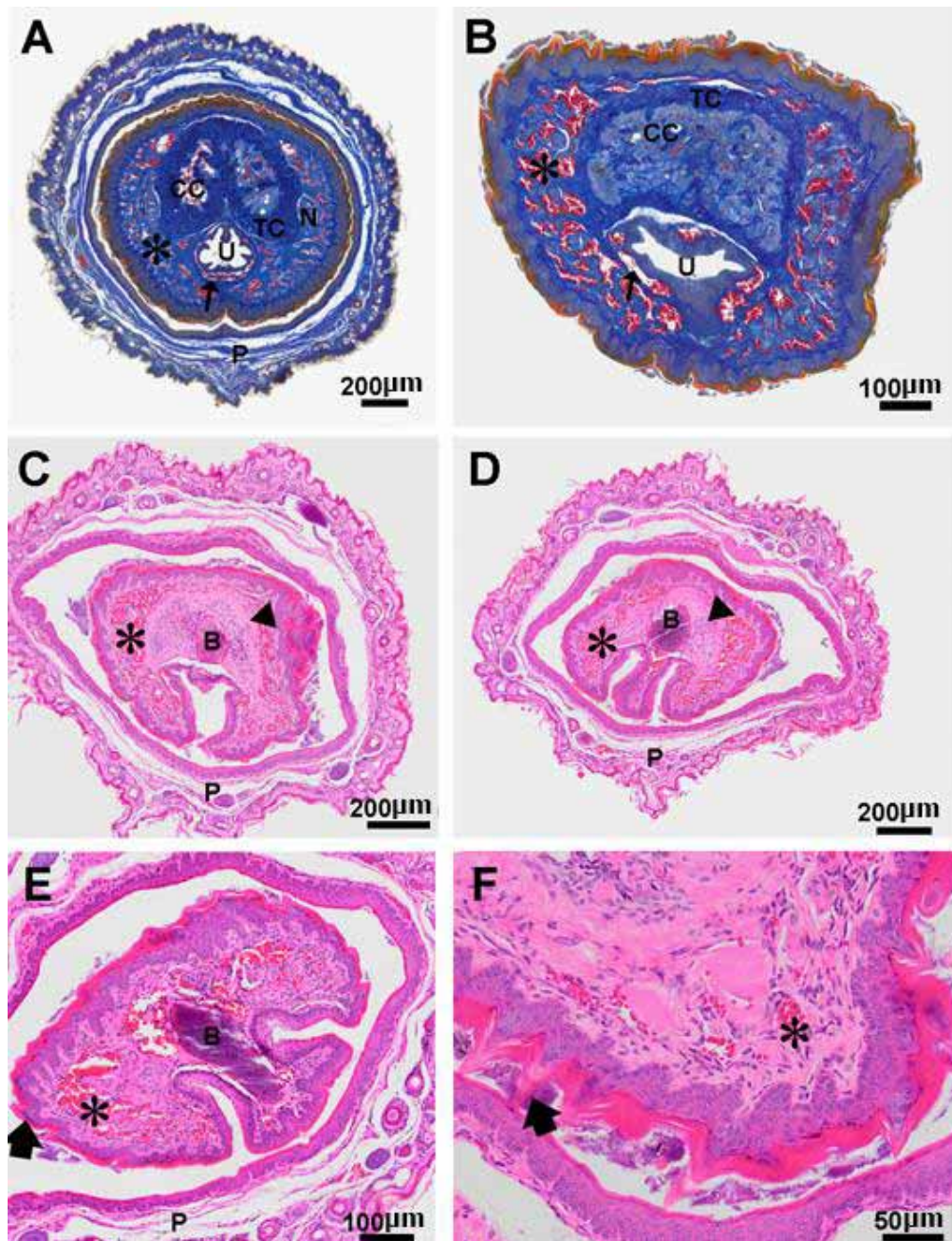


Figura 4: Cortes transversais em diferentes alturas da glânde peniana de *N. latucaudatus*. A e B: coloração por tushmman's blue; C-F: coloração por HE. Maiores detalhes no texto. Setas: Corpo esponjoso; U: uretra; TC: túnica do tecido cavernoso; CC: corpo cavernoso; B: báculo; P: prepúcio; cabeça de seta: periósteo; asterisco: tecido difuso; Setas largas: Projeções epidérmicas espiniformes; N: nervo.

VII. CAPÍTULO 4

**Uma abordagem morfológica sobre a
glande peniana e o báculo em *Eumops*
(Molossidae: Chiroptera)**

**Uma abordagem morfológica sobre a glândula peniana e o báculo em
Eumops (Molossidae: Chiroptera)**

Comelis, M. T.^a, Góes, R. M.^b, Morielle-Versute, E.^{a, *}

^aDepartamento de Zoologia e Botânica e ^bDepartamento de Biologia,
Universidade do Estado de São Paulo, UNESP, Campus São José do Rio
Preto, São Paulo 15054-000, Brasil.

*Autor correspondente. Tel.: +55 17 3221 2369; fax: +55 17 3221 2374.

E-mail: morielle@ibilce.unesp.br; emorielle@gmail.com (E. Morielle-Versute).

Palavras chave: *Eumops*; Báculo; Morfologia peniana

Manuscrito a ser submetido à: *Anatomical Records*

Resumo

O gênero *Eumops* Miller, 1906, de Molossidae tem distribuição neotropical e representa o mais diverso entre os molossídeos neotropicais, fato que torna o reconhecimento das espécies de *Eumops* difícil, assim como o estabelecimento dos relacionamentos dos táxons dentro do gênero, que em geral, não são congruentes entre os estudos. O objetivo do presente trabalho foi descrever a anatomia externa e interna do pênis, com ênfase para a glândula e para o báculo de espécimes de *E. auripendulus*, *E. bonariensis*, *E. glaucinus* e *E. perotis* por meio de análises morfológica e histológica, para fornecer novos caracteres a serem avaliados na taxonomia do grupo. Nossos resultados mostram que as espécies analisadas mantêm características típicas da glândula de molossídeos, mas também apresentam características distintivas do gênero, como a ausência das projeções epidérmicas, a presença do par de nervos laterais bem desenvolvidos e o baixo grau de desenvolvimento do tecido cavernoso difuso. Algumas características observadas podem inclusive ser úteis na distinção das

espécies, como por exemplo: a morfologia do báculo e a morfologia externa da glândula, que mostram grandes variações específicas.

1. Introdução

O gênero *Eumops*, Miller, 1906, de Molossidae tem distribuição neotropical e representa o mais diverso entre os molossídeos neotropicais. São reconhecidas para o gênero 16 espécies: *E. auripendulus* (Shaw, 1800); *E. bonariensis* (Peters, 1874); *E. dabbenei* Thomas, 1914; *E. delticus* Thomas, 1923; *E. ferox* (Gundlach, 1861); *E. floridanus* Allen, 1932; *E. glaucinus* (Wagner, 1843); *E. hansae* Sanborn, 1932; *E. maurus* (Thomas, 1901a); *E. nanus* (Miller, 1900); *E. patagonicus* Thomas, 1924; *E. perotis* (Schinz, 1821); *E. trumbulli* (Thomas, 1901b); *E. underwoodi* Goodwin, 1940; *E. wilsoni* (Baker et al., 2009) e *E. chiribaya* (Medina et al., 2014); sendo esta última e mais recente espécie descrita, endêmica para o Peru (Timm e Genoways, 2004; Simmons, 2005a; Eger, 2007; McDonough et al., 2008; Baker et al., 2009; Gregorin, 2009; Medina et al., 2014).

Morfologicamente o gênero é definido por uma combinação de características que tornam o seu reconhecimento fácil entre os demais gêneros da família, como orelhas unidas, moderada a profunda fenda no basisfenóide, palato anterior fechado e finas rugas nos lábios (Freeman 1981, Gregorin e Taddei, 2002). Já as espécies e subespécies reconhecidas variam consideravelmente em diversos conjuntos de caracteres, como a cor e morfologia do pelo (Eger, 1977; Van Staaden e Jones, 1997), o cariótipo (Morielle-Versute et al., 1996; Finato et al., 2000; Trierveiler et al., 2002), a morfologia peniana (Brown, 1967; Ryan, 1991 a, b), o habitat, medidas cranianas (Eger, 1977; Timm e Genoways, 2004) entre outras. Essa grande diversidade exibida pelos indivíduos torna o reconhecimento das espécies de *Eumops* difícil, assim como o estabelecimento dos relacionamentos dos táxons dentro do gênero, que em geral, não são congruentes entre os estudos.

Outra dificuldade que acentua as incongruências entre os resultados é a natureza distinta dos caracteres analisados nos diferentes estudos, bem como

na representação dos táxons nesses estudos, que não contemplam as mesmas ou, todas as espécies do gênero.

