



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Manuela Tosi Comelis Martins

Análise estrutural e funcional do pênis e da próstata de
espécies de morcegos neotropicais

São José do Rio Preto
2019

Análise estrutural e funcional do pênis e da próstata de espécies de morcegos neotropicais

Manuela Tosi Comelis Martins

DOUTORADO

PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

Biologia
Estrutural



Manuela Tosi Comelis Martins

Análise estrutural e funcional do pênis e da próstata de espécies de morcegos neotropicais

Tese a ser apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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.

Financiadora: FAPESP- Proc. 2015/ 06923-9.

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

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Maíra Góes

São José do Rio Preto
2019

M386a

Martins, Manuela Tosi Comelis

Análise estrutural e funcional do pênis e da próstata de espécies de morcegos neotropicais / Manuela Tosi Comelis Martins. -- São José do Rio Preto, 2019

128 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Eliana Morielle Versute

Coorientadora: Rejane Maíra Góes

1. Biologia da reprodução.. 2. Morfologia (Animais).. 3. Sistema genital masculino.. 4. Próstata.. 5. Pênis.. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Manuela Tosi Comelis Martins

Análise estrutural e funcional do pênis e da próstata de espécies de morcegos neotropicais

Tese a ser apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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.

Financiadora: FAPESP- Proc. 2015/ 06923-9.

Banca examinadora:

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

Prof. Dr. Mateus Rodrigues Beguelini – UFOB – Barreiras

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

Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos – UFG – Goiânia

Prof^ª. Dr^ª. Patricia Simone Leite Vilamaior – UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
28 Março 2019

À minha avó Lou

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 e torcida, 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. E, finalmente, pelo exemplo de profissional que sempre me deu.

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

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

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

Pela ajuda do pessoal do LMM que sempre estiveram dispostos a solucionar minhas dúvidas.

As meninas do lab, Lari, Di e Fer, pelo companheirismo, coletas, ajudas bat coffes e almoços japoneses. Por tornarem o ambiente de trabalho um lugar mais leve e divertido.

Ao meu marido Vinícius, pela parceria e paciência sempre, mesmo nas coletas.

Aos meus amigos da Física e de Mirassol por todo suporte, amizade e ajuda.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal e a todos os professores do curso de Ciências Biológicas, que tão importantes foram na minha formação.

Agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2015/06923-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

***O sucesso nada mais é que ir de
fracasso em fracasso sem que se perca o
entusiasmo***

(Winston Churchill).

RESUMO

Os morcegos têm entre os mamíferos, a maior distribuição geográfica, o que influencia diretamente suas estratégias reprodutivas. Por esta razão a morfologia dos órgãos reprodutores, a fisiologia e o comportamento reprodutivo de Chiroptera são altamente complexos e diversos. Apesar dessa grande variedade ainda se sabe muito pouco sobre os aspectos reprodutivos dos diferentes táxons. Assim, foi objetivo do presente estudo avaliar estrutural e funcionalmente o pênis e a próstata de espécies de morcegos neotropicais. Foram feitas análises morfológicas e imuno-histoquímicas para próstata de *Molossus molossus* e *Eptesicus furinalis*, e do pênis de *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Platyrrhinus lineatus*, *Sturnira lilium*, *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina* e *Phyllostomus discolor*, de Phyllostomidae. As análises das próstatas revelaram um padrão diferente quando comparadas as espécies, tanto na morfologia quanto na atividade sazonal. *E. furinalis* possui próstata com região dorsal bilobulada e ventral única e compacta, enquanto a próstata de *M. molossus* possui região dorsal tetralobulada e ventral única. As análises anuais mostraram um padrão diferente em ambas às espécies, sendo a próstata de *E. furinalis* influenciada pelo processo de regressão testicular. A próstata de *M. molossus* mostrou sincronia com os picos reprodutivos anteriormente descritos para a espécie, apresentando períodos de baixa atividade, porém sem influência da regressão testicular, visto que a espécie não apresenta esse comportamento. As análises do pênis mostram a ausência de báculo em espécies de morcegos filostomídeos. A constituição histológica do pênis é essencialmente vascular, apresentando todos os corpos eréteis tradicionais, bem como o tecido cavernoso acessório. Os tecidos eréteis variaram em número e quantidade, estando sempre presentes na região da glândula. O prepúcio apresentou tecido adiposo e grande quantidade de pigmento, bem como musculatura estriada nas espécies *C. perspicillata* e *G. soricina*. Esta última ainda não referida para as espécies de morcegos já analisadas e aqui observadas. Outra característica única foi observada na glândula das espécies de *Artibeus*, que possui tecido cavernoso acessório recoberto por túnica na região ventral do prepúcio. Assim, os resultados mostram a variação na morfologia da próstata decorrente das variações anuais nas espécies *E. furinalis* e *M. molossus*, bem como a descrição do pênis e da glândula peniana nas espécies de Phyllostomidae.

Palavras-chave: Baculum, Chiroptera, morfologia peniana, próstata, regressão testicular.

ABSTRACT

Bats have the largest geographical distribution among mammals, which directly influence their reproductive strategies. For this reason, the morphology of the reproductive organs, the physiology and the reproductive behavior of Chiroptera are highly complex and diverse. Despite this great variety, very little is known about the reproductive aspects of the different taxa. Thus, the aim of the present study was to evaluate structurally and functionally the penis and prostate of neotropical bats species. Immunohistochemical and morphological analyses were performed for the prostate of *Molossus molossus* and *Eptesicus furinalis*, and the penis of *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Platyrrhinus lineatus*, *Sturnira lilium*, *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina* e *Phyllostomus discolor* of *Phyllostomidae*. Analyses of prostates revealed a different pattern when compared the two species, both in morphology and in seasonal activity. *Eptesicus furinalis* has bilobed dorsal prostate and a single, compact ventral prostate, whereas the *M. molossus* prostate has a single, compact ventral prostate and a tetralobular dorsal prostate. Annual analyses showed a different pattern in both species, with the prostate of *E. furinalis* being influenced by the testicular regression process. The *M. molossus* prostate showed synchrony with the reproductive peaks previously described for the species, presenting periods of regression, but without an influence of the testicular regression, since the species does not present this behavior. The analysis of the penis shows the absence of a baculum in species of phyllostomid bats. The histological constitution of the penis is essentially vascular, presenting all the traditional erectile tissues as well as the accessory cavernous tissue. The erectile tissues varied in number and quantity, being always present in the glans region. The prepuce presented adipose tissue and a great amount of pigment, as well as striated musculature in the species *C. perspicillata* and *G. soricina*. This last one is not yet mentioned for the species of bats already analyzed and here observed. Another unique characteristic was observed in the glans of *Artibeus* species, which has accessory cavernous tissue covered by tunic in the ventral region of the prepuce. The results show the variation in prostate morphology due to seasonal variations in the species *E. furinalis* and *M. molossus*, as well as the description of penile and penile glans in *Phyllostomidae* species.

Keywords: Baculum, Chiroptera, glans penis morphology, prostate, testicular regression.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	- 8 -
OBJETIVOS	- 14 -
RESULTADOS	- 15 -
CAPÍTULO I	- 16 -
"Variação morfológica no complexo prostático de <i>Eptesicus furinalis</i> (Chiroptera: Mammalia) no processo de regressão testicular".	
CAPÍTULO 2	- 46 -
"Alterações anuais da morfofisiologia da próstata de <i>Molossus molossus</i> (Chiroptera: Molossidae)".	
CAPÍTULO 3	- 78 -
"Histomorphology of the glans penis in Vespertilionidae and Phyllostomidae species (Chiroptera, Mammalia)".	
CONSIDERAÇÕES FINAIS	- 122 -
REFERÊNCIAS	- 124 -

INTRODUÇÃO GERAL

A ordem Chiroptera é uma das mais características e diversas ordens de Mammalia (SIMMONS, 2015). Ela inclui os únicos mamíferos voadores e apresenta aproximadamente 1300 espécies agrupadas em 20 famílias (FENTON & SIMMONS, 2014; VOIGHT & KINGSTON, 2016). No Brasil estão presentes 178 espécies reunidas em 68 gêneros e nove famílias. Destas, destacam-se por possuir maior número de espécies as famílias Phyllostomidae (92), Molossidae (29) e Vespertilionidae (28) (NOGUEIRA *et al.*, 2014). As famílias Vespertilionidae e Molossidae incluem morcegos exclusivamente insetívoros (REIS *et al.*, 2007) e apresentam ampla distribuição mundial (LAVAL & FITCH, 1977; BARCLAY & BRIGHAM, 1991; WILSON & REEDER, 2005). Já a família Phyllostomidae é endêmica do novo mundo sendo considerada a família de mamíferos com a maior diversidade de hábitos alimentares (KUNZ & FENTON, 2003).

Os morcegos são o grupo com maior distribuição geográfica dentro dos mamíferos, estando ausentes apenas na Antártica e algumas ilhas oceânicas (NOWAK, 1999). O sucesso do grupo deve-se principalmente a capacidade de voar e a ecolocalização, características que permitiram que os Chiroptera se dispersassem por todo o globo. Como consequência dessa presença em diferentes habitats, os morcegos desenvolveram uma grande variedade de hábitos alimentares, apresentando a maior variação dentre todos os mamíferos, podendo ser carnívoros, insetívoros, frugívoros, nectarívoros e até mesmo hematófagos (FENTON, 1992).

A ampla distribuição geográfica do grupo também influencia diretamente na sua reprodução, sendo considerada a ordem com maior diversidade de estratégias reprodutivas dentre todas as ordens de Mammalia (CRICHTON & KRUTZSCH, 2000). Tanto as estratégias reprodutivas, quanto a morfologia e a fisiologia da reprodução de Chiroptera são altamente complexas e diversas, apresentando variações em relação à latitude, bem como variações

taxonômicas, dentro da família, gênero ou até mesmo, espécie (CRICHTON & KRTUZZSCH, 2000).

As estratégias reprodutivas sofrem influência de fatores fisiológicos e ambientais, como clima e disponibilidade de alimento (FLEMING *et al.*, 1972; RACEY & ENTWISE, 2000) e podem ser detectadas através de avaliação comportamental ou funcional das gônadas e glândulas acessórias (SWAMI & LALL, 1982; BEGUELINI *et al.*, 2013; MORAIS *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2015, 2016).

Os morcegos desenvolveram algumas características reprodutivas distintas em resposta aos diversos fatores que influenciam os padrões reprodutivos. Os machos das espécies de regiões temperadas, por exemplo, podem apresentar regressão testicular, armazenamento prolongado de espermatozoides na cauda do epidídimo e, assincronia entre a espermatogênese e a cópula, já as fêmeas podem apresentar armazenamento prolongado de espermatozoides no corno uterino e atraso na ovulação, fertilização e implantação do embrião no trato reprodutivo (GUSTAFSON, 1979; KRUTZSCH, 1979; CRICHTON & KRUTZSCH, 2000; BEGUELINI *et al.*, 2009, 2011; BUENO *et al.*, 2014). Essas características aumentam o interesse nos estudos sobre os morcegos de regiões temperadas em relação aos de regiões tropicais.

A reprodução dos morcegos de regiões tropicais sofre influência dos fatores abióticos, tais como temperatura, precipitação, fotoperíodo e disponibilidade de alimentos (FLEMING *et al.*, 1972; TADDEI, 1976). Assim, também há uma grande diversidade de estratégias reprodutivas nessas espécies, como, por exemplo, presença de padrões monoéstricos, poliéstricos e reprodução contínua ao longo do ano (TADDEI, 1980; FAZZOLARI-CORRÊA, 1995; ZORTÉA, 2003). Alguns casos de regressão testicular, onde o testículo volta a apresentar características pré-puberes, sendo visualizadas apenas células de Sertoli e espermatogônias, podem ser encontrados em espécies como *Scotophilus heathi* (KRISHNA & SINGH, 1997), *Pipistrellus*

rusticus (VAN DER MERWE & RAUTENBACH, 1990), e *Lasiurus ega* (MYERS, 1977) entre outros, mesmo estas não hibernando (BEGUELINI *et al.*, 2013, 2015; BUENO *et al.*, 2014). *Eptesicus furinalis* e *Myotis nigricans* compartilham essa característica de regressão testicular apesar de não serem espécies hibernantes, apresentando dois, e não apenas um período de regressão testicular no ciclo reprodutivo anual, fato único dentre as espécies tropicais até então analisadas (BEGUELINI *et al.*, 2013; NEGRIN *et al.*, 2014; BUENO *et al.*, 2014).

No geral o aparelho reprodutor masculino dos mamíferos eutérios consiste em um par de testículos, um par de epidídimos, o pênis, e as glândulas reprodutivas acessórias (GRAs) (POUGH, 2008). Nos testículos ocorre a espermatogênese, processo de divisão e diferenciação celular que ocorre nos túbulos seminíferos, no qual as espermatogônias se diferenciam em espermatozoides (MATSUMOTO, 1996). Já no epidídimo ocorre a maturação, armazenamento e o transporte dos espermatozoides. As glândulas reprodutivas acessórias masculinas, por sua vez, secretam produtos que irão garantir a sobrevivência, viabilidade e a motilidade dos espermatozoides (ROCHEL *et al.*, 2007).

Apesar da produção de espermatozoides e seu controle hormonal serem conservados entre os mamíferos (CLERMONT, 1972), os táxons podem exibir diferenças morfológicas no aparelho reprodutivo em si, como variações penianas e das GRAs (RYAN, 1991 a,b; PUGA *et al.*, 2012; BEGUELINI *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2016; COMELIS *et al.*, 2018).

Em morcegos as estruturas reprodutivas seguem o padrão de mamíferos, com variações especialmente na morfologia e tamanho das estruturas principais, e na presença, morfologia e tamanho das GRAs (próstata, vesículas seminais, glândulas ampulares e glândulas bulbouretrais) que podem ou não estar presentes (CRINCHTON & KRUTZCH, 2000).