Algumas hipóteses de relacionamentos intragenéricos foram apresentadas por Gregorin (2009), que utilizou informações morfológicas (crânio, dentição, língua, morfologia externa e penial) em uma avaliação cladística. Em seus resultados *E. auripendulus* não está proximalmente relacionado à *E. glaucinus*, e o gênero não é monofilético, além disso, ele reconheceu o status específico de *E. delticus* e *E. nanus* concordando com o proposto por Eger (2007). O status das subespécies reconhecidas para os táxons (*E. bonariensis*, *E. auripendulus*, *E. underwoodi*) não puderam ser resolvidas, o que fez com que o autor sugerisse que outras análises precisam ser efetuadas, para que possam ser acrescidas nas avaliações filogenéticas. A monofilia de *Eumops* teve significativo suporte dos dados moleculares apresentados por Ammerman et al. (2012).

Os resultados dos estudos de Bartlett et al. (2013) e Mc Donough et al. (2008) têm possibilitado uma melhor compreensão de problemas dos relacionamentos dentro do táxon, contudo, ainda não resolveram completamente todas as incongruências presentes nas filogenias apresentadas pelos diferentes caracteres analisados, o que nos leva a admitir que mais informações são necessárias para as interpretações.

No Brasil há registros de nove das 16 espécies descritas: *E. auripendulus*, *E. bonariensis*, *E. delticus*, *E. glaucinus*, *E. hansae*, *E. maurus*, *E. patagonicus*, *E. perotis* e *E. trumbulii*, e para as quais há informações sobre a morfologia externa, morfologia dentaria e craniana, morfologia lingual, aspectos dos cariótipos e dados moleculares (Morielle-Versute et al., 1996; Gregorin 2009).

Uma característica morfológica ainda pouco explorada, com grande potencial taxonômico discriminativo e importante na biologia reprodutiva de vários táxons de mamíferos é a morfologia peniana, especialmente da glândula e do báculo. Ambas são altamente variáveis entre as espécies ainda que a morfologia geral seja pouco variável. O báculo é um dos ossos mais variáveis

dentro de vertebrados (Romer, 1970) e ainda apresenta origem e funções desconhecidas. Algumas hipóteses relacionam a estrutura à remoção de plugs copulatórios, estimulação da fêmea e suporte adicional ao pênis durante a cópula (Ruth, 1934; Long e Frank, 1968; Romer, 1970; Dixson, 1987, 1995).

O objetivo do presente trabalho foi descrever a anatomia externa e interna do pênis, com ênfase para a glândula e para o báculo de espécimes de *E. auripendulus*, *E. bonariensis*, *E. glaucinus* e *E. perotis*, e fornecer informações adicionais para serem utilizadas em estudos comparativos sobre a morfologia peniana, para a taxonomia do grupo e também para aumentar o conhecimento sobre a reprodução desses animais.

2. Material e Métodos

2.1 Espécies

Foram analisados neste estudo 23 espécimes adultos e um jovem, representantes das espécies *Eumops auripendulus* (5), *Eumops bonariensis* (4), *Eumops glaucinus* (7) e *Eumops perotis* (7). Os espécimes foram representados por material colecionado (preservado em álcool) e/ou capturados vivos na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil (49W22'45" 20S49'11"), com utilização de redes do tipo "mist-nets" e autorização do IBAMA - (Processo: 02027.001957/2006-02). Os animais coletados foram transportados para o laboratório e mantidos *ad libitum* até a retirada do material necessário para o estudo. Todos os animais foram fixados com formol, e estão depositados na Coleção Científica de Chiroptera (DZSJRP) do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP) em São José do Rio Preto, SP.

2.2 Análise morfológica da glândula e do báculo

A análise da morfologia externa da glândula e do osso peniano foi realizada em espécimes preservados em álcool e representantes das quatro

espécies. Foram analisados por este procedimento 16 espécimes, em um número variado de 2 a 5 para os táxons.

Após a obtenção do comprimento do pênis e da documentação fotográfica, este foi removido por meio de um corte na base da implantação, e submetido ao procedimento de diafanização, que envolveu desidratação dos órgãos em álcool etílico (50% e 100%), neutralização em solução de borato de sódio saturado e a digestão dos tecidos com solução alcalina de tripsina (solução de borato de sódio saturada + tripsina 5%), seguida da coloração com Alizarina Vermelha (solução de KOH 1% + solução alizarina vermelha 1%), por aproximadamente duas horas, para a identificação da estrutura óssea (báculo). Para maior eficácia do procedimento, após a digestão tecidual o prepúcio foi retirado para expor a glândula, de modo a facilitar a penetração do corante no osso peniano. Decorrido o tempo da coloração os pênis foram transferidos para uma solução de glicerina (60%) em KOH (1%), onde permaneceram enquanto estavam sendo analisados. A glândula peniana foi fotografada e medida no seu comprimento e, em seguida, foi dissecada para a exposição do báculo. Após o isolamento o báculo foi avaliado quanto ao seu comprimento e fotografado.

Para a comparação com os resultados de outros trabalhos sobre o assunto foi adotada no presente estudo a terminologia sugerida por Hooper (1958) e Smith e Madkour, (1980) para o reconhecimento da glândula, na qual a glândula representa apenas a parte distal do pênis após a separação do prepúcio-glândula.

2.3 Análise histológica

A análise histológica foi realizada em dois espécimes machos adultos de três táxons: *E. bonariensis*, *E. glaucinus* e *E. perotis*, e um espécime jovem de *E. perotis* (para os quais obtivemos material fresco, ou seja, recém – coletado).

Os pênis foram retirados por meio de um corte na base da implantação e em seguida foram fixados em paraformaldeído tamponado por um período de 48h. Após eles foram desidratados em uma série de etanol (50% a 100%), lavados em xilol e então incluídos em parafina histológica. Os pênis foram seccionados transversalmente na espessura de 5 µm (micrótomo Leica RM 2155), e as secções depositadas em lâminas de vidro onde foram coradas com Hematoxilina-Eosina (Ribeiro e Lima, 2000) e tricrômico de Tushmman's blue (Delbès *et al.*, 2004), esta última aplicada para a visualização (reconhecimento) das células musculares lisas.

Os cortes corados foram analisados e fotografados em microscopia óptica (Scanner de imagens Olympus BX-VCB), com auxílio de software de captura e análise de imagem (*software* VS-ASW).

3. Resultados

3.1 Morfologia externa do pênis e da glande

Os pênis das quatro espécies de *Eumops* analisadas apresentaram as duas regiões reconhecidas para o pênis de mamíferos, ou seja, o corpo, mas proximal, e a glande, mais distal. O corpo engloba toda a porção pendulosa do pênis, incluindo o prepúcio e a glande. Esta pode ser diferenciada do restante do corpo pela separação do prepúcio do corpo (junção prepúcio-glande).

Em relação à glande, a morfologia geral foi similar nas quatro espécies. Caracteristicamente elas apresentaram o formato de seta, sendo mais estreita na base e larga no ápice, um achatamento dorso-ventral e a ausência de projeções epidérmicas no revestimento externo (Figuras 1 e 2). Contudo, quando observadas em detalhe, foi possível reconhecer uma série de características que as diferenciam, tanto na morfologia quanto no tamanho. Em relação ao comprimento, esses variaram de 1,2 mm a 2,42 mm. Os valores

médios observados para as espécies foram, 1,73 mm para *E. auripendulus*, 1,2 mm para *E. bonariensis*, 1,61mm para *E. glaucinus* e 2,42mm para *E. perotis*.

As glândes de *E. glaucinus*, *E. bonariensis* e *E. auripendulus* apresentaram maior similaridade morfológica entre si, que com *E. perotis*. O maior grau de similaridade encontrado foi entre as glândes de *E. glaucinus* e *E. auripendulus*. Em ambas as espécies ela é mais estreita e ovalada na base, começando a ampliar-se a cerca de 1/4 da distância prepúcio-glande, atingindo seu maior grau de dilatação a aproximadamente 3/4 da base. A partir deste ponto estreita-se bruscamente em direção ao ápice, onde termina em uma ponta afilada (Figura 1).

Compondo a porção mais dilatada da glânde, estão dois lóbulos laterais (LL), que podem ser vistos em ambas as superfícies da glânde. Ventralmente estão presentes duas pregas laterais que formam em seu interior uma projeção mediana ventral cilíndrica (PV), que percorre 3/4 da glânde. Na porção apical da superfície ventral há uma fenda circular, o meato urinário (MU), que se inicia na porção subapical e se estende até o ápice. Superiormente ao meato urinário há uma projeção elevada de tecido de forma ovalada, com a base mais larga e o ápice pontiagudo. Esta projeção mediana-ventral é chamada de monte bacular (Figura 1 A e B, E e F). O meato é limitado superiormente pela borda inferior do monte bacular e inferiormente pela borda superior da projeção mediana ventral. Em ambas as espécies o báculo pouco adentra no monte bacular (Figura 3).

Em *E. auripendulus* a ponta distal da glânde é formada apenas pelo monte bacular, enquanto em *E. glaucinus* ela é formada por uma borda de tecido superior ao monte bacular (Figura 1 A e B). Dorsalmente a glânde das duas espécies é marcada pela presença de um par de sulcos centrais, que marcam os lóbulos laterais nessa superfície. (figura 1 C e D)

A glânde de *E. bonariensis* possui morfologia semelhante à das espécies anteriores, porém seu formato é mais cilíndrico, e não possui os lóbulos laterais (Figura 2 A e C). Também possui um monte bacular ovalado e

a abertura do meato urinário em nível subapical. Apenas a porção mais terminal do báculo está presente no monte bacular.

A glândula de *E. perotis* possui, diferentemente das outras espécies, uma morfologia mais cilíndrica. A superfície dorsal é marcada por diversos sulcos longitudinais que lhe confere uma aparência enrugada (Figura 2 D). Na superfície ventral há um sulco profundo que circunda toda a borda lateral da glândula. Medianamente a este sulco encontra-se uma projeção elevada em forma de vela (PV), com a base cilíndrica e apenas o 1/4 final com forma deltóide, mais larga na base afilando-se progressivamente, até a ponta afilada, o monte bacular (Figura 2 B). Similarmente às outras espécies, no nível subapical da superfície ventral encontra-se um sulco em forma de anel, o meato urinário, que separa a projeção mediano-ventral do monte bacular. Ele é delimitado inferiormente pela borda superior da projeção mediana ventral e superiormente pela borda inferior do monte bacular (Figura 2 B). *E. perotis* é a única espécie analisada na qual o báculo não está no interior (interno) do monte bacular.

O báculo foi identificado no interior da glândula das quatro espécies (figuras 3 e 4). À exceção de *E. perotis* em que o báculo está localizado dorso-medianamente e totalmente fora do monte bacular, nas demais ele foi observado na porção terminal da glândula, dorsal em relação à uretra e com a porção final no interior do monte bacular. Em relação ao comprimento, os maiores tamanhos foram observados em *E. glaucinus* e *E. bonariensis* e os menores em *E. auripendulus* e *E. perotis*. Além da variação no tamanho os báculos variaram também na morfologia. Em *E. bonariensis*, *E. glaucinus* e *E. perotis* o báculo é côncavo na região ventral apresentando um comprimento médio de 0,4 mm, 0,54mm e 0,08mm respectivamente (Figuras 3 C e D e 4). Em *E. auripendulus* o báculo apresentou um comprimento médio de 0,27mm e é retilíneo (Figura 3 A e B). Em *E. perotis* o báculo foi identificado em dois dos quatro espécimes analisados. (Figura 4 D-F).

3.2 Morfologia interna e arranjos teciduais do pênis e da glândula

As espécies apresentam um padrão similar de organização tecidual com o corpo esponjoso pouco desenvolvido, e um par de corpos cavernosos (Figura 5). Ao redor dos corpos cavernosos e do corpo esponjoso está a túnica albugínea, constituída de tecido conjuntivo denso não modelado e fibras musculares lisas. Esta é melhor delimitada nos corpos cavernosos (CC) que no tecido esponjoso, onde é visivelmente menos espessa. Um septo da túnica albugínea divide os corpos cavernosos em dois por toda a extensão da glândula (Figura 5 A, C e E). Outras características similares entre as espécies são a presença de um par de nervos dispostos dorso-lateralmente (N), que formam os lóbulos laterais observados na morfologia externa, a presença de um terceiro tipo tecidual, denominado tecido cavernoso difuso, que aparece em glândula, principalmente em porções mais apicais como o monte bacular, e epitélio pouco queratinizado.

O báculo esteve presente em todos os espécimes de *E. glaucinus* e *E. bonariensis* analisados, porém apenas um espécime de *E. perotis*, dos três analisados na histologia apresentou a estrutura (Figura 5 E e F). Ele está localizado dorsalmente em relação a uretra, e apical em relação ao corpo cavernoso, tendo início ao final deste (Figura 5 B, D e F). A uretra (U) é grande e localizada ventralmente, constituída inteiramente por epitélio de transição. Ela percorre toda a extensão da glândula, se exteriorizando ao nível do meato urinário. Há diversas células pigmentares presentes nas camadas do prepúcio (P), principalmente em *E. perotis* e *E. glaucinus*.

4. Discussão

O pênis das espécies analisadas tem o padrão observado para mamíferos, para o qual se reconhece com facilidade as partes, corpo e glândula. Concordando com os dados de literatura (Ryan, 1991a, b) para essas mesmas

espécies, a glânde é bem desenvolvida, e apresenta, em geral, projeções epidérmicas com formatos variáveis, e o prepúcio, consiste em uma bainha fina de tecido pouco vascularizado e retrátil, que recobre toda a porção pendulosa do pênis.

A análise da glânde de morcegos microquirópteros possibilitou o reconhecimento de dois padrões morfológicos básicos para o pênis, a partir das características exibidas pela glânde e prepúcio: pênis com glânde simples e prepúcio espesso e altamente vascularizado, e pênis com glândes complexas e prepúcio fino e retrátil. Os resultados do presente trabalho juntamente com dados da literatura apontam que os morcegos molossídeos estão incluídos no segundo tipo, pois possuem o pênis com prepúcio fino, retrátil e pouco vascularizado e uma glânde complexa com alta variação morfológica entre os gêneros (Matthews, 1937,1941).

Nas três espécies analisadas, histologicamente o pênis está constituído por dois corpos cavernosos e um corpo esponjoso da uretra, sendo este segundo pouco desenvolvido, representado apenas por uma pequena massa tecidual com poucas células de extensão ao redor da uretra. Além desses um terceiro tipo de tecido erétil foi reconhecido, sendo denominado de tecido cavernoso difuso. Os tecidos cavernosos compõem a maior parte da massa peniana.

A natureza erétil do tecido cavernoso difuso foi confirmada por meio da coloração de tricrômico de Tuchmman's blue, que marcou as células musculares lisas presentes nas trabéculas desse tecido. Considerando-se a localização desse tecido no arranjo do pênis, e comparando-o às descrições da literatura, admiti-se que em outras espécies de mamíferos e até mesmo morcegos ele tem sido reconhecido como tecido cavernoso acessório (Winssat e Kallen, 1952; Smith e Madkour, 1980; Ryan, 1991). Entretanto, embasados em nossos resultados, que evidenciam a grande representatividade deste tecido no arranjo do pênis de molossídeos, nós julgamos que a denominação de tecido cavernoso acessório possa não representar a real importância desse

tecido no pênis de morcegos, e para o mecanismo geral de ereção, por isso propusemos denominá-lo tecido cavernoso difuso.

Duas outras características observadas foram consideradas importantes na caracterização dos táxons analisados, sendo elas, a presença de um par de nervos laterais compondo a porção mais ampliada da glândula de *E. glaucinus* e *E. auripendulus*, e as laterais das glândulas de *E. bonariensis* e *E. perotis*, os quais pois podem ser vistos tanto micro quanto macroscopicamente e a outra, é a ausência das projeções epidérmicas que aparecem revestindo externamente a glândula de outros táxons de molossídeos, como *Molossus* e *Nyctinomops* (Ryan, 1991; Comelis, 2015 em preparação).

Pouco se sabe sobre a função das projeções epidérmicas na glândula de várias espécies de mamíferos, contudo os estudos apontam uma possível relação com o prolongamento da cópula, estimulação do trato reprodutivo da fêmea e remoção de plugs copulatórios (Sachs et al., 1984; Krutzsch e Crichton, 1987; Ryan, 1991; Kelly, 2000).

O báculo foi identificado macro e microscopicamente na glândula das quatro espécies, e exibiram grande variação na sua morfologia, refletindo uma aparente condição espécie-específica. Contudo, algumas similaridades morfológicas foram observadas entre os báculos de *E. glaucinus* e *E. bonariensis*.

A presença do osso peniano na espécie *E. perotis* contraria os dados de Brown (1967) que afirmam não ter encontrado a estrutura em *E. perotis*. Tendo em vista que no presente trabalho, o báculo só foi evidenciado em dois dos quatro espécimes analisados, e que ele tem um tamanho muito reduzido, quando comparado ao báculo das outras espécies, é possível que os espécimes analisados por Brown não apresentassem o báculo. Embasados nestes resultados é possível admitir que o báculo em *E. perotis* esteja sobre pressão seletiva, e que poderá ser perdido ou desaparecer futuramente. Maiores estudos sobre a presença do báculo nesta espécie são ainda necessários.