O desenvolvimento normal, a diferenciação e a manutenção da integridade funcional e estrutural da próstata e demais glândulas reprodutivas

acessórias é diretamente ligado aos níveis séricos de andrógenos, que são produzidos pelos testículos e pelas glândulas adrenais; ocorrendo por meio de interações entre o estroma e o epitélio (PRICE, 1963; DOUNJACOUR & CUNHA, 1988; AUMULLER & SEITZ, 1990; COOKE *et al.*, 1991; CUNHA *et al.*, 1996; ROSAI, 1996; HAYWARD *et al.*, 1997).

A morfologia da próstata varia entre os animais sendo reconhecidos três tipos: disseminada ou difusa, compacta e mista. No primeiro caso os componentes glandulares estão distribuídos no estroma da uretra. Esse tipo de próstata é encontrado nas ovelhas e gambá. O segundo tipo forma uma glândula compacta ao redor da uretra, onde os ácinos formam um corpo externo, que pode ou não ser lobulado; como encontrado no homem e no rato. Já o terceiro tipo é uma combinação dos dois primeiros, como no touro onde há um corpo externo que é contínuo com uma região disseminada (PRICE, 1963).

É usualmente descrito que a próstata dos morcegos pertence ao segundo tipo sendo, portanto, compacta e normalmente lobulada, porém, ainda há pouca informação acerca da estrutura no grupo. Além dos poucos dados disponíveis a maioria dos estudos tem como alvo morcegos de clima temperado (KRUTZSCH *et al.*, 1976; LEÓN-GALVÁN *et al.*, 2005). Estudos como os de Negrin *et al.* (2014), Cristante *et al.* (2013), Puga *et al.* (2014) e Miotti *et al.* (2017), mostram que mesmo sem as mudanças climáticas existentes nas regiões temperadas os morcegos de zonas tropicais apresentam grande variação na estrutura prostática, apresentando maior ou menor quantidade de lobos, possuindo ou não estereocílios, entre outras. Esses fatos ressaltam a importância da análise do complexo prostático em espécies tropicais.

Outras estruturas reprodutivas que apresentam grande variação em morcegos e vêm ganhando espaço nas pesquisas atuais são a glândula peniana e o báculo (osso peniano) que, se presente, ocupa grande parte do seu interior. Em mamíferos há muita variação na morfologia externa e interna da glândula e do báculo, e dados anteriores para morcegos apontam uma grande variedade

de formas presente nessas estruturas para o grupo Chiroptera (RYAN, 1991 a,b; HOSKEN *et al.*, 2001; HERDINA *et al.*, 2010; ORR & BRENNAN, 2016; COMELIS *et al.*, 2015, 2018). Dados sobre a morfologia peniana e do báculo são importantes para estudos reprodutivos e sobre a evolução genital, além de poderem ser utilizados na taxonomia do grupo (HAMILTON JR., 1949; BROWN *et al.*, 1971; ALBAYRAK & ASAN, 2001; HERDINA *et al.*, 2015; COMELIS *et al.*, 2015, 2018)

A glânde peniana varia tanto em sua morfologia externa quanto interna, podendo ou não apresentar projeções epidérmicas, morfologia complexa, tecido cavernoso acessório, báculo, entre outras (COMELIS *et al.*, 2015, 2018). Essa complexidade evidenciada para a glânde levou Matthews (1937, 1942) a reconhecer dois tipos de glânde para Chiroptera, o primeiro agrupa glândes com morfologia complexa, maior em tamanho, com prepúcio fino e retrátil; já o segundo tipo agrupa as glândes menores, com morfologia simples, prepúcio espesso e altamente vascularizado. Como exemplo de espécies que possuem o primeiro tipo de glânde podemos citar as pertencentes à família Molossidae, e para o segundo tipo as pertencentes à família Vespertilionidae.

Atualmente as principais famílias que se tem conhecimento sobre a morfologia peniana são Vespertilionidae (HERDINA *et al.*, 2010; COMELIS *et al.*, 2015,) e Molossidae (RYAN, 1991 a,b; COMELIS *et al.*, 2018). Dados para as demais famílias ainda são escassos, o que inclui a Phyllostomidae onde a diversidade morfológica dos táxons é evidente. O conhecimento sobre a morfologia da glânde peniana nas espécies da família limita-se a ausência de báculo ou osso peniano em algumas espécies (BROWN, *et al.*, 1971; HOSKEN *et al.*, 2001).

Acredita-se que a ausência de báculo seja uma característica derivada dentro do clado dos Chiroptera (SMITH & MADKOUR, 1980; RYAN, 1991 a,b), o que entra em acordo com a posição de Phyllostomidae na filogenia do grupo (SIMMONS, 2005). O fato é que apesar do maior interesse atual sobre a glânde peniana e o báculo, pouco se sabe sobre a sua real função durante a

cópula e o porquê de sua ausência em determinadas espécies, como é o caso de Phyllostomidae. Na família Molossidae, por exemplo, as espécies que não apresentam báculo possuem maior quantidade de tecido cavernoso acessório e uma localização diferenciada do tecido cavernoso propriamente dito (COMELIS *et al.*, 2018). Em outro caso na mesma família, espécimes de *Eumops perotis* podem apresentar ou não o osso peniano, indicando uma inconstância da presença da estrutura na espécie.

Com base nas características descritas acima conclui-se que novos estudos compreendendo as estruturas reprodutivas no grupo dos Chiroptera, tanto as GRAs quanto características penianas são necessários, de maneira a melhor compreender a reprodução nesse grupo com características tão peculiares dentro de Mammalia.

OBJETIVOS

Sabendo da importância do estudo dessas características o presente estudo teve por objetivos gerais:

Avaliar estrutural e funcionalmente o pênis e a próstata de espécies de morcegos neotropicais.

- Específicos:

1. Caracterizar histologicamente a próstata das espécies *Molossus molossus* e *Eptesicus furinalis*, com acompanhamento anual;
2. Avaliar por meio da imuno-histoquímica a distribuição dos receptores de andrógenos e da taxa de proliferação e morte celular no complexo prostático;
4. Caracterizar histologicamente o pênis das espécies de Phyllostomidae: *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Platyrrhinus lineatus* e *Sturnira lilium* (Stenodermatinae), *Carollia perspicillata* (Caroliinae), *Glossophaga soricina* (Glossophaginae) e *Phyllostomus discolor* (Phyllostominae) por meio de análises histomorfológicas;
5. Testar a hipótese de que há diferenças na constituição peniana de espécies com e sem báculo (osso peniano).

RESULTADOS

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

Capítulo 1- Manuscrito: “**Variação morfológica no complexo prostático de *Eptesicus furinalis* (Chiroptera: Mammalia) no processo de regressão testicular**”.

Capítulo 2 - Manuscrito: “**Alterações anuais da morfofisiologia da próstata de *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae)**”.

Capítulo 3 - Manuscrito: “**Histomorphology of the glans penis in *Vespertilionidae* and *Phyllostomidae* species (Chiroptera, Mammalia)**”.

CAPÍTULO 1

Variação morfológica no complexo prostático de *Eptesicus furinalis* (Chiroptera: Mammalia) no processo de regressão testicular.

(Morphological variation in the prostate complex of *Eptesicus furinalis* (Chiroptera: Mammalia) in the testicular regression process)

Variação morfológica no complexo prostático de *Eptesicus furinalis* (Chiroptera: Mammalia) no processo de regressão testicular.

Manuela T. Comelis^A, Sebastião R. Taboga^B, Rejane M. Góes^B, Eliana Morielle-Versute^A

^A Departamento de Zoologia e Botânica e ^B Departamento de Biologia, Instituto de Biosciências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Campus São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, Brasil.

*Autor Correspondente: Departamento de Zoologia e Botânica, Instituto de Biosciências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Campus São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, email: eliana.morielle-versute@unesp.br

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

Palavras chave: Chiroptera, *Eptesicus furinalis*, glândulas acessórias, próstata, sazonalidade.

Resumo

A capacidade de voo juntamente com a ecolocalização permitiu a grande dispersão geográfica observada dentro de Chiroptera. Juntamente com a variedade de habitats ocupados, as espécies de morcegos desenvolveram diferentes estratégias reprodutivas. *E. furinalis* é uma espécie de morcego vespertilionideo que apesar de sua distribuição neotropical, apresenta dois períodos de regressão testicular total, no qual os testículos voltam a apresentar características pré-púberes. Assim, foi objetivo do trabalho descrever o complexo prostático de *E. furinalis* e avaliar se a glândula é afetada pelo processo de regressão testicular. Foram utilizados 11 espécimes machos adultos, representantes dos quatro períodos reprodutivos do testículo: ativo, regredindo, regredido e recrudescendo. As próstatas foram retiradas e processadas para análises morfológicas e imuno-histoquímicas. O complexo prostático de *E. furinalis* apresenta duas regiões: dorsal bilobulada e uma ventral única, cada uma circundada por sua respectiva cápsula. A região dorsal apresenta epitélio cuboide, com esterocílios e secreção PAS-negativa; já a

região ventral possui epitélio atípico e secreção PAS-positiva. Em ambas as regiões algumas poucas células basais são observadas. As análises morfométricas, estereológicas, de proliferação celular e de receptores de andrógenos mostraram que a próstata apresenta maior atividade no período ativo e esta decai até o período regredido, começando a se recuperar no período recrudescente. Os dados também demonstraram a sincronia entre a atividade dos testículos e da próstata, de modo que o processo de regressão testicular tem influência na atividade prostática.

Introdução

Morcegos estão entre as maiores e mais diversas ordens de mamíferos. Sua reconhecida capacidade de voo juntamente com a habilidade de ecolocalizar permitiram que o grupo ocupasse uma enorme variedade de habitats (Nowak 1999; Speakman 2001; Fenton e Simmons 2014; Voight e Kingston 2016). Sua ampla distribuição geográfica possibilitou o desenvolvimento de diferentes estratégias reprodutivas, de modo a melhor se adaptar ao ambiente no qual o animal se encontra.

O gênero *Eptesicus* Rafinesque, 1820 pertence à maior família de Chiroptera, a Vespertilionidae, e está representado por 23 espécies, das quais seis são registradas para o Brasil (Simmons 2005; Nogueira *et al.* 2014). *Eptesicus furinalis* (d'Orbigny e Gervais 1847) tem ampla distribuição na região neotropical, sendo encontrados espécimes desde o México ao norte da Argentina, Paraguai, Bolívia, Guianas, leste do Peru e Brasil, onde é o maior em distribuição (Mies *et al.* 1996; Simmons 2005; Bianconi e Pedro 2007). Assim como todos os Vespertilionidae, *E. furinalis* apresenta dieta insetívora, capturando o alimento em voo (Barclay e Brigham 1991).

Apesar de sua distribuição exclusivamente neotropical, *E. furinalis* apresenta características reprodutivas similares às encontradas em espécies das regiões temperadas, sendo verificado para espécimes brasileiros ao menos

um período de regressão testicular em seu ciclo reprodutivo anual (Bueno *et al.* 2014). Em espécies temperadas a regressão ocorre em razão do período de hibernação, em que as temperaturas são desfavoráveis e há baixa quantidade de alimentos (Kruttsch 1979; Grindal *et al.* 1992; Lewis 1993; Racey e Entwistle 2000).

As razões da regressão testicular também ocorrer em espécies tropicais ainda são desconhecidas, visto que as mudanças climáticas não são tão drásticas como as que ocorrem nas regiões temperadas, e há alimento disponível durante o ano todo. Entretanto, apesar de ainda se desconhecerem os motivos da regressão, o fato é que ela interfere na reprodução da espécie, indicando que ao menos os machos de *E. furinalis* não estarão aptos reprodutivamente o ano todo.

Bueno *et al.* (2014) com base em análises dos testículos descreveram o padrão de regressão testicular em *E. furinalis*, reconhecendo quatro estados para o testículo: ativo, regredindo, regredido e recrudescente. No período ativo a espermatogênese está normal, com todos os tipos de células germinativas presentes. No período regredindo ocorre o início do processo de regressão testicular, com ausência de alguns tipos celulares. No período regredido há apenas células de Sertoli e espermatogônias, sem ocorrência de espermatogênese. Por fim, no período recrudescente ocorre a reativação da espermatogênese. Embora os autores não pudessem estabelecer o período exato no qual o processo de regressão testicular ocorre, ou se há mais de um processo de regressão no ciclo reprodutivo anual da espécie, os resultados apontaram que esse evento ocorre entre os meses de novembro e janeiro, período no qual foi coletado um número maior de exemplares com os testículos regredidos.

Juntamente com os testículos, as glândulas reprodutivas acessórias (GRAs) também são de extrema importância para o sucesso da reprodução de mamíferos, garantindo a viabilidade, sobrevivência e a motilidade dos

espermatozoides (Rochel *et al.* 2007). Em mamíferos eutérios as GRAs compreendem as glândulas bulbouretrais, ampulares, coagulantes, a próstata e as vesículas seminais.

Em morcegos há uma grande variação na composição das GRAs, sendo que a próstata está presente em todas as espécies já analisadas (Negrin *et al.* 2014; Puga *et al.* 2013, 2014; Martins *et al.* 2015, 2016). Ainda há poucas informações quanto às variações morfo-fisiológicas apresentadas pelo complexo prostático durante o ciclo reprodutivo das espécies, como por exemplo, variação da altura do epitélio secretor, e dos componentes prostáticos (epitélio, lúmen e estroma), no peso do complexo prostático e no padrão de expressão dos receptores de andrógenos (Cristante *et al.* 2013; Puga *et al.* 2013; Negrin *et al.* 2014; Beguelini *et al.* 2015).

Apesar da conhecida variação nos padrões reprodutivos em morcegos, o impacto dos diferentes ciclos reprodutivos sobre o complexo prostático continua pouco explorado (Beguelini *et al.* 2015). Assim como as demais espécies de morcegos analisadas, *E. furinalis*, por ocupar diferentes habitats está diretamente sujeito a interferências do ambiente na sua reprodução, e em especial nos órgão reprodutores e suas GRAs. Assim, os objetivos do presente estudo foram descrever a glândula prostática da espécie *E. furinalis*, analisando-a histológica e morfológicamente e descrever o comportamento dos receptores de andrógenos assim como a taxa de proliferação celular nos quatro períodos do ciclo reprodutivo anual (ativo, regredindo, regredido e recrudescente), de modo a caracterizar as variações sazonais e avaliar se a próstata é afetada pelo processo de regressão testicular.