Ryan (1991) descreveu as glândulas de *E. auripendulus*, *E. glaucinus* e *E. perotis* como sendo similares entre si. Apesar de apresentarem algumas

similaridades, essas mais evidentes entre *E. auripendulus* e *E. glaucinus*, não é possível generalizar. Além disso, diferenças na morfologia da glande estão relacionadas com variações na morfologia do báculo, que como vimos, são diferentes entre as espécies.

Muitos autores sugerem que a morfologia da glande e do báculo sofreu seleção sexual ao longo dos anos, de modo a melhor se adaptar ao aparelho reprodutivo da fêmea, ao tipo de comportamento reprodutivo da espécie e ao nível de competição pela fêmea (Dixon, 1976, 1987, 1995; Short, 1979; Harcourt et al., 1981; Patterson e Thaeler, 1982; Kenagy e Trombulak, 1986; Moller, 1988; Dahl et al., 1993; Dixon et al. 2004, Ramm, 2007). Dixon (1989) relata a correlação entre um maior tamanho de báculo e longos períodos de intromissão em primatas; nas espécies com menor tamanho de báculo a cópula geralmente ocorre com uma ou várias intromissões curtas, com menos de um minuto de duração; já para espécies com maior tamanho de báculo a cópula ocorre com intromissões prolongadas (mais de três minutos), ou com continuação da cópula após a ejaculação.

A existência do báculo em mamíferos ainda é um dos maiores mistérios dentro do grupo (Ruth, 1934; Ewer, 1973). A origem e a função da estrutura vêm sendo tema de diversas pesquisas atualmente, porém pouco foi ainda esclarecido (Murakami e Mizuno, 1984; Laveguier e Ferguson, 2002; Ramm, 2007; Rowe e Arnqvist, 2011). Yonezawa (2011) em um estudo sobre ratos mutantes para a *Hoxd13* percebeu que estes apresentavam corpo cavernoso normal, porém um báculo mal formado, e que apesar de possuírem células germinativas e comportamento reprodutivo normal não conseguiam produzir descendentes, fato que evidencia a importância do formato correto do báculo para a cópula nesses animais.

Em conclusão nossos resultados mostraram que as espécies analisadas mantem características típicas da glande de molossídeos, mas também apresentam características distintivas do gênero, como a ausência das projeções epidérmicas, o par de nervos laterais bem desenvolvidos e o baixo grau de desenvolvimento do tecido cavernoso difuso. Algumas características

observadas podem inclusive ser úteis na distinção das espécies, como por exemplo: a morfologia do báculo e a morfologia externa da glândula, que mostram grandes variações específicas. Esses resultados provêm informações inéditas sobre a anatomia peniana em *Eumops*, que futuramente podem servir como base para estudos comparativos sobre a morfologia peniana tanto em Chiroptera quanto em outras ordens, expandir o conhecimento sobre a biologia reprodutiva do grupo e juntamente com outros caracteres pode servir de grande valia para a taxonomia do grupo.

Agradecimentos

Pela bolsa de mestrado concedida pela FAPESP (2012/24288-0), pelo apoio financeiro das agências de fomento FAPESP (2009/16181-9 e 2013/11859-2) e CNPq - Processos 302008/2010-1 e 301073/2013-9. Ao suporte técnico concedido por Luiz Roberto Falleiros Júnior.

Referências

- Ammerman, L.K., Lee, D.N.; Tipps, T.M. 2012. First molecular phylogenetic insights into the evolution of free-tailed bats in the subfamily Molossinae (Molossidae, Chiroptera). *Journal of Mammalogy*. 93: 12-28.
- Baker, R.J.; McDonough, M. M.; Swier, V.J.; Larsen, P.A.; Carrera, J.P.; Ammerman, L. K. 2009. New species of bonneted bat, genus *Eumops* (Chiroptera: Molossidae) from the lowlands of western Ecuador and Peru. *Acta Chiropterologica*. 11:1-13.
- Bartlett, S. N.; McDonough, M. M.; Ammerman, L. K. 2013. Molecular systematics of bonneted bats (Molossidae: *Eumops*) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Journal of Mammalogy*. 94(4): 867-880
- Brown, R. E. 1967. - Bacula of some New World molossid bats. *Mammalia*. 31: 645-667.
- Dahl, J. E.; Gould, K. G.; Nadler, R. D. 1993. Testicle size of orangutans in relation to body size. *American Journal of Physical Anthropology*. 90: 229-236.

- Dixon, A. F. 1976. Effects of testosterone on the sternal cutaneous glands and genitalia of the male greater galago (*Galago crassicaudatus crassicaudatus*). *Folia primatologica*. 126:207-212.
- Dixon, A.F. 1987. Baculum length and copulatory behavior in primates. *American Journal of Primatology*. 7:51-60.
- Dixon, A. F. 1989. Sexual Selection, Genital Morphology, and Copulatory Behavior in Male Galagos. *International Journal of Primatology*. 10(No. 1)
- Dixon, A.F. 1995. Baculum length and copulatory behaviour in carnivores and pinnipeds (Grand Order Ferae). *Journal of Zoology*. 235:67–76.
- Dixon, A. F.; Nyholt, J.; Anderson, M. 2004. A positive relationship between baculum length and prolonged intromission patterns in mammals. *Acta Zoologica Sinica*. 50:490 -503.
- Eger, J. L. 1977. Systematics of the genus *Eumops* (Chiroptera: Molossidae). *Life Sciences Contributions, Royal Ontario Museum* 110:1–69.
- Eger, J. L. Family Molossidae (P. Gervais, 1856). 2007. In *Mammals of South America. Vol. 1, Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*. P. 399-440. (A.L. Gardner, ed). The University Chicago Press, Chicago.
- Ewer, R.F. 1973. *The Carnivores*. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Finato, A. O.; Varella-Garcia, M.; Tajara, E. H.; Taddei, V. A.; Morielle-Versute, E. 2000. Intrachromosomal distribution of telomeric repeats in *Eumops glaucinus* and *Eumops perotis* (Molossidae, Chiroptera). *Chromosome Res.* 8: 563-569.
- Freeman, P. W. A multivariate study of the family Molossidae (Mammalia, Chiroptera): morphology, ecology, evolution. 1981. *Fieldiana Zoology*. 7:1-105.
- Gregorin, R. 2000. *Filogenia de Molossidae Gervais, 1855 (Mammalia: Chiroptera)*. 247 f. Tese (Doutor em Ciência) - Universidade de São Paulo.
- Gregorin R.; Taddei V.A. 2002. Chave artificial para a identificação de molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). *Journal of Neotropical Mammalogy*. 9:13-32
- Gregorin, R. 2009. Phylogeny of *Eumops* (Miller, 1906) (Chiroptera: Molossidae) using morphological data. *Acta Chiropterologica*. 11: 247-258.
- Harcourt, A. H.; Harvey, P. H.; Larson, S. G.; Short, R. V. 1981. Testis weight, body weight and breeding system in primates. *Nature*. 293:55-57.
- Kelly, D. A., 2000. Anatomy of the baculum-corpous cavernosum interface in the norway rat (*Rattus norvegicus*), and implications for force transfer during copulation. *Journal of Morphology*. 244:69-77.

- Kenagy, G. J.; and Trombulak, S. C. 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *Journal of Mammalogy*. 67:1-22.
- Krutzsch, P. H.; Crichton, E. G. 1987. Reproductive biology of the male little mastiff bat, *Mormopterus planiceps* (Chiroptera: Molossidae), in southeast Australia. *American Journal of Anatomy*. 178:352-368.
- Lariviere, S.; Ferguson, S. H. 2002. On the evolution of the mammalian baculum: vaginal friction, prolonged intromission or induced ovulation? *Mammal Reviews*. 32:283–294.
- Long, C.A.; Frank, T. 1968. Morphometric variation and function in the baculum, with comments on correlation of parts. *Journal of Mammalogy*. 49:32–43.
- Mcdonough, M. M.; Ammerman, L. K.; Timm, R. M.; Genoways, H. H.; Larsen, P. A.; Baker, R. J. 2008. Speciation within bonneted bats (genus *eumops*): the complexity of morphological, mitochondrial, and nuclear data sets in systematics. *Journal of Mammalogy*. 89(5):1306–1315.
- Matthews, L. H. 1937. The form of the penis in the British rhinolophid bats, compared with that of the vespertilionid bats. *Transactions of the Zoological Society of London*. 23:213-223.
- Matthews, L. H. 1942. Notes on the genitalia and reproduction of some African bats. *Journal of Zoology. Proc. Zool. Soc. London Ser. B*. 3:289–346.
- Medina, C. E.; Gregorin, R.; Zeballos, H.; Zamora, H. T. and Moras, L. 2014. A new species of *Eumops* (Chiroptera: Molossidae) from southwestern Peru. *Zootaxa*. 1: 019–036
- Moller, A. P. 1988. Ejaculate quality, testes size and sperm competition in primates. *Journal of Human Evolution*. 17:479-488.
- Morielle-Versute, E.; Varell-Gracia, E. M.; Taddei, V. A. 1996. Karyotypic patterns of seven species of molossid bats (Molossidae, Chiroptera). *Cytology and Cell Genetics*. 72:26-33.
- Murakami R, Mizuno T. 1984. Histogenesis of the os penis and os clitoridis in rats. *Development, Growth & Differentiation*. 26:419–426.
- Patterson, B. D.; Thaele, JR. C. 1982. The mammalian baculum: hypotheses on the nature of bacular variability. *Journal of mammalogy*. 63 1:1-15.
- Ramm, S. A., 2007. Sexual Selection and Genital Evolution in Mammals: A phylogenetic analysis of baculum length. *The American Naturalist*. 169:360-369.
- Romer, A. S. 1970. The vertebrate body. W. B. Saunders, Philadelphia, 601 pp.