Material e Métodos

Espécimes e licenças

Eptesicus furinalis não está listada como ameaçada de extinção na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da International Union for Conservation of Nature (IUCN). As capturas dos animais foram autorizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente – IBAMA (Licença número: 21707-1; Sisbio: 59765825-13/04/2010), e os procedimentos com os animais foram autorizados pelo Comitê Institucional de Ética para Experimentação Animal (Protocolo do Documento: 013/2009 CEEA/IBILCE-UNESP).

As coletas para a captura dos espécimes foram realizadas em área urbana e rural do noroeste do Estado de São Paulo - Brasil (49W22'45" 20S49'11"), utilizando os métodos convencionais para a captura de morcegos (redes de neblina, puçás e luvas de couro). Os animais capturados foram transportados para o laboratório, onde foram processados e fixados. Todos os exemplares foram catalogados e estão depositados na Coleção Científica do Laboratório de Chiroptera – IBILCE/UNESP.

Foram coletados 11 machos adultos representados por três espécimes para cada uma das fases do ciclo testicular descrito para a espécie, ou seja, período ativo (n=3), período regredindo (n=3), período regredido (n=2) e período de recrudescência (n=3). Os períodos foram reconhecidos baseando-se na morfologia e nas células espermatogênicas presentes nos túbulos seminíferos, como descrito por Beguelini *et al.* (2013a, 2013b) e Bueno *et al.* (2014).

Os animais foram classificados como adultos de acordo com o peso corporal, a completa ossificação das articulações metacarpo-falangeanas, o grau de desgaste dentário e presença de espermatozoides no interior dos testículos e/ou cauda do epidídimo (Kunz e Anthony 1982; de Knecht *et al.* 2005, Beguelini *et al.*, 2013b).

Processamento dos animais

Após os registros dos dados, os espécimes de *E. furinalis* foram eutanasiados por anestesia profunda com Cloridrato de ketamina 11,6% (Dopalen-Vertebrands, Paulínia, SP, Brazil) aplicada subcutaneamente na quantidade de 0,1 ml para cada 50 g de peso corporal.

Os animais foram pesados e os testículos e a próstata de cada animal foram retirados cuidadosamente, pesados e fixados em solução fixadora de metanol: clorofórmio: ácido acético (6:3:1) por 3 horas a 4°C, desidratados em álcool, clarificados em xilol e incluídos em parafina (Histosec–Merck, Darmstadt, Germany). Cortes de 5µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo e submetidos às colorações e imunohistoquímicas.

Morfologia geral

A morfologia geral externa de um complexo prostático foi analisada por microscópio estereoscópio (Zeiss Discovery.V20) equipado com sistema de captura de imagem.

Análises histológicas e reconstrução 3D

Os cortes obtidos pelas secções seriais foram corados com Hematoxilina–Eosina (Ribeiro e Lima 2000) e Acido periódico e Schiff (PAS; Behmer *et al.* 1976). Posteriormente as análises foram feitas pelo microscópio Olympus BX60 (Olympus Optical, Tokyo, Japan) com o programa Image-Pro-Plus para o software Windows (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

Um complexo prostático serialmente seccionado e corado com HE foi analisado no *scanner* de imagens (Olympus BXVCB, software VS-ASW). As imagens obtidas foram processadas utilizando-se o software de Reconstrução Reconstruct (Fiala 2005). Após alinhamento das imagens, as regiões prostáticas, a uretra e os ductos foram isolados para se obter um modelo em 3D da estrutura.

Imuno-histoquímica

Os cortes histológicos foram desparafinizados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6,0 – 6,5) à 100°C, seguida pelo bloqueio de peroxidases endógenas, em solução de Peróxido de Hidrogênio a 10% em metanol. Para as reações com o receptor de andrógeno (AR) os cortes foram permeabilizados com tampão (TBS_{NP40}) e triton (50 µl em 100 ml de tampão). O bloqueio de proteínas inespecíficas foi feito com leite em pó e tampão (TBS_{NP40} para o AR e PBS para o PCNA) em 5% de concentração. Após os bloqueios, os cortes foram incubados com os anticorpos primários contra receptores de andrógenos (AR- rabbit policlonal IgG, sc-816/Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) na diluição 1:50 *overnight* a 4°C, e contra antígeno nuclear para proliferação celular (PCNA—mouse monoclonal IgG, sc-56, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) na diluição 1:200 por 90min. Após serem lavados em tampão e incubados com pós-polímero e polímero os cortes passaram pela revelação com a diaminobenzidina (DAB). A contracoloração dos cortes foi realizada com hematoxilina de Harris por 20-40 segundos. As lâminas foram desidratadas e montadas em bálsamo do Canadá e avaliadas em microscopia de luz. Os controles negativos foram gerados omitindo-se a etapa de incubação com o anticorpo primário.

A incidência de células positivas foi calculada escolhendo-se aleatoriamente cinco campos nas lâminas de cada região prostática (aumento de 400x) de cada grupo experimental. O número resultante foi então multiplicado pela área total da região prostática correspondente (ventral ou dorsal).

Avaliações Morfométricas e Estereológicas

A coleta dos dados para as avaliações estereológicas foi realizada no Sistema-Teste de arranjo triangular M42, segundo Weibel *et al.* (1978), com 130 pontos no sistema, no software Image Pro-Plus (Media Cybernetics versão 4.5, MD, USA). Para esta análise, 48 campos de lâminas coradas pela técnica da HE (aumento de 200x) foram aleatoriamente selecionados de cada grupo

experimental (n=3 animais/grupo, 16 campos/animal). A frequência relativa foi calculada de acordo com os pontos do Sistema-Teste que tocam os componentes analisados, ou seja, epitélio, lúmen e estroma. A partir dos dados obtidos para cada campo analisado, foi feito o cálculo da frequência relativa dos três componentes da glândula.

A altura do epitélio (morfometria) foi quantificada por 34 medidas aleatórias para cada animal, totalizando 102 medidas por grupo experimental, no software Image Pro-Plus (Media Cybernetics versão 4.5, MD, USA). Como o epitélio do lobo ventral é atípico a análise morfométrica foi realizada apenas no lobo dorsal, onde a análise é possível. O epitélio foi medido apenas em cortes com os ácinos cortados de modo transversal e sem sobreposição de células. A altura do epitélio foi medida da base do epitélio, lâmina basal, até o ponto mais apical da célula.

Análise Estatística

Médias e erro padrão foram calculados para todos os dados. A normalidade foi verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov e as diferenças entre os grupos foram calculadas através do teste Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn para múltiplas comparações, utilizando o valor de $p \leq 0,05$ para a diferença significativa entre os grupos. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA, www.graphpad.com).

Resultados

Morfologia Geral do Complexo Prostático

O complexo prostático é constituído por duas regiões facilmente distinguíveis, uma dorsal e uma ventral. A região dorsal é a maior, é bilobulada

e recebe os ductos deferentes, que entram dorsalmente e convergem para o centro do complexo, para a uretra, enquanto a região ventral é menor e única. Intimamente associada ao lobo ventral está a uretra (Figura 1).

Ambas as regiões possuem características morfológicas próprias e secreções diferentes. Os dois lobos que constituem a região dorsal apresentam células secretoras colunares, com núcleo arredondado basal e estereocílios no ápice. Algumas poucas células basais com núcleos achatados também estão presentes próximas à lâmina basal (Figura 2 A, C-D). Nestes lobos estão presentes os ductos deferentes, que podem ser observados ao redor da região dorsal e no seu interior. Cada região prostática é envolta por sua respectiva cápsula, composta por colágeno, fibras reticulares e musculatura lisa (Figura 2A-C).

O lobo ventral é dividido apenas na porção mais caudal e contém a uretra em seu interior. O epitélio dessa região é atípico e variável, e em alguns ácinos chega a ser cúbico, contendo células secretoras com citoplasma irregular e núcleos arredondados e achatados normalmente localizados em posição mais basal. Algumas poucas células basais estão localizadas aderidas à lâmina basal, estas apresentam núcleo alongado e não alcançam o lúmen (Figura 2A-B).

As análises das secreções prostáticas (método do PAS) mostraram que as células epiteliais dos lobos ventrais exibem alta atividade secretora, com secreções PAS-positivas (glicoproteínas) e granulares ocupando todo o lúmen. Já a região dorsal apresenta secreção hialina, PAS-negativa (Figura 2E-F). O estroma em ambas as regiões é composto por grandes quantidades de fibroblastos e vasos sanguíneos e linfáticos.

Análises Estereológicas e Morfométricas

A análise dos pesos corporais e do complexo prostático nas quatro condições reprodutivas avaliadas mostrou pouca variação nos pesos dos

animais durante os períodos, que apresentaram médias de 6,32g para o período ativo, 6,79g para o período regredindo, 6,34g para o período regredido e 5,8g para o período recrudescente (Figura 3). As médias dos pesos do complexo prostático nos períodos ativo (0,0388g), regredindo (0,0386g) e recrudescente (0,033g) também foram muito semelhantes, ficando para o período regredido (0,006g) a maior variação no peso do complexo que apresentou a menor média (Figura 3).

Quando analisados os componentes das diferentes regiões em cada estado, notou-se que elas têm organização diferente. Os componentes na região dorsal da próstata variaram pouco em geral. O epitélio dorsal representou cerca de 40% a 45,5%, alterando-se muito pouco com a mudança do estado reprodutivo. O lúmen, com uma representação média variando entre 45,5% a 52% nos estados ativo, regredindo e recrudescente caiu drasticamente no período regredido, atingindo apenas 7,21%. O estroma foi o componente com menor representação na maioria dos estados (7,69% a 49,5%), alcançando maior representação apenas no período regredido, onde ocupou quase metade de toda próstata dorsal (49,5%) (Figura 4). Como o epitélio se manteve constante, a variação observada nos componentes é devida às mudanças nos percentuais de lúmen e estroma.

Na próstata ventral houve maior variação nos componentes. O epitélio, assim como na região dorsal não apresentou grandes variações, entretanto, ele tem menor representatividade do que na região dorsal. À exceção do período regredido, ele manteve-se mais ou menos constante em todos os estados (Figura 4). O maior percentual de epitélio no período regredido, entretanto, não foi estatisticamente significativo. A quantidade de lúmen que apresentou elevada representação nos estados ativo e regredindo (77,24% e 79,68%), caiu significativamente nos períodos regredido e recrudescente, com destaque para o período regredido onde ficou com apenas 4,9%.

O estroma, por sua vez, alcançou maior quantidade no período regredido, semelhante ao observado para a próstata dorsal, e as menores quantidades nos períodos ativo e regredindo (8,62% e 5,93 %). Assim como observado para a próstata dorsal, a variação geral nos componentes da próstata ventral se deve às variações no percentual de lúmen e estroma muito mais que do epitélio, visto que este último se manteve relativamente constante nas duas regiões.

Na análise morfométrica pudemos averiguar uma variação significativa na altura do epitélio durante os quatro períodos reprodutivos, sendo todos estatisticamente diferentes entre si (Figura 5). A maior média de altura foi encontrada no período recrudescente (média 150,6 μm) e a menor média foi no período regredido (média 89,23 μm). A Figura 5 A-E mostra o padrão geral dessa variação.

Imuno-histoquímica

Receptor de andrógeno (AR)

A expressão de AR nas células variou entre os períodos analisados e entre as regiões prostáticas, sendo relativamente maior na região dorsal em todos os períodos (Figura 6).

A maior expressão de AR nas células da região dorsal foi observada no período ativo (5404^{10^6} células positivas/área). Esse número decaiu nos períodos regredindo (4503^{10^6} células positivas/área) e regredido ($382,7^{10^6}$ células positivas/área), voltando a subir no período recrudescente (1800^{10^6} células positivas/área). Na região ventral a maior concentração de receptores de andrógenos deu-se no período recrudescente (3727^{10^6} células positivas/área). Os demais períodos apresentaram concentrações similares de AR (ativo: $832,4^{10^6}$; regredindo: $561,5^{10^6}$ e regredido: $207,1^{10^6}$ células positivas/área).

Proliferação celular (PCNA)

A proliferação celular foi maior na região dorsal que na ventral (Figura 7). Na região dorsal a proliferação manteve-se em níveis similares durante os períodos ativo (1731^{10^6} células positivas/área), regredindo (1342^{10^6} células positivas/área) e recrudescente (1442^{10^6} células positivas/área), com um índice levemente maior no período ativo. Durante o período regredido, no entanto, ocorreu grande diminuição na taxa de proliferação celular ($89,87^{10^6}$ células positivas/área). Para a região ventral observou-se o inverso, a maior taxa de proliferação ocorreu no período regredido ($198,5^{10^6}$ células positivas/área) e a menor taxa no período ativo ($38,87^{10^6}$ células positivas/área). Já os períodos regredindo e recrudescente apresentaram taxas similares de proliferação celular (113^{10^6} e $112,4^{10^6}$ células positivas/área respectivamente) (Figura 7).

Discussão

As mudanças sazonais de temperatura, latitude, chuvas e disponibilidade de alimento são fatores de grande influência na reprodução de morcegos tropicais (Fleming *et al.* 1972; Taddei 1976; Bueno *et al.* 2014). Visto que esses não hibernam, podem apresentar padrões reprodutivos monoestros, poliestros ou se reproduzir ao longo de todo o ano (Taddei 1980; Zortéa 2003, Bueno *et al.* 2014). A literatura aponta que diversas espécies de morcegos tropicais apresentam espermatogênese contínua durante o ano, com alguns picos relacionados à época de reprodução (Beguelini *et al.* 2013a; Crichton e Kruttsch 2000; Morais *et al.* 2012,2013) .