- Rowe, L.; and Arnqvist, G. 2011. Sexual selection and the evolution of genital shape and complexity in water striders. *Evolution*. 66-1: 40–54.
- Ruth, E. B. 1934. The os priapi: a study in bone development. *Anatomical Records*. 60:231-244.
- Ryan, J. M., 1991a. Comparative morphology of the glans penis in *Molossus*, *Promops* and *Eumops* (Chiroptera: Molossidae). Contributions to mammalogy in honor of Karl F. Koopman. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 206, 122-137.
- Ryan, J. M., 1991b. Morphology of the glans penis in four genera of molossid bats (Chiroptera: Molossidae). *Journal of Mammalogy*. 72:658-668.
- Sachs, B. D.; Glater, G. B.; O'Hanlon, J. K. 1984. Morphology of the erect glans penis in rats under various gonadal hormone conditions. *Anatomical Records*. 210: 45-52.
- Short, R. V. 1979. Sexual selection and its components, somatic and genital selection, as illustrated by man and the great apes. *Advances in the Study of Behavior*. 9:131-158.
- Smith, J. D.; Madkour, G. 1980. Penial morphology and the question of Chiroptera phylogeny. In Wilson, D.E., Gardner, A.L. (Eds.), Proceedings of the Fifth International Bat Research Conference. *Texas tech University press*. pp. 347-365.
- Simmons, N. B. 2005. Order Chiroptera. Pp. 312-529 in *Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference*. 3rd ed., vol 1. (D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds.) Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland.
- Timm, R. M.; Genoways, H. H. 2004. The Florida bonneted bat, *Eumops floridanus* (Chiroptera:Molossidae): distribution, morphometrics, systematic, and ecology. *Journal of Mammalogy*. 85: 852-865.
- Trierveiler, F.; Andrade, F.M.; Freitas, T. R. O. 2002. Karyotype of *Eumops auripendulus* major (Chiroptera: Molossidae) and its first recorded sighting in southern Brazil. *Mammalia*. 66: 303-306.
- Van-Staaden, M. J. V.; Jones, J. R. J. K. 1997. Comparative morphology of dorsal hair of New World bats of the family Molossidae. Pp. 373-391, in Homenaje al Profesor Ticul Álvarez (Arroyo-Cabrales, J. and Polaco, O.J., eds). Instituto Nacional de Antropología e Historia, Mexico, 391pp.
- Wimsatt, W. A.; Kallen, F.C. 1952. Anatomy and histophysiology of the penis of a vesperilionid bat, *Myotis lucifugus lucifugus*, with particular reference to its vascular organization. *Journal of Morphology*. 90:415-465.
- Yonezawa, T.; Higashi, M.; Yoshioka, K.; e Ken-ichiro Mutoh. 2011. Distribution of aromatase and sex steroid receptors in the baculum during the rat life cycle: effects of

estrogen during the early development of the baculum. *Biology of Reproduction*. 85:105–112

Legenda das Figuras:

Figura 1. Imagens da glânde peniana de *E. auripendulus* (A, C e E) e *E. glaucinus* (B, D e F) após procedimentos de diafanização. A-B: vista ventral; C-D: vista dorsal; E-F: vista lateral. Asterisco: monte bacular; MU: meato urinário; LL: lóbulo lateral; seta: prega lateral; PV: projeção ventral; cabeça de seta: sulco dorsal.

Figura 2. Imagens da glânde peniana de *E. bonariensis* (A e C) e *E. perotis* (B e D), após os procedimentos de diafanização. A-B: vista ventral; C-D: vista dorsal. Asterisco: monte bacular; seta larga: meato urinário; seta fina: sulco lateral; PV: projeção ventral.

Figura 3. Imagens da glânde peniana e do báculo de A-B: *E. auripendulus*; C-D: *E. glaucinus*, após os procedimentos de diafanização, o báculo está marcado em vermelho dentro das glândes (A e C).

Figura 4. Imagens da glânde peniana e do báculo de A-C: *E. bonariensis*; D-F: *E. perotis*, após os procedimentos de diafanização, o báculo está marcado em vermelho dentro das glândes (A e D). B, C, E e F: báculos das respectivas espécies nas vistas lateral (B e E) e dorsal (C e F).

Figura 5: Cortes transversais em diferentes alturas da glânde peniana de A-B: *E. bonariensis*; C-D: *E. glaucinus* e E-F: *E. perotis*. A: coloração por tushmman's blue; B-F: coloração por HE. CC: corpo cavernoso; asterisco: tecido difuso; N: nervo; U: uretra; cabeça de seta: corpo esponjoso; P: prepúcio; seta: báculo.