Apesar da maioria das espécies tropicais seguir esses padrões reprodutivos, alguns membros pertencentes à família Vespertilionidae apresentam padrões similares aos descritos para morcegos de clima temperado. Assim, apesar de não hibernarem essas espécies apresentam

períodos de regressão testicular total (Araújo *et al.* 2013; Beguelini *et al.* 2013a, Bueno *et al.* 2014).

Os dados sobre a reprodução de *E. furinalis* ainda são escassos, porém indicam que a espécie apresenta variação de acordo com a localização da colônia. Alguns autores sugerem que a espécie reproduz o ano todo, enquanto outros indicam um padrão bimodal de reprodução (Davis 1966; Myers 1977). Myers (1977) relatou uma variação bimodal dos parâmetros testiculares, porém Bueno *et al.* (2014) identificaram a ocorrência de regressão testicular total em espécimes capturados no estado de São Paulo.

Em estudo posterior, Bueno *et al.* (2018), apontaram que os espécimes de *E. furinalis* analisados por eles foram categorizados de acordo com a fisiologia testicular, como estando na fase ativa no mês de Setembro, fase em regressão em Outubro, fase regredida em Janeiro, e em recrudescência, em Agosto. O intervalo de sete meses entre a regressão e a recrudescência testicular (Janeiro a Setembro) permitiu aos autores inferir que a espécie deve apresentar dois períodos de regressão testicular ao ano, exibindo, portanto, um padrão bimodal no ciclo reprodutivo, reforçando dados da literatura para esta mesma espécie (Myers 1977; Barquez *et al.* 1999; Gonzalez 2001). A ocorrência de regressão testicular duas vezes ao ano já foi descrita em outra espécie de vespertilionídeo neotropical, *Myotis nigricans*, a qual é simpátrica com *E. furinalis* (Beguelini *et al.* 2013a). Essa condição de atividade testicular que caracteriza o ciclo reprodutivo anual de *E. furinalis*, possibilitou a análise das variações sazonais no complexo prostático dessa espécie, para o qual não havia ainda qualquer informação.

O complexo prostático de *E. furinalis* apresentou um padrão semi-lobado, com apenas duas regiões: uma ventral e uma dorsal, confirmadas aqui por meio da histologia e da reconstrução tridimensional. Ambas apresentaram características histológicas e secreções diferentes. De acordo com o observado para a espécie simpátrica *M. nigricans* (Negrin *et al.* 2014; Beguelini *et al.*

2015), a região dorsal é bilobulada e mais proeminente que a ventral. Porém, ao contrário do observado para *M. nigricans*, *E. furinalis* não apresenta a região dorsolateral.

A região dorsal apresentou características semelhantes às observadas por Negrin *et al.* (2014) para o lobo dorsolateral da próstata de *M. nigricans*, que também apresenta células secretoras colunares com núcleo basal e estereocílios no ápice. Pode-se afirmar que se tratam de estereocílios, visto que estes são recorrentes em outras espécies de morcegos (Negrin *et al.* 2014; Martins *et al.* 2015, 2016). A região dorsal da próstata de *E. furinalis* apresentou secreção exclusivamente hialina. Em *M. nigricans* a região dorsolateral apresentou secreção mista enquanto a região dorsal apresentou apenas secreção hialina (Negrin *et al.* 2014). Considerando-se as semelhanças apontadas podemos afirmar que a próstata dorsal de *E. furinalis* apresenta características intermediárias entre a próstata dorsolateral e a dorsal de *M. nigricans*, visto que suas características histológicas se assemelharam à próstata dorsolateral, enquanto sua secreção foi semelhante à da próstata dorsal.

A região ventral da próstata de *E. furinalis* apresentou epitélio atípico e variável, com células secretoras com citoplasma irregular e núcleos basais, podendo apresentar morfologia cúbica ou até mesmo apresentando apenas a lâmina basal em alguns ácinos, características comuns à sua natureza holócrina. Essa condição apresentada pela próstata ventral é recorrente em táxons de diferentes famílias de morcegos analisadas, indicando que este padrão foi estabelecido precocemente durante a evolução do complexo prostático em Chiroptera, e que suas secreções possuem funções e importância fisiológica semelhantes (Martins, *et al.* 2016; Santos *et al.* 2018).

Ambas as regiões apresentaram também, poucas células basais junto à lâmina basal, com núcleos alongados e pouco citoplasma. Essa característica também foi previamente observada em outras espécies de morcegos

vespertilionídeos (Negrin *et al.* 2014), molossídeos (Cristante *et al.*, 2015) e filostomídeos (Puga *et al.* 2012; Martins *et al.* 2015, 2016), aparentando ser uma característica comum ao grupo.

De maneira similar à observada para outras espécies de Chiroptera a secreção da região ventral é PAS-positiva, o que indica uma maior concentração de glicoproteínas, enquanto a secreção da região dorsal é PAS-negativa, indicando uma constituição mais proteica (Cristante *et al.* 2013; Puga *et al.* 2013; Martins *et al.* 2015, 2016).

A presença de uma cápsula envolvendo cada um dos lobos do complexo prostático de *E. furinalis* também é uma condição compartilhada por *M. nigricans* e *M. molossus*. Outras espécies de morcegos analisadas, principalmente da família Phyllostomidae, apresentam uma cápsula única envolvendo as regiões prostáticas (Puga *et al.* 2013; Martins *et al.* 2015, 2016; Beguelini *et al.* 2016), o que sugere uma evolução independente da próstata nas diferentes famílias, onde esta varia de um complexo multilobulado, similar ao de roedores, até uma estrutura única, compacta, semelhante a de humanos (Jesik *et al.* 1982; Laczkó *et al.* 2005; Rochel *et al.* 2007; Santos *et al.* 2018).

A análise sazonal por estereologia mostrou que para a região dorsal há pouca variação nos componentes. O epitélio manteve-se constante durante todos os períodos reprodutivos, não apresentando diferenças significativas entre estes. Apenas no período regredido é que se observou maiores alterações nas proporções de lúmen e estroma, sendo que o lúmen está presente em menor quantidade e o estoma em maior quantidade. Nos demais períodos não houve variações significativas, permanecendo sempre o lúmen em maior concentração que o estroma.

A condição para o epitélio da região ventral foi semelhante. Apesar de ter havido alguma variação, a análise estatística não apontou diferenças significativas entre os estados reprodutivos. Este fato deveu-se ao *n* utilizado

para as análises (n=3 e n=2 no estado regredido) que foi baixo, aumentado, assim, os desvios e igualando as médias.

O lúmen da região ventral esteve constante nos períodos ativo e regredindo, o que pode ser interpretado como decorrente, muito possivelmente, ao estado inicial de regressão testicular em que os animais analisados neste estado se encontravam. O percentual de lúmen no período regredido foi o menor observado e, no período recrudescente, esse percentual voltou a subir, sendo ainda diferente dos demais períodos analisados. O inverso ocorreu para o estroma, que apresentou médias semelhantes nos períodos regredido e recrudescente, e seu menor percentual foi encontrado no período regredindo. Assim, houve uma menor proporção de lúmen no período regredido e uma maior proporção no período ativo, em concordância com a atividade secretora da glândula nesses períodos.

Os dados morfométricos mostraram que houve variação significativa na altura do epitélio na região dorsal da próstata nos diferentes estados reprodutivos, embora não tenha ocorrido variação no percentual na glândula. Esta variação está relacionada diretamente à atividade secretora da próstata.

A análise imuno-histoquímica para AR mostrou variações entre os períodos nas duas regiões, porém, estas não foram estatisticamente significativas, fato também atribuído ao n amostral. A região dorsal da próstata mostrou um comportamento atípico se comparado ao observado para outra espécie com regressão testicular (Beguelini *et al.* 2015). Em *E. furinalis* uma maior presença de receptores de andrógenos foi observada no período ativo seguida por um decréscimo nos períodos regredindo e regredido e, finalmente, por um aumento no período recrudescente. Já na próstata ventral a quantidade de receptores foi baixa e praticamente constante em três dos quatro períodos, ativo, regredindo e regredido, enquanto no período recrudescente, foi observada a maior quantidade de receptores.

O padrão de proliferação celular foi diferente e oposto nas regiões prostáticas. Enquanto na região dorsal observou-se a menor taxa de proliferação no período regredido e a maior taxa no período ativo, na região ventral a menor taxa foi observada no período ativo e a maior no período regredido.

Os resultados das análises imuno-histoquímicas para *E. furinalis* foram comparativamente inversos ao observado por Beguelini *et al.* (2015) para a espécie simpátrica *M. nigricans*, que também apresenta regressão testicular. Apenas a taxa de proliferação celular na região ventral mostrou-se de acordo com o observado pelos autores. Apesar de possuir um ciclo reprodutivo muito semelhante ao de *M. nigricans*, com dois períodos de regressão testicular, *E. furinalis* apresentou um padrão diferenciado de ativação da próstata, possivelmente mais rápido, ocorrendo apenas no período recrudescente, e não desde o período regredido como o observado para *M. nigricans*.

Mesmo com as diferenças no padrão de ativação da próstata pudemos confirmar, por meio dos resultados da redução do peso da próstata, bem como das variações nos parâmetros dos componentes prostáticos e da altura do epitélio entre os diferentes períodos, que o processo de regressão testicular influencia o processo de regressão prostática em *E. furinalis*.

Conclusão

Nossos dados demonstraram que o complexo prostático de *E. furinalis* apresenta duas regiões: dorsal bilobulada e uma ventral única, cada uma circundada por sua respectiva cápsula. Cada região apresenta características únicas que variam de acordo com o período reprodutivo no qual o animal se encontra. Os dados também demonstraram uma sincronia entre a atividade dos testículos e da próstata, de modo que o processo de regressão testicular influencia o processo de regressão prostática.

Agradecimentos

Agradecemos Luiz Roberto Falleiros Junior pelo suporte técnico. Agradecemos também o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processos: 2009 / 16181-9 e 2013 / 11859-2) e a bolsa concedida à Manuela Tosi Comelis Martins (Processo: 2015/06923-9).

Referências

Araújo, R. A., Amaro, B. D., Talamoni, S. A., and Godinho, H. P. (2013). Seasonal reproduction of Yellowish *Myotis*, *Myotis levis* (Chiroptera: Vespertilionidae), from a Neotropical Highland. *J. Morphol.* **274**, 1230–1238.

Barclay, M.R.M., and Brighan, R.M. (1991) Prey detection, dietary niche breadth, and body size in bats: why are aerial insectivorous bats so small? *Am. Natur.* **137**, 693-703.

Barquez, R.M., Mares, M.A., Braun, J.K. (1999). The Bats of Argentina. Lubbock: Special Publications of the Museum of Texas Tech University.

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

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

Beguelini, M.R., Puga, C. C. I., Martins, F. F., Betoli, A. H., Taboga, S.R., and Morielle-Versute, E. (2013b). Morphological variation of primary reproductive structures in males of five families of Neotropical bats. *Anat. Rec.* **296**, 156-167.

Beguelini, M. R., Góes, R. M., Rahal, P., Morielle-Versute, E., and Taboga, S.R. (2015). Impact of the processes of testicular regression and recrudescence in the prostatic complex of the bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *J.Morphol.* **276**, 721–732.

Beguelini, M. R., Puga, C. C. I., Morielle-Versute, E., and Taboga, S. R. (2016). Comparative analysis of the male reproductive accessory glands of bats *Noctilio*

albiventris (Noctilionidae) and *Rhynchonycteris naso* (Emballonuridae). *J. Morphol.* **277**, 1459-1468.

Bianconi, G. V., Pedro, W. A. (2007). Família Vespertilionidae. In: 'Morcegos do Brasil.' (Eds N.L. Reis, A.I. Peracchi, W.A Pedro, and I.P. Lima). (Universidade Estadual de Londrina: Londrina.)

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

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

Christante, C. M., Beguelini, M.R., Puga, C. C., Negrin, A. C., Morielle-Versute, E., Vilamaior, P. S., and Taboga, S. R. (2013). Structure, histochemistry and seasonal variations of the male reproductive accessory glands in the Pallas's mastiff bat, *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Reprod. Fertil. Dev.* **27**, 313-22.

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

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

Fiala, J. C. (2005). Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J. Microsc.* **218**, 52–61.

Fleming, T. H., Hooper, E. T., and Wilson, D. E. (1972). Three central american bat communities: structure, reproductive cycles and movement patterns. *Ecology.* **53**, 555-569.

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

Grindal, S. D., Collard, T. S., Brigham, R. M., and Barclay, R. M. R. (1992). The influence of precipitation on reproduction by *Myotis* bats in British Columbia. *Am. Midl. Nat.* **128**, 339–344.

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

Jesik, C. J., Holland, J. M., and Lee, C. (1982). An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate.* **3**, 81–97.

Laczko, I., Hudson, D. L., Freeman, A., Feneley, M. R., and Masters, J. R. (2005). Comparison of the zones of the human prostate with the seminal vesicle: morphology, immunohistochemistry, and cell kinetics. *The Prostate*. **62**, 260–266.

Lewis, S. E. (1993). Effect of climatic variation on reproduction by pallid bats (*Antrozous pallidus*). *Can. J. Zool.* **71**, 1429–1433.

Martins, F. F., Puga, C. C. I., Beguelini, M. R., Morielle-Versute, E., Vilamaior, P. S. L. And Taboga, S. R. (2015). Comparative analysis of the male reproductive accessory glands of bat species from the five Brazilian subfamilies of the family Phyllostomidae (Chiroptera). *J. Morphol.* **276**, 470–480.

Martins, F. F., Beguelini, M. R., Puga, C. C. I., Morielle-Versute, E., Vilamaior, P. S. L., and Taboga, S. R. (2016). Morphophysiology and ultrastructure of the male reproductive accessory glands of the bats *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina* and *Phyllostomus discolor* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Acta Histochem.* **118**, 640–651.

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

Myers, P. (1977). Patterns of reproduction of four species of vespertilionid bats in Paraguay. *Univ Calif Publ Zool.* **107**, 1-41.