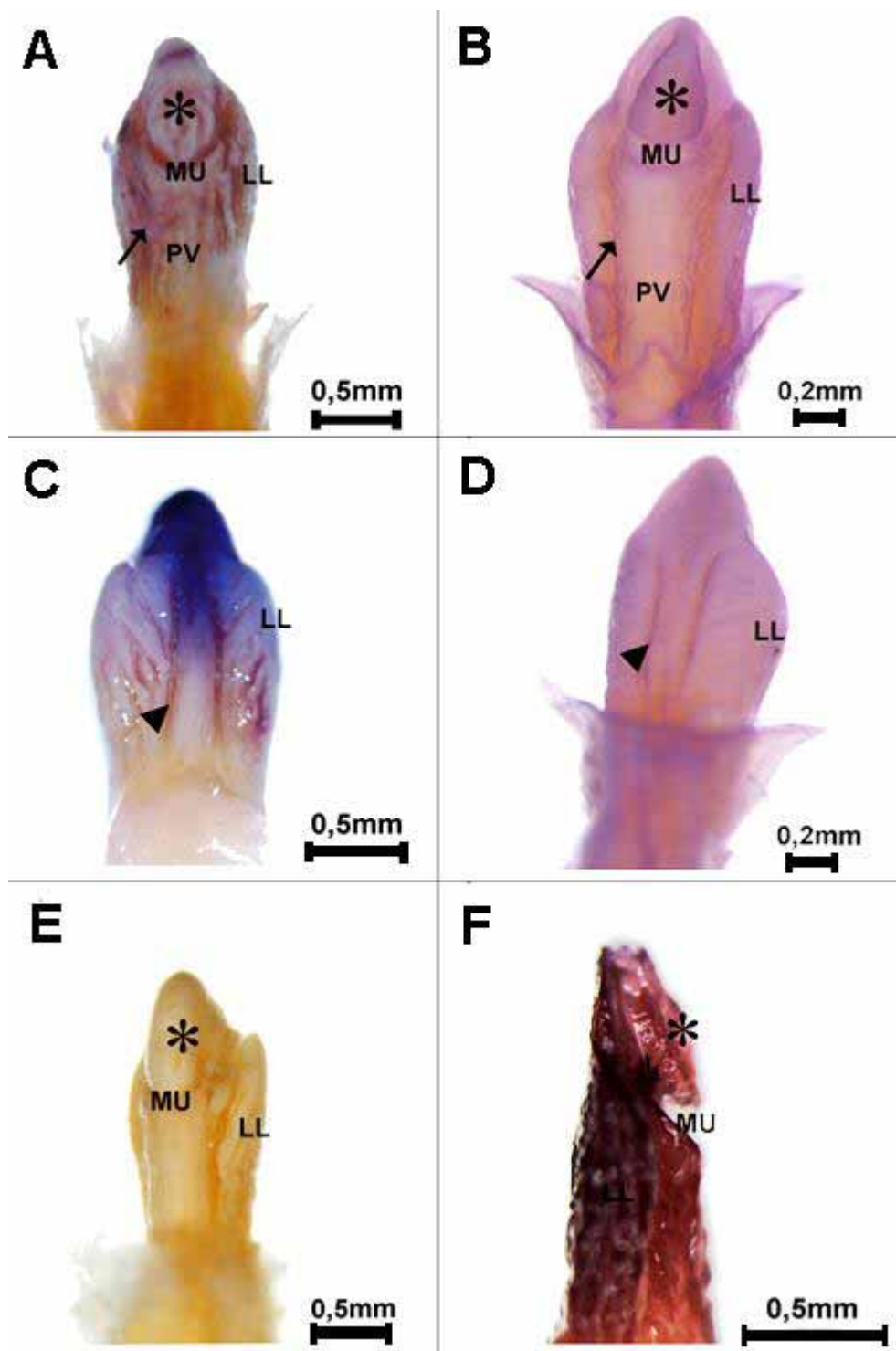


Figura 1. Imagens da glânde peniana de *E. auripendulus* (A, C e E) e *E. glaucinus* (B, D e F) após procedimentos de diafanização. A-B: vista ventral; C-D: vista dorsal; E-F: vista lateral. Asterisco: monte bacular; MU: meato urinário; LL: lóbulo lateral; seta: prega lateral; PV: projeção ventral; cabeça de seta: sulco dorsal.

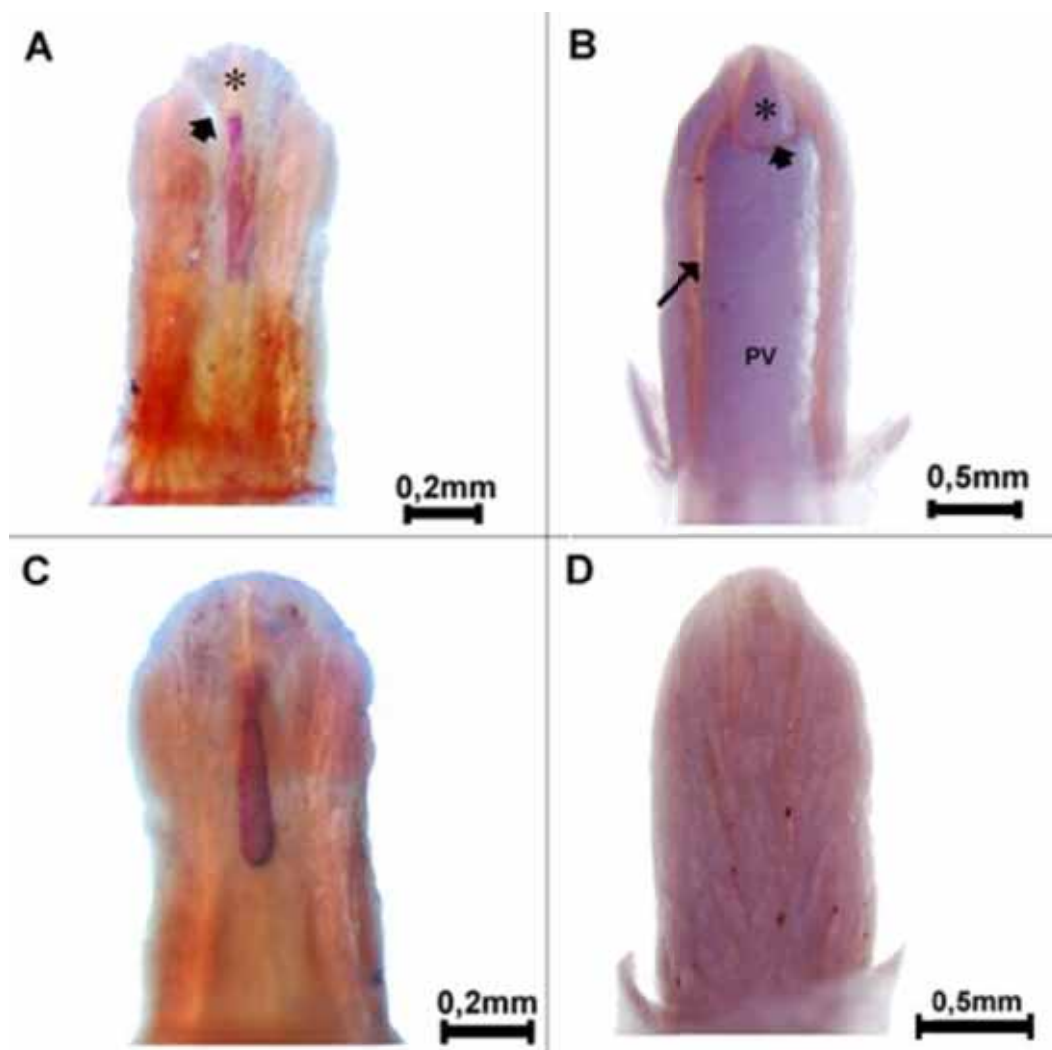


Figura 2. Imagens da glânde peniana de *E. bonariensis* (A e C) e *E. perotis* (B e D), após os procedimentos de diafanização. A-B: vista ventral; C-D: vista dorsal. Asterisco: monte bacular; seta larga: meato urinário; seta fina: sulco lateral; PV: projeção ventral.

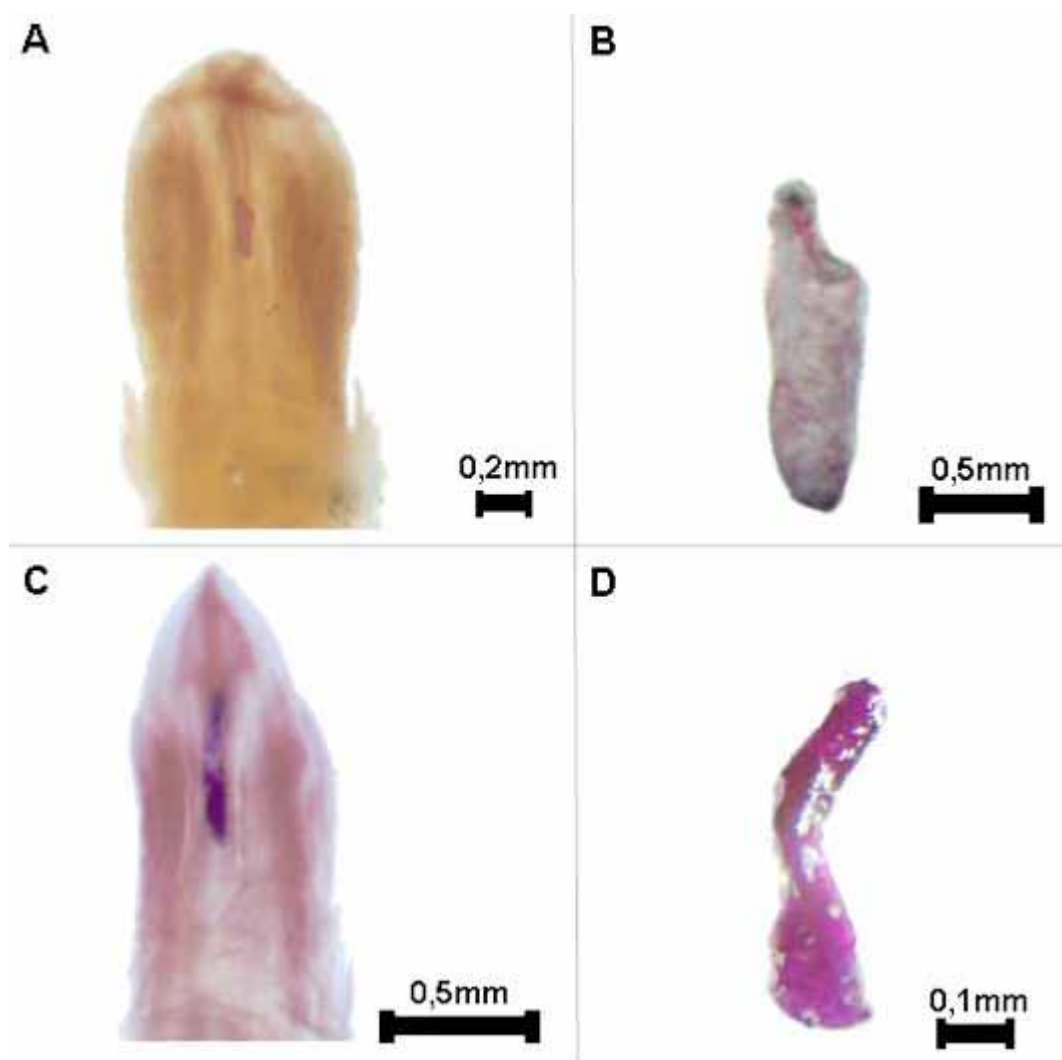


Figura 3. Imagens da glânde peniana e do báculo de A-B: *E. auripendulus*; C-D: *E. glaucinus*, após os procedimentos de diafanização, o báculo está marcado em vermelho dentro das glândes (A e C).