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

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

Negrin, A. C., Beguelini, M. R., Puga, C. C., Christante, C. M., Bueno, L. M., Morielle-Versute, E., Vilamaior, P. S., and Taboga, S. R. (2014). Structure, histochemistry, ultrastructure and seasonal variations of the male prostatic complex in the black Myotis bat, *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Reprod. Fertil. Dev.* **26**, 1188-97.

Nogueira, M. R., Lima, I., Moratelli, R., Tavares, V. C., Gregorin, R., and Peracchi, A. L. (2014). Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. *Check List*. **10**, 808-821.

Nowak, R. M. (1999). 'Bats of the world.' (Johns Hopkin University Press: Baltimore.)

Puga, C. C. I., Beguelini, M. R., Negrin, A. C., Christante, C. M., Morielle-Versute, E., Vilamaior, P. S. L., and Taboga, S. R. (2013). Structure, histochemistry and

ultrastructure of the male reproductive accessory glands in the neotropical flat-faced fruit-eating bat *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Reprod. Fertil. Dev.* **25**(3), 558–569.

Puga, C. C. I., Beguelini, M. R., Martins, F. F., Falleiros, L. R. Jr., Morielle-Versute, E., Vilamaior, P. S. L., and Taboga, S. R. (2014). Seasonal changes in the prostatic complex of *Artibeus planirostris* (Chiroptera:Phyllostomidae). *Gen. Comp. Endocrinol.* **197**, 33–42.

Racey, P. A., and Entwistle, A. C. (2000). Life-history and reproductive strategies of bats. In: 'Reproductive Biology of Bats'. (Eds E.G. Crichton, and P. H. Krutzsch). pp. 363-414. (Academic Press: London)

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

Rochel, S. S., Bruni-Cardoso, A., Taboga, S. R., Vilamaior, P. S. L., and Góes, R. M. (2007). Lobe identity in the mongolian gerbil prostatic complex: A new rodent model for prostate study. *Anat. Rec.* **290**, 1233-1247.

Santos, R. T. S., Pires, L. R. M., Albernaz, E. S. S., Andrade, C. S., Santiago, C. S., Morielle-Versute, E., Taboga, S. R., and Beguelini, M. R. (2018). Morphological analysis of the male reproductive accessory glands of the bat *Artibeus lituratus* (Phyllostomidae: Chiroptera). *J. Morphol.* **279**, 228–241.

Simmons, N.B. (2005). Order Chiroptera. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), *Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference*, 3rd edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 312–529.

Speakman, J. R. (2001). The evolution off light and echolocation in bats: another leap in the dark. *Mamm Ver.* **31**, 111-130.

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

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

Voight, C. C., and Kingston, T. (2006). 'Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World.' (Springer).

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

Weibel, E. R., Kistler, G. S., and Scherle, W. F. (1966). Practical stereological methods for morphometric cytology. *J. Cell Biol.* **30**, 23–38.

Legendas das figuras:

Figura 1. Vista estereoscópica e cortes histológicos da próstata de *Eptesicus furinalis*. A: vista estereoscópica dorsal; C: vista estereoscópica ventral; B: Corte histológico evidenciando as regiões dorsal e ventral. D: reconstrução tridimensional da próstata. d: lobo dorsal; v: lobo ventral; u/seta: uretra.

Figura 2. Cortes histológicos da próstata de *Eptesicus furinalis*. A-D: coloração HE; E-F Coloração: PAS. A: visão geral da glândula. B e E: detalhe da região ventral. C-D e F: detalhe da região dorsal. d: lobo dorsal; v: lobo ventral; u: uretra; seta: estereocílios na região dorsal.

Figura 3. Médias dos pesos corporais (A) e das próstatas (B) nos quatro períodos do ciclo reprodutivo do testículo.

Figura 4. A e B: Percentual de cada componente (epitélio, lúmen, estroma) por estado reprodutivo nas regiões dorsal e ventral da próstata. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas entre os mesmos componentes (epitélio Vs epitélio, lúmen Vs lúmen e estroma Vs estroma). B-E e G-J: fotomicrografias ilustrando o padrão geral de variação das regiões prostáticas durante os períodos, B e G: ativo; C e H: regredindo; D e I: regredido; E e J: recrudescente. A barra de escala corresponde a 50 µm.

Figura 5. Variação na altura do epitélio na próstata dorsal em *Eptesicus furinalis* durante os quatro períodos do ciclo reprodutivo anual. A: Altura média do epitélio prostático nos quatro períodos do ciclo do testículo. B-C fotomicrografias ilustrando o padrão geral de variação durante os períodos, B: ativo; C: regredindo; D: regredido; E: recrudescente. Letras sobrescritas

diferentes indicam diferenças estatísticas significantes entre os períodos. A barra de escala corresponde a 20 μm .

Figura 6. Índices da expressão de receptores de andrógenos (AR) na próstata nas regiões dorsal (A) e ventral (F), durante os quatro períodos reprodutivos do testículo. B-E e G-J: fotomicrografias evidenciando as marcações (setas) nos quatro períodos: B/G, período ativo; C/H, período regredindo; D/I, período regredido; E/J, período recrudescente.

Figura 7. Índices da taxa de proliferação celular (PCNA) na próstata nas regiões dorsal (A) e ventral (F), durante os quatro períodos reprodutivos do testículo. B-E e G-J: fotomicrografias evidenciando as marcações (setas) nos quatro períodos: B/G, período ativo; C/H, período regredindo; D/I, período regredido; E/J, período recrudescente.

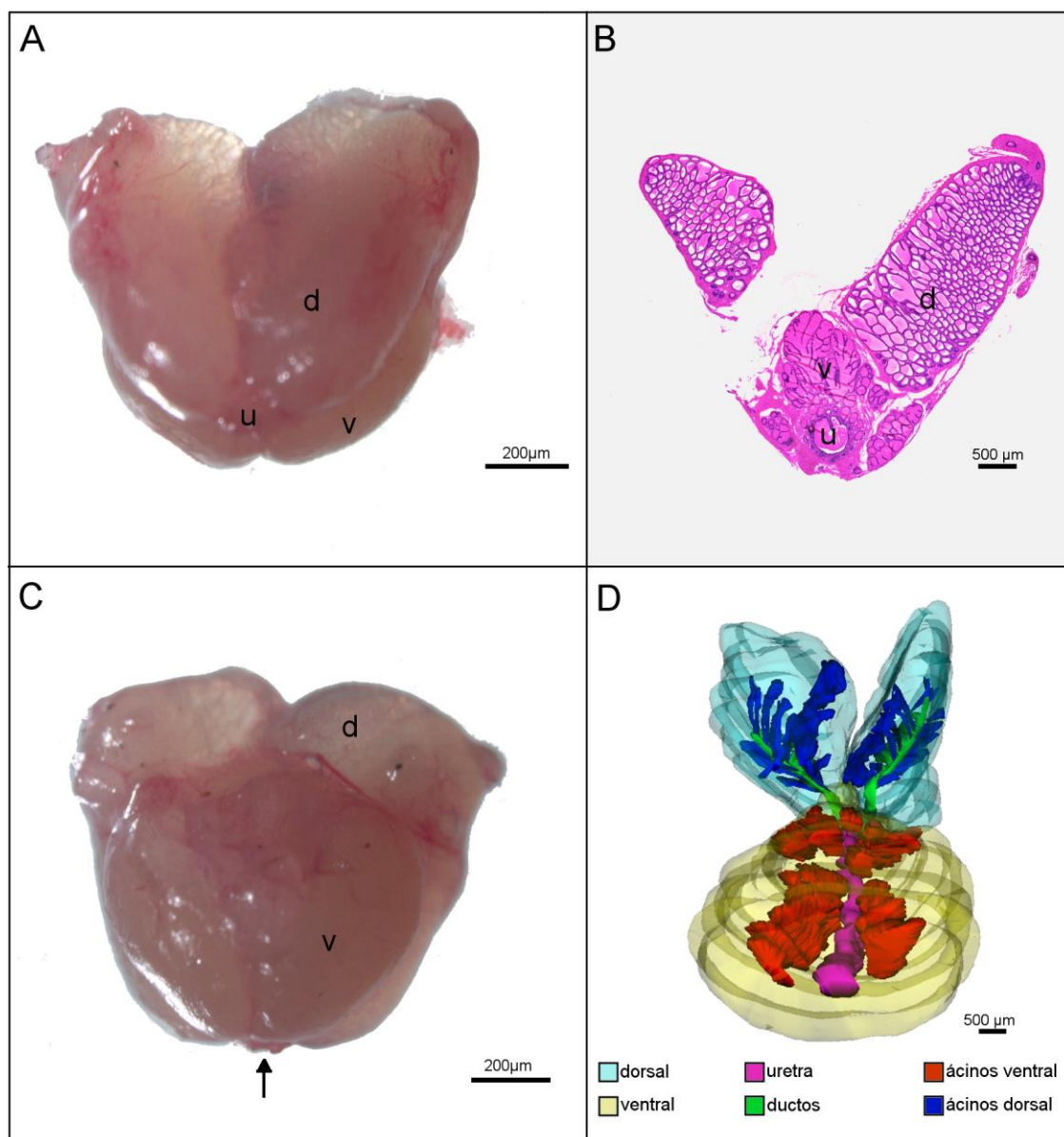


Figura 1. Vista estereoscópica e cortes histológicos da próstata de *Eptesicus furinalis*. A: vista estereoscópica dorsal; C: vista estereoscópica ventral; B: Corte histológico evidenciando as regiões dorsal e ventral. D: reconstrução tridimensional da próstata. d: lobo dorsal; v: lobo ventral; u/seta: uretra.

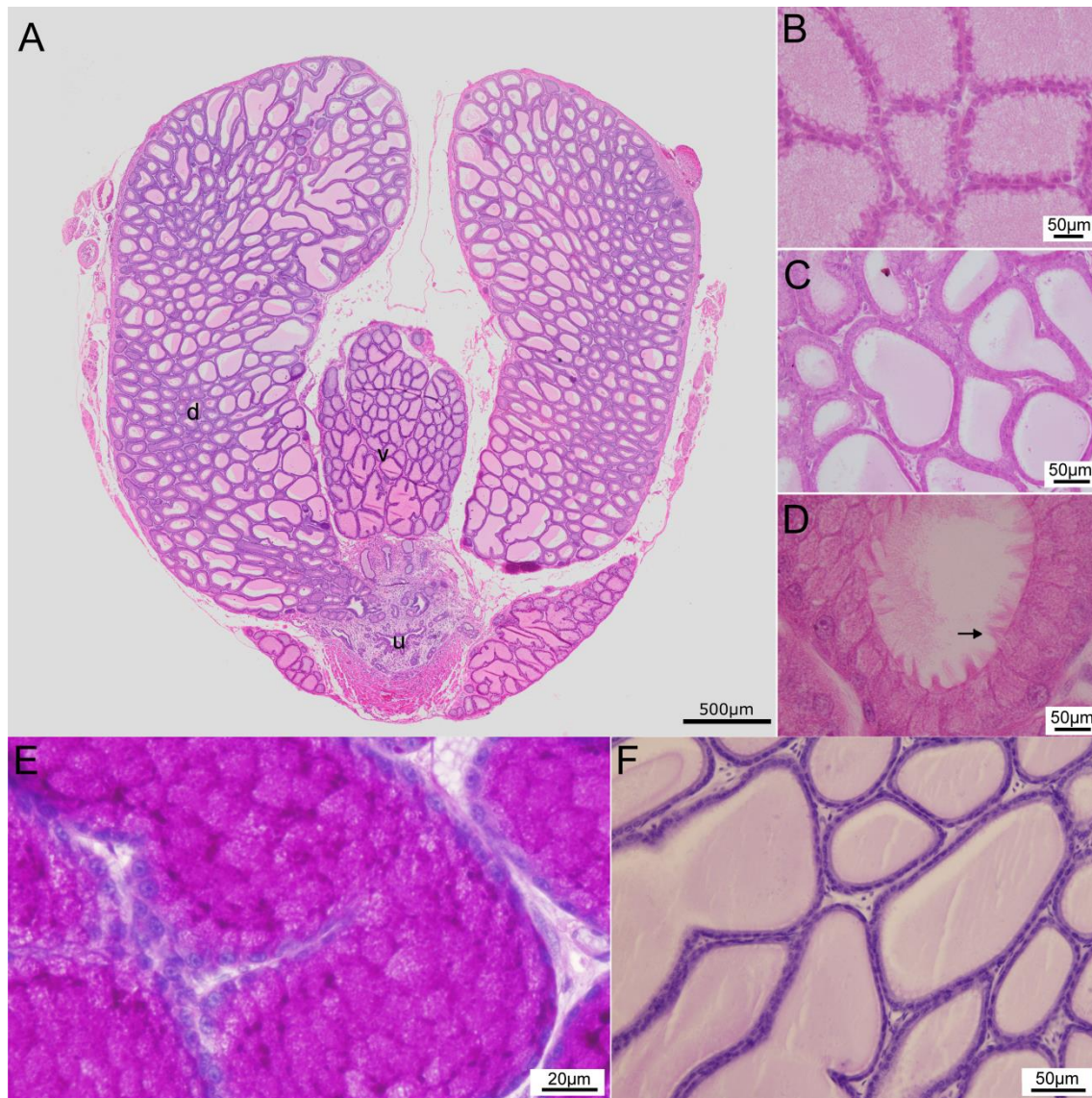


Figura 2. Cortes histológicos da próstata de *Eptesicus furinalis*. A-D: coloração HE; E-F Coloração: PAS. A: visão geral da glândula. B e E: detalhe da região ventral. C-D e F: detalhe da região dorsal. d: lobo dorsal; v: lobo ventral; u: uretra; seta: estereocílios na região dorsal.