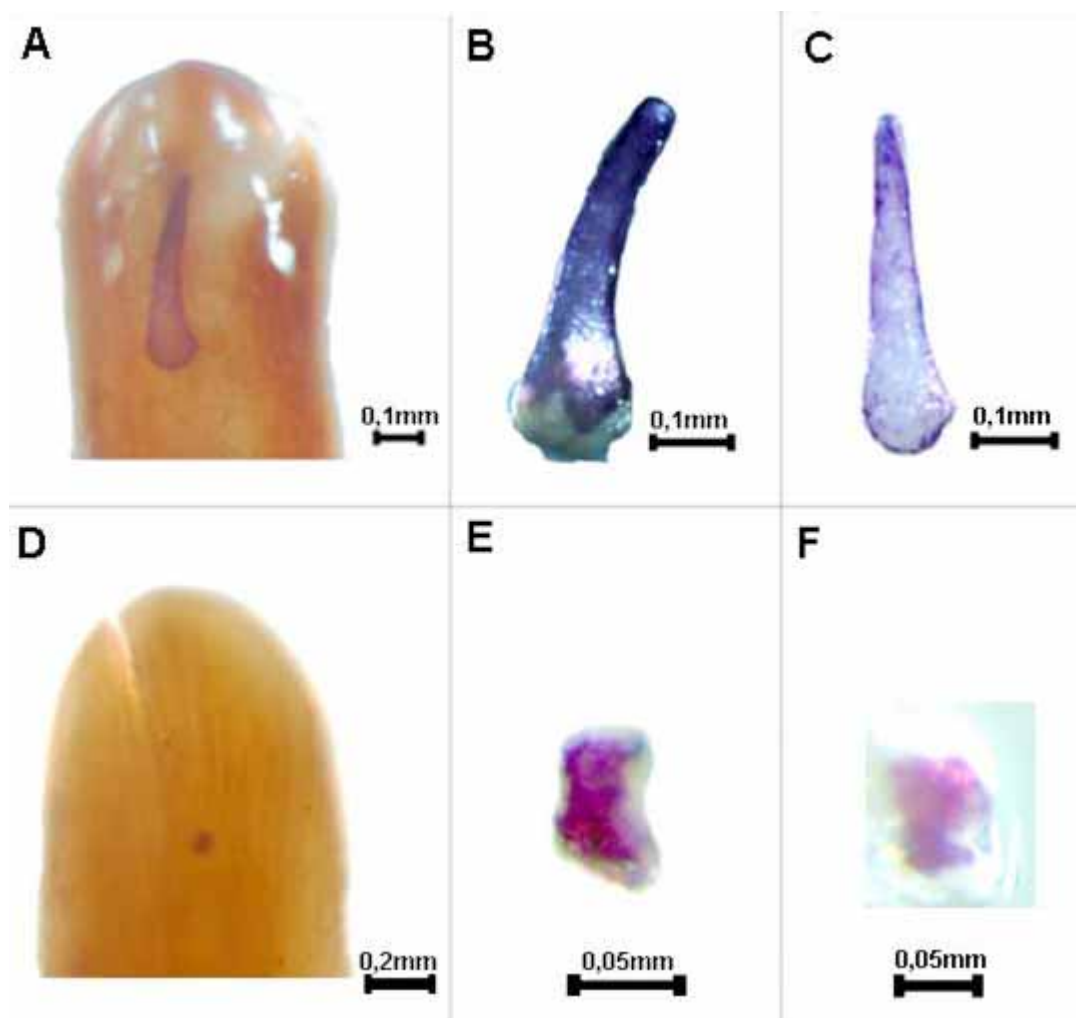


Figura 4. Imagens da glânde peniana e do báculo de A-C: *E. bonariensis*; D-F: *E. perotis*, após os procedimentos de diafanização, o báculo está marcado em vermelho dentro das glândes (A e D). B, C, E e F: báculos das respectivas espécies nas vistas lateral (B e E) e dorsal (C e F).

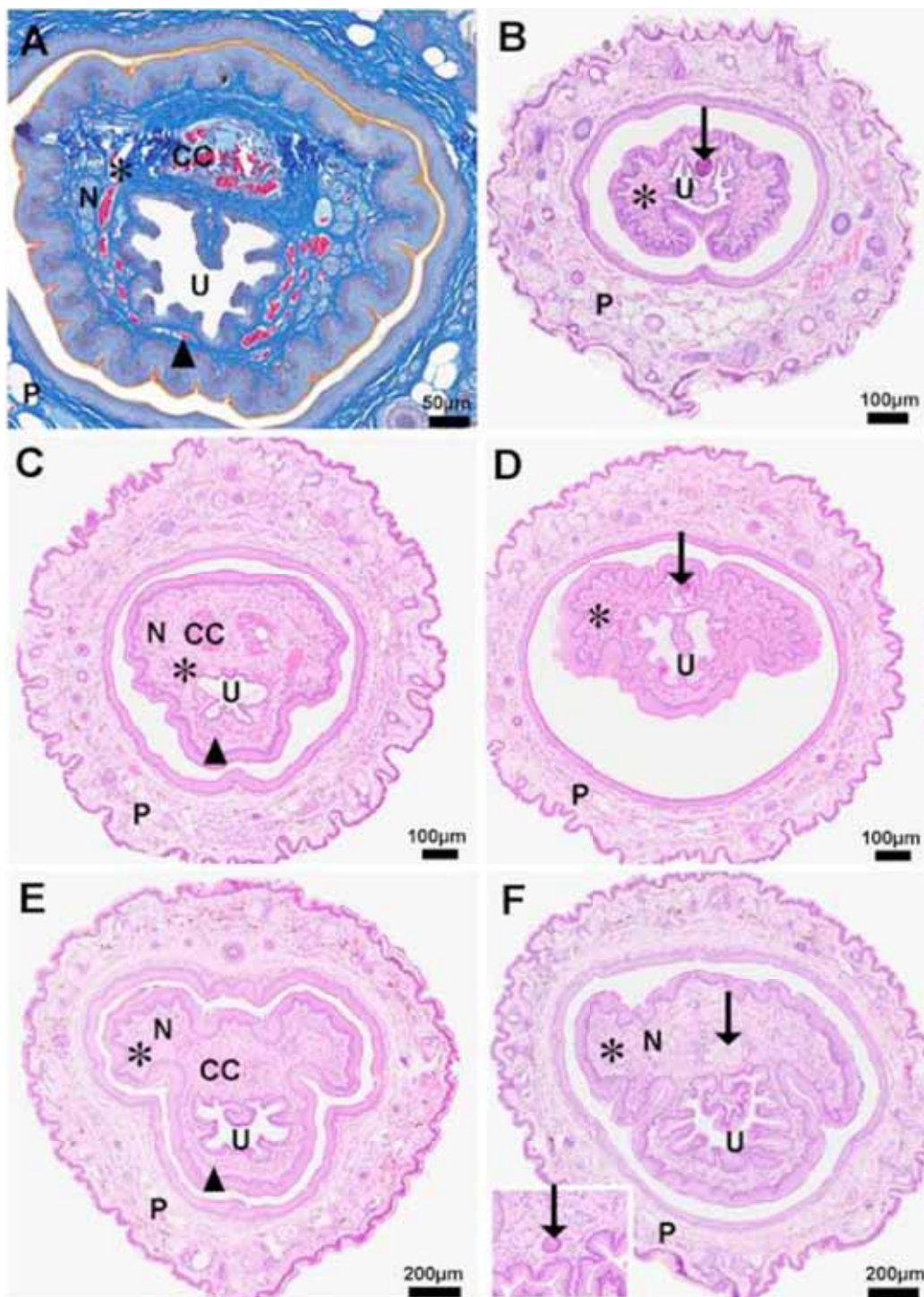


Figura 5: Cortes transversais em diferentes alturas da glânde peniana de A-B: *E. bonariensis*; C-D: *E. glaucinus* e E-F: *E. perotis*. A: coloração por tushmman's blue; B-F: coloração por HE. CC: corpo cavernoso; asterisco: tecido difuso; N: nervo; U: uretra; cabeça de seta: corpo esponjoso; P: prepúcio; seta: báculo.

VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Matthews (1937, 1941) foi um dos primeiros cientistas a descrever a anatomia do sistema masculino em microquirópteros, concluindo que existem dois tipos básicos de pênis: os que possuem glândula simples com prepúcio espesso e vascular, e aqueles com glândula complexa e prepúcio fino e retrátil. Nossos resultados apontam que os molossídeos estão incluídos no segundo tipo, possuindo prepúcio fino, retrátil e pouco vascularizado e uma glândula complexa com alta variação morfológica entre os gêneros.

De maneira geral o pênis dos gêneros analisados apresenta três tecidos eréteis, sendo dois principais, o tecido cavernoso e o tecido cavernoso difuso e outro menos desenvolvido, o tecido esponjoso da uretra. Os dois primeiros são bem desenvolvidos, compondo a maior parte da massa peniana. A coloração por meio de tricrômico de Tuchman's blue marcou as células musculares lisas presentes nas trabéculas desse tecido, confirmando sua natureza erétil e possibilitando que afirmássemos se tratar de um tecido erétil difuso- pela falta de uma túnica ao seu redor.

Diferenças na quantidade e na localização desse tecido foram observadas para os gêneros, sendo que nos espécimes de *Molossops temminckii* e *Cynomops planirostris* este chega a ocupar a maior parte da glândula em porções mais basais e toda a glândula em porções mais apicais. Para os espécimes de *Molossus*, o tecido está concentrado na região dorsal da glândula e em *Eumops* encontra-se a menor quantidade desse tecido.

Diferentemente da condição observada para alguns gêneros de morcegos vespertilionídeos e para humanos esses dois tecidos cavernosos estão presentes na glândula peniana dos molossídeos analisados, o que pode ser considerada uma característica primitiva para o grupo (Smith e Madkour, 1980). A literatura aponta que o tecido difuso por sua vez, não é encontrado em todos os grupos de molossídeos, e sua presença é considerada como característica primitiva dentro de Chiroptera (Smith e Madkour, 1980). Apesar da denominação “cavernoso” dados apontam que os tecidos cavernoso e

cavernoso difuso não apresentam relação ou homologia, sugerindo que cada um apresente origem e desenvolvimento diferentes e independentes (Winssat e Kallen 1952)

O corpo esponjoso, o terceiro e último tecido erétil presente, é pouco desenvolvido, estando apenas restrito a uma pequena faixa ao redor da uretra, sendo que esta característica parece ser típica da família Molossidae (Matthews, 1941). Considerando-se o alto grau de desenvolvimento desse tecido em humanos, o tecido esponjoso pouco desenvolvido também é considerado uma característica primitiva para o grupo (Smith e Madkour, 1980). Comparando-os novamente com alguns táxons de Vespertilionidae podemos supor, entretanto, que este caráter não é compartilhado por todas as famílias de morcegos, visto que alguns vespertilionídeos já descritos e o *Eptesicus furinalis* apresentam esse tecido relativamente desenvolvido (Winssat e Kallen 1952; Comelis et al., 2015 *in preparação*). Mesmo entre os molossídeos podemos ver diferentes graus de desenvolvimento desse tecido, sendo que em *Eumops* e porções basais de *Molossops* encontramos o maior grau de desenvolvimento deste.

Projeções epidérmicas são encontradas em diversas ordens dentro dos mamíferos, incluindo os Chiroptera (Aroson e Cooper, 1967; Sachs et al, 1984; Krutzsch e Crichton, 1987; Ryan, 1991; Kelly, 2000). Nas espécies analisadas apenas os representantes do gênero *Eumops* não apresentaram essas projeções. Os demais gêneros as apresentaram, e estas possuem formato similar em todos, de cabeça de seta, variando apenas em tamanho e distribuição ao longo da glândula. A função das projeções epidérmicas ainda não foi completamente entendida, porém dados da literatura sugerem uma possível relação com a remoção de *plugs* copulatórios, estimulação do trato reprodutivo das fêmeas, ou ainda, uma possível relação com o prolongamento de coito em morcegos molossídeos. (Aroson e Cooper, 1967; Sachs et al., 1984; Krutzsch e Crichton, 1987; Ryan, 1991; Kelly, 2000).

O báculo está presente nas espécies do gênero *Molossus*, *Nyctinomops* e *Eumops*, estando ausente nos gêneros *Cynomops*, *Molossops* e

Neoplatimops. Entretanto, o osso peniano mostra-se como um caráter de grande variabilidade dentro da família, tanto em sua morfologia quanto na sua presença ou não dentro dos grupos. Como exemplo dessa variação está o gênero *Eumops*, onde *E. glaucinus* e *E. bonariensis* apresentam um báculo grande e côncavo, *E. auripendulus* apresenta um báculo curto e reto e *E. perotis* onde alguns espécimes apresentam um báculo diminuto e outros não apresentam a estrutura.

Pouco se sabe acerca da relação anatômica do báculo com o restante do pênis, sua origem, ou sua importância funcional durante a cópula (Kelly, 2000). Dados da literatura apontam sua origem através da ossificação da porção mais distal do corpo cavernoso (Smith e Madkour, 1980), ou até mesmo uma origem mais complexa, como o referido por Glucksmann *et al.*, (1976), que apontam que essas duas estruturas compartilhariam a mesma massa de tecido mesenquimal durante o desenvolvimento embrionário do pênis de camundongos. Apesar da conhecida variação em sua morfologia, poucos estudos analisaram sua real capacidade como elemento distintivo entre espécies do mesmo gênero.

Pode-se notar uma grande semelhança morfológica entre as espécies congênicas, fato que corrobora com a manutenção de *Cynomops* e *Neoplatymops* como gêneros separados de *Molossops*. Apesar das semelhanças histológicas anteriormente apresentadas e da ausência de um báculo, no geral a glândula peniana dessas espécies apresenta uma morfologia muito diversa, não característica de espécies pertencentes ao mesmo gênero; assim, juntamente com outras características previamente estudadas (Freeman, 1981) reforçamos a manutenção das espécies em gêneros separados.

Os resultados evidenciam que várias características observadas são compartilhadas entre os diferentes táxons, sugerindo que elas representam características comuns de Molossidae, entretanto, há características que podem ser reconhecidas como pertencentes a níveis taxonômicos inferiores como os diferentes gêneros e espécies.

XI. REFERÊNCIAS

- Aronson, L. R.; Cooper, M. L. 1967. Penile spines of the domestic cat: their endocrine-behavior relations. *Anatomical Records* 157: 71-78
- Freeman, P. W. 1981. A multivariate study of the family Molossidae (Mammalia, Chiroptera): morphology, ecology, evolution. *Fieldiana Zoology*. 7:1-105.
- Glucksmann, A.; Ooka-Souda, S.; Miura-Yasug, E.; Mizuno, T. 1976. The effect of neonatal treatment of male mice with antiandrogens and of females with androgens on the development of the os penis and os clitoridis. *Jouranl of Anatomy*. 121:363-370.
- Kelly, D. A., 2000. Anatomy of the baculum-corpous cavernosum interface in the norway rat (*Rattus norvegicus*), and implications for force transfer during copulation. *Journal of Morphology*. 244: 69-77.
- Krutzsch, P. H.; Crichton, E.G. 1987. Reproductive biology of the male little mastiff bat, *Mormopterus planiceps* (Chiroptera: Molossidae), in southeast Australia. *American Journal of Anatomy*. 178: 352-368.
- Matthews, L. H., 1937. The form of the penis in the British rhinolophid bats, compared with that of the vespertilionid bats. *Trans. Zoological Society of London*. 23: 213-223.
- Matthews, L. H., 1942. Notes on the genitalia and reproduction of some African bats. *Journal of Zoology. Proc. Zool. Soc. London Ser. B*. 3: 289-346.
- Ryan, J. M., 1991a. Comparative morphology of the glans penis in *Molossus*, *Promops* and *Eumops* (Chiroptera: Molossidae). Contributions to mammalogy in honor of Karl F. Koopman. *Buletin of American Musian of Natatural History*. 206: 122-137.
- Ryan, J. M., 1991b. Morphology of the glans penis in four genera of molossid bats (Chiroptera: Molossidae). *Journal of Mammalogy* 72:658-668.
- Sachs, B. D.; Glater, G. B.; O'Hanlon, J. K. 1984. Morphology of the erect glans penis in rats under various gonadal hormone conditions. *Anatomical Records* 210: 45-52.
- Smith, J. D.; Madkour, G. 1980. Penial morphology and the question of Chiroptera phylogeny. In Wilson, D.E., Gardner, A.L. (Eds.), Proceedings of the Fifth International Bat Research Conference. *Texas tech University press*. pp. 347-365.
- Wimsatt, W. A.; Kallen, F.C. 1952. Anatomy and histophysiology of the penis of a vespertilionid bat, *Myotis lucifugus lucifugus*, with particular reference to its vascular organization. *Journal of Morphology*. 90: 415-465.