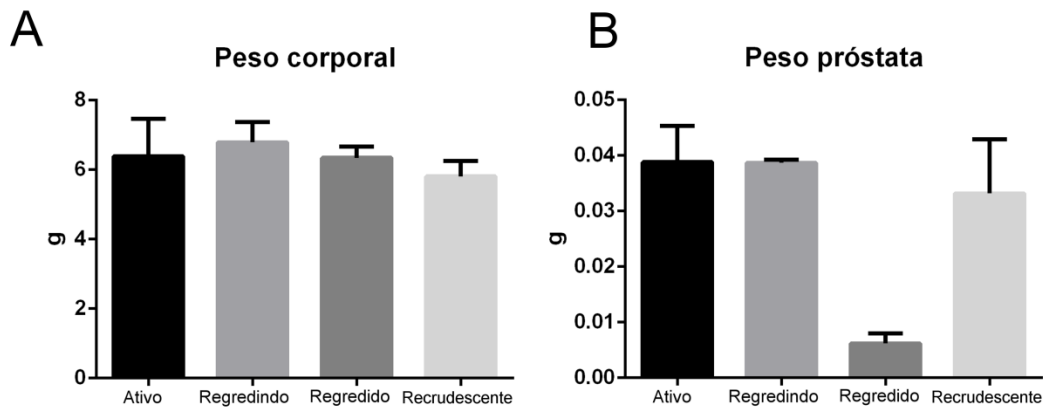


Figura 3. Médias dos pesos corporais (A) e das próstatas (B) nos quatro períodos do ciclo reprodutivo do testículo.

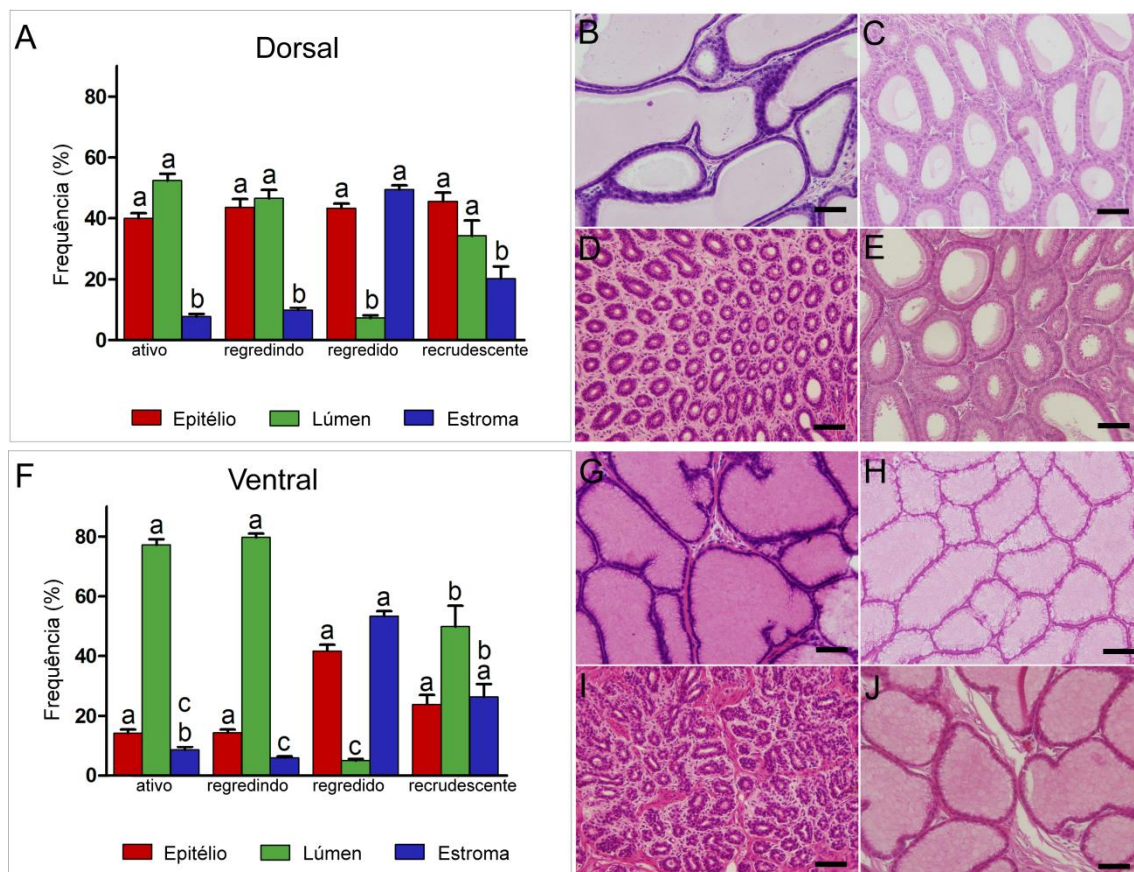


Figura 4. A e B: Percentual de cada componente (epitélio, lúmen, estroma) por estado reprodutivo nas regiões dorsal e ventral da próstata. Letras sobrescritas diferentes

indicam diferenças estatísticas entre os mesmos componentes (epitélio Vs epitélio, lúmen Vs lúmen e estroma Vs estroma). B-E e G-J: fotomicrografias ilustrando o padrão geral de variação das regiões prostáticas durante os períodos, B e G: ativo; C e H: regredindo; D e I: regredido; E e J: recrudescente. A barra de escala corresponde a 50 μm .

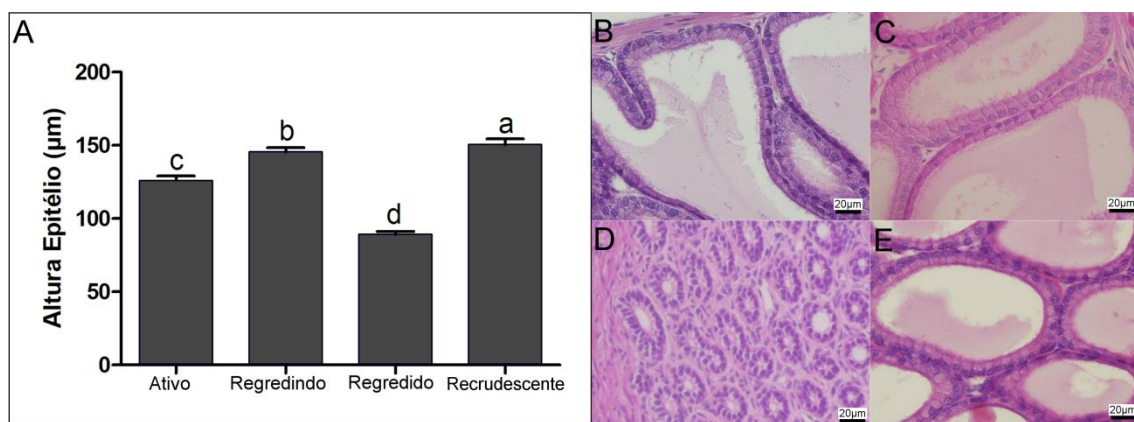


Figura 5. Variação na altura do epitélio na próstata dorsal em *Eptesicus furinalis* durante os quatro períodos do ciclo reprodutivo anual. A: Altura média do epitélio prostático nos quatro períodos do ciclo do testículo. B-C fotomicrografias ilustrando o padrão geral de variação durante os períodos, B: ativo; C: regredindo; D: regredido; E: recrudescente. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes entre os períodos. A barra de escala corresponde a 20 μm .

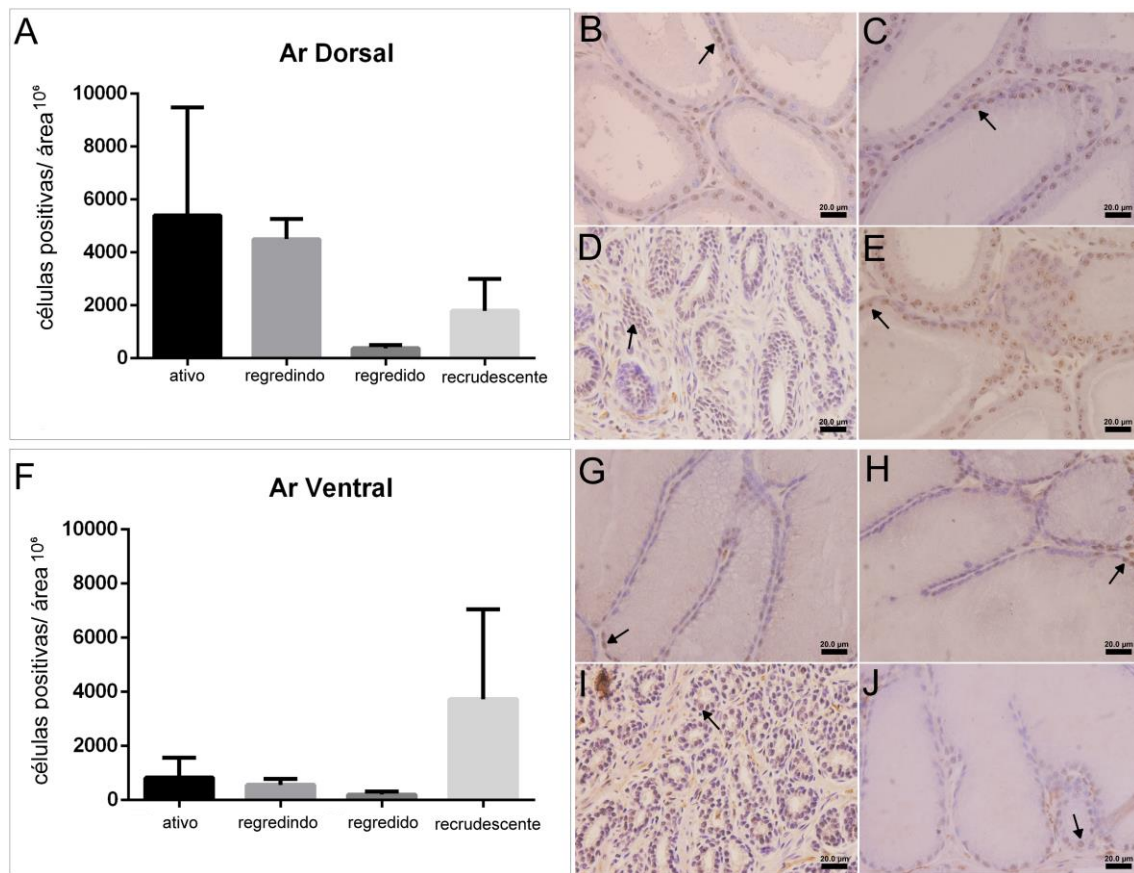


Figura 6. Índices da expressão de receptores de andrógenos (AR) na próstata nas regiões dorsal (A) e ventral (F), durante os quatro períodos reprodutivos do testículo. B-E e G-J: fotomicrografias evidenciando as marcações (setas) nos quatro períodos: B/G, período ativo; C/H, período regredindo; D/I, período regredido; E/J, período recrudescente.

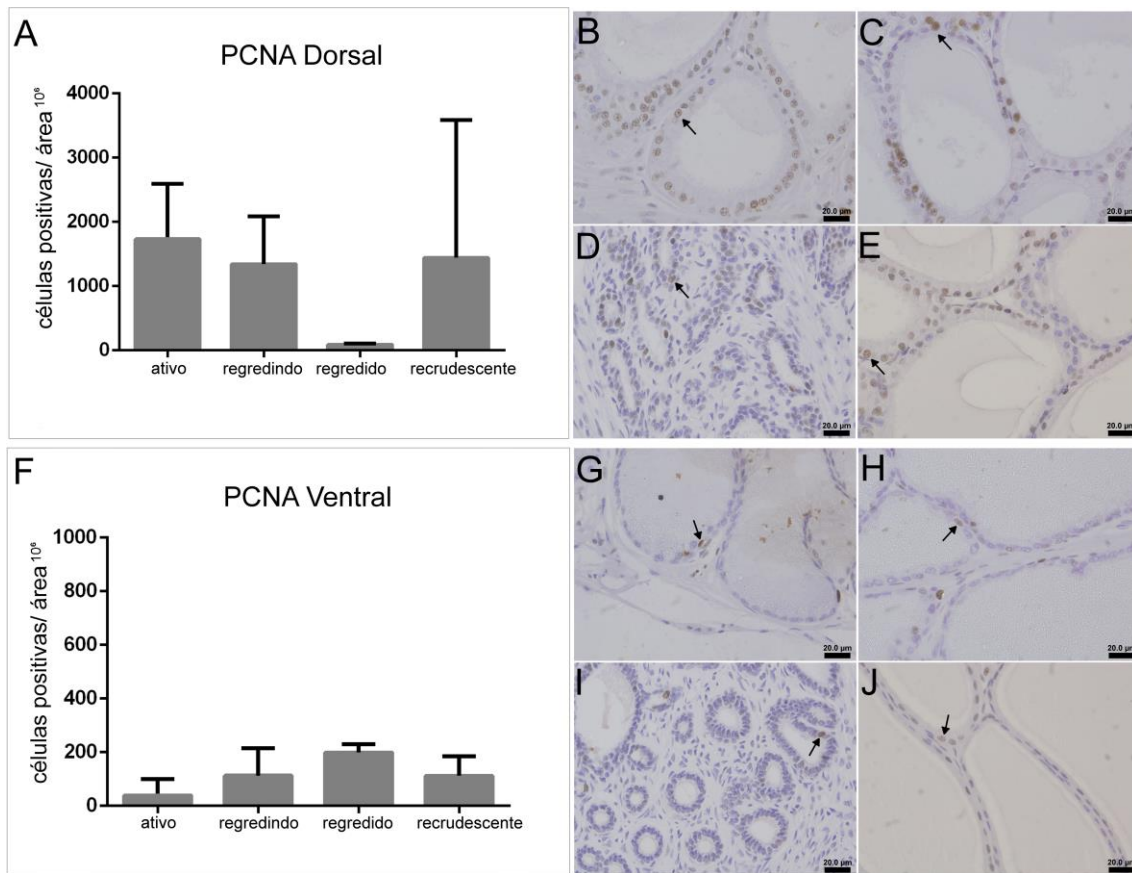


Figura 7. Índices da taxa de proliferação celular (PCNA) na próstata nas regiões dorsal (A) e ventral (F), durante os quatro períodos reprodutivos do testículo. B-E e G-J: fotomicrografias evidenciando as marcações (setas) nos quatro períodos: B/G, período ativo; C/H, período regredindo; D/I, período regredido; E/J, período recrudescente.

V. CAPÍTULO 2

Alterações anuais da morfofisiologia da próstata de *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae).

(Annual morphophysiological variations in the prostate of Pallas's Mastiff Bat, *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae))

**Annual morphophysiological variations in the prostate of Pallas's Mastiff
Bat, *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae)**

Manuela T. Comelis^a, Sebastião R. Taboga^b, Rejane M. Góes^b, Eliana Morielle-Versute^{a,*}

^a Departamento de Zoologia e Botânica do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Campus São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista (UNESP) São Paulo, Brasil

^b Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Campus São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista (UNESP) São Paulo, Brasil

*Autor correspondente: Departamento de Zoologia e Botânica, Instituto de Biosciências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Campus São José do Rio Preto, Universidade de São Paulo (UNESP), São Paulo, email: eliana.morielle-versute@unesp.br

Artigo a ser submetido para publicação na revista "Animal Reproduction Science"

Palavras chave: Chiroptera, glândulas reprodutivas acessórias, *Molossus molossus*, próstata.

Resumo

Molossus molossus é uma espécie de morcego com reprodução poliéstrica sazonal e, na região sudeste do país, apresenta duas estações reprodutivas ao ano, uma em março-abril e outra em novembro, diretamente influenciadas pela pluviosidade e disponibilidade de alimento. Dados da literatura apontam a

ocorrência de machos sexualmente ativos durante o ano todo e um comportamento reprodutivo ainda a ser melhor esclarecido. Assim, foi objetivo do presente trabalho avaliar a morfologia da próstata dessa espécie ao longo do ano (mensalmente), e analisar a expressão dos receptores de andrógenos e as taxas de proliferação e morte celular nessa glândula. Para tanto foram analisados 36 machos adultos, representando três espécimes por mês. As próstatas foram retiradas e processadas para análises morfológicas e imuno-histoquímicas. Os resultados mostraram que há variação na morfologia da próstata quando comparados os diferentes meses do ano. Nos meses finais e iniciais do ano (dezembro a abril) a próstata apresentou-se com menor tamanho (peso), epitélio com menor altura e com lúmen reduzido, principalmente na região ventral, indicando menor atividade secretora. Já nos meses intermediários do ano (maio-outubro), a próstata apresentou maior peso e tamanho, lúmen amplo e estroma reduzido, bem como epitélio com maior altura, indicando maior atividade secretora e preparação para o próximo pico reprodutivo. Os receptores de andrógenos e a proliferação celular apresentaram dois picos tanto na região dorsal, (março e novembro) quanto na região ventral (maio/julho e agosto/outubro), acompanhando a variação dos componentes da glândula e reforçando a presença dos dois picos reprodutivos da espécie, um principal em novembro e outro entre março e maio. Assim, os dois picos de maior atividade exibidos pela próstata de *M. molossus* apresentaram sincronia com o previamente observado para os testículos desta espécie.

1. Introdução

Molossus E. Geoffroy, 1805, é um dos mais diversos gêneros de morcegos neotropicais da família Molossidae, com ampla distribuição nas Américas, ocorrendo do México ao sul da Argentina, incluindo várias ilhas do Caribe (Simmons, 2005). No Brasil há registros de seis espécies do gênero que ocorrem desde o estado do Amazonas até o Rio Grande do Sul, ocupando os seis grandes biomas brasileiros (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Mata Atlântica e Pampa (Fabian e Gregorin, 2007; Eger, 2008; Gregorin et al., 2011, Loureiro et al., 2018)

As espécies *Molossus molossus* (Pallas, 1766) e *Molossus rufus* (E Geoffroy, 1805) são as que apresentam maior distribuição geográfica (REFS). Conhecidos vulgarmente como morcegos de cauda livre são altamente adaptados às áreas urbanas, onde utilizam como abrigos forros de residências ou outras construções, e, em áreas não urbanas ocupam ocos de árvores (Esbérard, 2002; Eger, 2008; Reis et al., 2007). Ambas têm hábito alimentar exclusivamente insetívoro o que lhes confere um papel importante no equilíbrio ecológico, controlando as populações de insetos (Altringham, 1998; Reis et al., 2007; Esbérard e Bergallo, 2010).

Molossus molossus é aparentemente uma espécie poliéstrica sazonal, condição que tem sido observada em espécimes de diferentes localidades, e em geral, com duas estações reprodutivas ao ano. Estas são diretamente influenciadas pela pluviosidade e disponibilidade de alimento (Fabian e Marques, 1989; Esbérard, 2002, 2011; Barros et al., 2013).

Barros et al. (2013) identificaram que os machos de *M. molossus* têm dois picos de atividade testicular, um no outono, em que há elevada produção de espermatozóides (espermatogênese), e outro no verão, onde há uma elevada produção de hormônio (esteroidogênese), e Beguelini et al. (2010) identificaram espermatozoides na cauda do epidídimo durante todo o ano, dados que indicam a ocorrência de machos sexualmente ativos durante o ano todo e um comportamento reprodutivo ainda a ser melhor esclarecido.

Contribuindo no sucesso reprodutivo das espécies está, além da atividade testicular, o correto funcionamento das glândulas reprodutivas acessórias (GRAs), já que estas garantem a viabilidade dos espermatozoides (Rochel et al., 2007). As GRAs compreendem a próstata, vesículas seminais, glândulas ampulares e glândulas bulbouretrais, que podem ou não estar presentes nas diferentes espécies de morcegos (Crinchton e Krutzsch, 2000).

O complexo prostático de *M. molossus* foi previamente caracterizado e apresenta dois componentes distintos: um lobo ventral único e lobo dorsal tetralobulado. As análises realizadas na próstata de espécimes capturados na

região noroeste do estado de São Paulo detectaram variações morfológicas nos componentes, as quais foram associadas às mudanças das estações seca e chuvosa do ano (Christante et al., 2013). As análises mostraram haver uma sincronia funcional entre as duas regiões evidenciando que o principal pico reprodutivo da espécie é na primavera, coincidindo como início das chuvas na região. Sabendo que *M. molossus* é uma espécie de reprodução contínua, na qual não há regressão testicular (Morais et al., 2012, 2013), e que o complexo prostático apresenta variações sazonais ainda não completamente estabelecidas, foram objetivos do presente trabalho avaliar a morfologia da próstata dessa espécie ao longo do ano (mensalmente) e analisar a expressão dos receptores de andrógenos e as taxas de proliferação e morte celular nesse órgão.

2. Material e Métodos

2.1. Espécimes

Três espécimes machos adultos de *Molossus molossus* foram capturados a cada mês ($n_{\text{mensal}}=3$) durante o período de um ano ($n_{\text{total}}=36$), na região noroeste do Estado de São Paulo - Brasil (49W22'45" 20S49'11"). Localizada a 500 metros acima do nível do mar a região está inserida em um degradado bioma do cerrado, com clima tropical chuvoso, com inverno seco, do tipo Aw na classificação climática de Köppen-Geiger, com temperaturas médias mensais sempre superiores a 18 °C. Os verões são quentes e úmidos, com temperaturas máximas que podem ultrapassar 35 °C e os invernos são secos e relativamente frios, com mínimas por vezes ficando abaixo de 10 °C. A temperatura média anual é de 23,6 °C (Miranda et al., 2014).

As coletas foram autorizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente-IBAMA (21707-1; Sisbio: 59765825-13/04/2010). Os espécimes foram classificados como adultos com base no peso corporal, na completa ossificação das articulações metacarpo-falangeanas e no grau de desgastamento dentário (Kunz e Anthony, 1982; de Knecht et al., 2005). Os animais foram

tratados de acordo com as recomendações do Comitê no Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Institute of Laboratory Animal Resources, Conselho Nacional de Pesquisas, "Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório". Após a captura, os animais foram mantidos em gaiolas individuais (40 x 20 x 20 cm) com água *ad libitum*, em uma sala específica, no escuro a 25-30 °C, até a manhã seguinte, quando foram eutanasiados e processados.

Os protocolos dos experimentos foram autorizados pelo Comitê Institucional de Ética para Experimentação Animal (Protocolo do Documento: 013/2009 CEEA/IBILCE-UNESP). Os espécimes estão depositados na Coleção Científica de Chiroptera DZSJRP (UNESP, São José do Rio Preto).

2.2. *Morfologia prostática externa*

Os animais foram eutanasiados por anestesia profunda com Cloridrato de ketamina 11,6% (Dopalen-Vertebrands, Paulínia, SP, Brazil) aplicada subcutaneamente na quantidade de 0,1 ml para cada 50 g de peso corporal. Foi registrado o peso corporal do animal e, após dissecação o complexo prostático foi removido e pesado.

A análise da morfologia externa foi realizada sob microscópio estereoscópio (Zeiss Discovery.V20) equipado com um sistema de captura de imagem.

2.3. *Histologia*

O complexo prostático removido foi fixado por metarcarn (metanol, clorofórmio e ácido acético na proporção 6:3:1) por três horas. Após, a próstata foi desidratada em uma bateria de álcoois (50%-100%), clarificada em xilol e embebida em parafina. O material foi então seccionado em 5 µm de espessura em micrótomo rotativo (RM 2155, Leica Microsystems) e submetido às análises histológicas, morfométricas e imuno-histoquímicas.

Para as análises histológicas os cortes obtidos foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE; Ribeiro e Lima, 2000), Ácido periódico e Schiff (PAS; Behmer et al., 1976) e Reticulina de Gömori (Gömori, 1937). As análises foram feitas em fotomicroscópio Olympus BX60 (Olympus Optical, Tokyo, Japan) com os softwares Image-Pro-Plus para Windows versão 6.1 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) e Olyvia 2.4 (Olympus soft Imaging Solutions GmbH).

2.4. Análises estereológicas

As análises morfométricas e estereológicas foram aplicadas nos cortes da próstata corados com HE, para os quais foram avaliadas a altura do epitélio e a porcentagem relativa dos componentes da próstata: epitélio, lúmen e estroma.

Para quantificar a altura do epitélio, foram realizadas 34 medidas aleatórias para cada animal, totalizando 102 medidas por grupo experimental ($n_{\text{mensal}}=3$). Como o epitélio do lobo ventral é atípico a análise morfométrica foi realizada apenas no lobo dorsal, onde a análise é possível. O epitélio foi medido apenas em cortes com os ácinos cortados de modo transversal, com apenas uma camada de células. A altura do epitélio foi medida da base do epitélio, lâmina basal, até o ponto mais apical da célula.

A porcentagem relativa dos componentes da próstata epitélio, lúmen e estroma, foi estimada de acordo com o método de Weibel et al. (1978) sendo a frequência relativa calculada através do Sistema-Teste de arranjo triangular M42, com 130 pontos no sistema, utilizando 16 campos selecionados aleatoriamente para as regiões dorsal e ventral da próstata (aumento 200X) de cada animal (48 campos/grupo amostral) no software Image Pro-Plus (Media Cybernetics versão 6.0, MD, USA). A frequência foi calculada de acordo com os pontos do Sistema-Teste que tocam os componentes analisados, ou seja, epitélio, lúmen e estroma.

2.5. Imuno-histoquímica

Para verificação da expressão de receptores androgênicos (AR) e da proliferação e morte celular, foram realizadas imunomarcações.

Os cortes histológicos foram desparafinizados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6,0 – 6,5) à 100°C, seguida pelo bloqueio de peroxidases endógenas, em solução de Peróxido de Hidrogênio a 10% em metanol. Para as reações com o receptor de andrógeno (AR) os cortes foram permeabilizados com tampão (TBS_{NP40}) e triton (50µl em 100 ml do tampão). O bloqueio de proteínas inespecíficas foi feito com leite em pó e tampão (TBS_{NP40} para AR e PBS para PCNA) em 5% de concentração. Após os bloqueios, os cortes foram incubados com os anticorpos primários contra receptores de andrógenos e contra antígeno nuclear para proliferação celular (AR- rabbit policlonal IgG, sc-816/Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; PCNA—mouse monoclonal IgG, sc-56, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) na diluição 1:50 *overnight* a 4°C. Após serem lavados em tampão e incubados com pós-polímero e polímero (Novolink Max Polymer, Novocastra, Leica biosystems, Newcastle Ltd) os cortes passaram pela revelação com a diaminobenzidina (DAB). A contracoloração dos cortes foi realizada com hematoxilina de Harris por 20-40 segundos. As lâminas foram desidratadas e montadas em bálsamo do Canadá e avaliadas em microscopia de luz. Os controles negativos foram gerados omitindo-se a etapa de incubação com o anticorpo primário.

Para detecção de apoptose foi realizada com o kit TUNEL (TdT-Fragel-Calbiochem, Oncogene Research Products, Boston) segundo instruções do fabricante. Os cortes foram revelados com DAB e contracolorados com hematoxilina de Harris por 40 segundos. Os controles negativos foram gerados omitindo-se a etapa de incubação com a enzima Tdt.

A quantidade relativa de células positivas nas imuno-marcações no epitélio acinar foi calculada utilizando-se cinco campos aleatórios das regiões dorsal e ventral da próstata (aumento de 400x) de cada grupo experimental. O número resultante foi então multiplicado pela área total da região prostática correspondente (ventral ou dorsal). Para a análise de apoptose devido à alta taxa de marcação não foi necessária a contagem das células positivas. A apoptose não foi avaliada quantitativamente, apenas qualitativamente.

2.6. Análise dos Dados

Médias e erro padrão foram calculados para todos os dados. A normalidade foi verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov e as diferenças entre os grupos foram calculadas através do teste Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn para múltiplas comparações, utilizando o valor de $p \leq 0,05$ para a diferença significativa entre os grupos. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software© Inc, 1992-2007). As análises de marcações de imuno-histoquímica foram efetuadas pelo método quantitativo, que expressa a porcentagem de células positivas (marcadas).

3. Resultados

3.1. Morfologia e Histologia

A próstata de *M. molossus* possui um padrão semi-lobado e para a qual se reconhece duas regiões: ventral e dorsal (Figura 1). Ambas apresentam morfologia, constituição histológica e secreções diferentes. A região dorsal é tetralobulada, com epitélio pseudoestratificado, de cubóide a colunar e com poucas células basais. Os ductos deferentes estão associados aos dois lobos centrais (Figura 1C - d2 e d3). A região ventral, por sua vez, apresenta um lobo

único, compacto, com epitélio indefinido. As células secretoras possuem núcleo alongado, localizado na região basal e há poucas células basais (Figura 2A,C). Apesar de única, a região ventral é maior que a dorsal. Intimamente associada ao lobo ventral está a uretra. Externamente, a glândula é recoberta por uma cápsula de tecido conjuntivo, que divide as duas regiões - dorsal e ventral, e também separa os quatro lobos da região dorsal (Figura 2A, D-E).

A coloração por Reticulina de Gömöri demonstrou a presença de grande quantidade de fibras reticulares e de colágeno no estroma da glândula. Estas fibras estão compondo a estrutura da matriz extracelular que forma a cápsula de tecido conjuntivo que envolve ambas as regiões da próstata, e estão dispostas em paralelo na área que separa as duas regiões, formando uma camada de fibrilas (Figura 2D-E).

Por meio da técnica de PAS foi possível identificar os tipos de secreções das duas regiões prostáticas. Na região ventral a secreção é holócrina, PAS-positiva (glicoproteínas) e granular, enquanto na região dorsal a secreção é acidófila e PAS-negativa, e com textura variando de hialina a granular (Figura 2F-G).

1.2. Análises mensais

O peso corporal dos espécimes variou pouco ao longo do ano, sendo que os animais mais pesados foram observados nos meses de maio e novembro. Para o peso da próstata os menores tamanhos ocorreram no período chuvoso (dezembro a março) e os maiores tamanhos no período seco (junho a setembro) (Figura 3).

Houve variação na morfologia da próstata quando comparados diferentes meses do ano. Essa variação está explicitada nas descrições da estereologia e da morfometria.

3.2.1. Morfometria

Os resultados obtidos para morfometria em *M. molossus* apontam um aumento na altura do epitélio nos meses intermediários do ano, sendo os maiores valores encontrados em junho (média de 243,5 μm), maio (média de 206,5 μm) e novembro (média de 206,5 μm), coincidindo com os dois picos reprodutivos descritos para espécie. Há um declínio na altura do epitélio nos meses mais iniciais do ano, sendo os menores valores encontrados em abril (média de 136,6 μm), março (média de 155 μm) e janeiro (média de 159,6 μm) (Figura 4).

3.2.2 Estereologia

A avaliação esterológica identificou a variação dos componentes, epitélio, lúmen e estroma de cada região da próstata em cada mês. Os resultados para *M. molossus* nesta análise mostram que as porcentagens do epitélio, lúmen e estroma variaram diferentemente nas duas regiões (Figura 5).

Na região dorsal a porcentagem de epitélio variou pouco, mantendo-se mais ou menos constante durante o ano, sendo a menor média de proporção observada em outubro (47,08%) e a maior em abril (60,80%). As porcentagens de lúmen e estroma apresentaram maior variação. As maiores proporções médias de lúmen ocorreram nos meses de maio (43,62%), junho (42,59%) e agosto (41,96%), enquanto as menores ocorreram em março (13,94%), abril (14,94%) e fevereiro (18,24%). O estroma apresentou os maiores valores em março (34,17%), fevereiro (27,53%) e janeiro (26,47%), e os menores valores em junho (8,4%), maio (8,75%) e agosto (10,9%). (Figura 5A-C).

Na região ventral todos os componentes apresentaram variações nas porcentagens. As maiores médias na proporção de epitélio foram registradas, em ordem decrescente, nos meses de abril (45,9%), fevereiro (41,19%) janeiro e dezembro (37% em ambos), e as menores em maio (16,76%), junho (23,21%) e outubro (24,04%). Para o lúmen, as maiores médias foram registradas nos meses de maio (77,4%), junho (72,02%) e outubro (67,29%).

Enquanto nos meses de fevereiro (7,82%), abril (10,10%) e janeiro (19,13%) foram observados os menores valores. Para o estroma os maiores valores ocorreram nos meses de fevereiro (50,99%), janeiro (45,38%) e março (45,16%), enquanto os menores foram observados em junho (4,77%), maio (5,83%) e outubro (8,62%). De forma geral observou-se que as proporções médias do epitélio e estroma combinadas estão inversamente correlacionadas com proporções do lúmen (Figura 5D-F).

3.3. Imuno-histoquímica

Os dados das reações de Imuno-histoquímica não foram obtidos para o mês de abril devido ao alto grau de regressão do epitélio prostático nesse mês, fato que impossibilitou a contabilização das imuno-marcações.

3.3.1. Receptor de andrógeno (AR)

A expressão dos receptores de andrógenos variou entre os meses nas duas regiões prostáticas e foi significativamente maior na região dorsal da próstata (Figura 6).

Na próstata dorsal foram detectados dois picos de expressão, um em março (14398^{10^6} células positivas por área) e outro em novembro (13685^{10^6} células positivas por área), enquanto nos outros meses manteve-se mais ou menos constante (mais ou menos 4000^{10^6} células positivas por área). Nenhum pico com os níveis elevados de expressão de AR como os observados na região dorsal foi registrado para a próstata ventral. Nesta os maiores valores de células positivas ocorreram nos meses de maio a outubro, e destes a maior quantidade de receptores foi detectada nos meses de junho (6938^{10^6} células positivas por área) e agosto (9516^{10^6} células positivas por área). Nos demais meses, janeiro a março, novembro e dezembro a expressão de AR foi muito baixa (750^{10^6} células positivas por área) (Figura 6).

3.3.2. Proliferação celular PCNA

A proliferação celular mostrou variação nas duas regiões da próstata. Na região dorsal a maior proliferação ocorreu nos meses de fevereiro (2427^{10^6} células positivas por área) e novembro (1869^{10^6} células positivas por área), enquanto a menor proliferação ocorreu nos meses de dezembro (406^{10^6} células positivas por área), janeiro ($548,1^{10^6}$ células positivas por área) e julho ($538,9^{10^6}$ células positivas por área). Para a região ventral, pode-se perceber maior proliferação nos meses de maio (3704^{10^6} células positivas por área) a outubro (3436^{10^6} células positivas por área), com a maior proliferação ocorrendo no mês de agosto (4729^{10^6} células positivas por área) e com julho apresentando a menor taxa desses meses ($292,4^{10^6}$ células positivas por área). Esse período corresponde às estações inverno e primavera na região. Nos meses de dezembro ($213,4^{10^6}$ células positivas por área), janeiro ($150,2^{10^6}$ células positivas por área) e março ($225,1^{10^6}$ células positivas por área) a taxa de proliferação atingiu os menores valores. Com base nestes resultados pode-se reconhecer dois picos de proliferação ao longo do ano, um em maio e junho, e outro de agosto a outubro, interrompidos no mês de julho, em geral o mês para o qual são registradas as menores temperaturas na região (Figura 7).

3.3.3. TUNEL

A região ventral da próstata apresentou grande imunoreatividade, estando quase totalmente marcada em todos os meses (Figura 8). Não foi possível detectar marcação específica para a técnica de TUNEL na região dorsal da próstata, o que pode estar relacionado às características teciduais nesta região; sendo necessário o estabelecimento de novos protocolos para tal.

4. Discussão

A morfologia prostática varia amplamente entre os grupos de mamíferos (Olsen, 2009; Puga et al., 2013; Beguelini et al., 2015, 2016; Martins et al., 2015, 2016). Roedores apresentam quatro pares de lóbulos prostáticos enquanto humanos possuem uma próstata compacta, dividida em três zonas: central, transição e periférica (Price e Williams-Ashman, 1961; Price 1963; Jesik et al., 1982; Junqueira e Carneiro, 2008). Em Chiroptera a morfologia da próstata também apresenta grande variação entre os grupos. Nos filostomídeos *Artibeus planirostris* (Puga et al., 2013) e *Platyrrhinus lineatus* (Puga et al., 2011) a próstata é compacta, com duas regiões: dorsal e ventral, enquanto que em *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina* e *Phyllostomus discolor*, a próstata é também compacta, porém, com três regiões: ventral, dorsolateral e dorsal (Martins et al., 2012). *Myotis nigricans*, pertencente à família Vespertilionidae, apresenta padrão de lobulação semelhante ao encontrado em roedores, com três regiões: dorsal, dorsolateral e ventral, todas bilobuladas (Negrin et al., 2014; Rochel et al., 2007).

Os dados deste estudo mostram que a próstata de *M. molossus* possui um padrão diferente dos demais. Ela é semi-lobada e dividida em duas regiões: ventral e dorsal, que têm morfologia, constituição histológica e secreções diferentes. A região ventral, assim como o descrito para algumas espécies de ratos e camundongos (Hayashi et al., 1991) é maior e única, porém mostra um padrão histológico distinto, observado apenas em outros membros de Chiroptera, com epitélio atípico apresentando núcleos achatados na região basal, secreção holócrina, PAS-positiva e granular, além de poucas células basais (Puga et al., 2011; Negrin et al., 2014; Puga et al., 2013; Christante et al., 2013). A região dorsal, no entanto, é tetralobulada, com epitélio cubóide acolunar, pseudoestratificado e com poucas células basais. Sua secreção é acidófila, PAS-negativa, indicando uma constituição mais proteica que a secreção da região ventral, e com textura variando de hialina a granular. Os

ductos deferentes estão associados aos lobos centrais da região dorsal e a uretra está associada à região ventral.

A cápsula envolvendo cada um dos lobos prostáticos, bem como os quatro lobos da região dorsal é uma característica também observada para as espécies de morcegos vespertilionídeos *M. nigricans* e *E. furinalis* (Beguelini et al., 2015). Espécies pertencentes à família Phyllostomidae, no entanto, apresentam cápsula única envolvendo as duas ou três regiões próstaticas (Puga et al., 2013; Martins et al., 2015, 2016). Essa variação sugere evolução independente do complexo prostático nas famílias de Chiroptera, desde um complexo multilobulado, similar ao encontrado em roedores, até uma estrutura única, compacta, semelhante à de humanos (Jesik et al., 1982; Laczkó et al., 2005; Rochel et al., 2007; Santos et al., 2018).

No geral o peso corporal dos espécimes se manteve constante no transcorrer do ano, sendo os animais mais pesados identificados nos meses de maio e novembro, próximo aos dois picos reprodutivos descritos para a espécie (Fabian e Marques, 1989; Beguelini et al., 2010, 2012; Moraes et al., 2012, 2013). Para o peso da próstata os menores tamanhos foram identificados nos meses de dezembro a março, caracterizados pelo maior índice de chuvas na região (período chuvoso, verão ou meses iniciais e finais do ano), enquanto que os maiores tamanhos ocorreram nos meses de junho a setembro, caracterizados por um índice de chuvas baixo ou ausente (período seco, outono-inverno, ou meses intermediários do ano). Estes dados também são compatíveis com os observados na histologia, em que há menor atividade prostática nos meses finais e iniciais do ano e sua reativação nos meses intermediários.

Os resultados para a análise anual indicaram que há variação em todos os componentes de ambas as regiões prostáticas. Na região dorsal a porcentagem de epitélio manteve-se mais ou menos constante durante o ano (média de 47,08% a 60,80%), sendo o principal componente da glândula,

enquanto as porcentagens de lúmen e estroma apresentaram maior variação, e estão inversamente relacionadas ao epitélio, sendo estes, portanto, os responsáveis pela maior variação encontrada na glândula.

Na região ventral a variação de todos os componentes foi maior que na dorsal. As médias do epitélio e estroma combinadas foram inversamente proporcionais à média do lúmen. Nos meses em que o lúmen foi observado em maior quantidade os outros dois componentes (epitélio e estroma) estavam em menor quantidade; e quando o lúmen estava presente em menor quantidade os outros dois componentes foram observados em maior quantidade .

A porcentagem de lúmen na próstata ventral teve aumento significativo em maio (77,4 %), mês que sucede o primeiro pico reprodutivo descrito para a espécie (março-abril), após, teve uma queda significativa em julho, aumentando novamente em agosto, mantendo-se elevada até outubro (67,29%). Já em novembro, reconhecido como o mês do segundo pico reprodutivo da espécie, o lúmen começou a diminuir e o epitélio e o estroma começaram a aumentar, mantendo-se elevados até abril. Isso indica que as secreções da próstata ventral já foram liberadas e a atividade secretora está reduzida até o próximo período.

Na próstata dorsal o percentual de lúmen teve variação semelhante à ventral, onde começou a aumentar também em maio (43,62%), sofreu queda em julho e aumentou novamente em agosto (41,96%). Entretanto, nesta região o lúmen se manteve constante até dezembro, não diminuindo logo em seguida ao pico reprodutivo de novembro. Nos meses iniciais do ano (janeiro a abril) houve uma diminuição do lúmen e um maior percentual de estroma, bem como uma menor altura do epitélio, indicando baixa atividade secretora da próstata.

Esses valores são concordantes com os encontrados por Christante et al. (2013) que analisaram espécimes da mesma região e observaram que o estroma estava maior na estação chuvosa e menor na estação seca, e o inverso para o lúmen, que estava maior na estação seca e menor na estação

chuvosa para a região ventral. Por outro lado, nos dados para o epitélio, nossos resultados diferiram dos apresentados pelos autores, que não encontraram variação na próstata ventral durante os meses. Este fato deveu-se, possivelmente, ao tipo de análise realizada pelos autores, que agruparam os animais por estações seca e chuvosa, enquanto no presente estudo as análises foram mensais. Assim, no estudo anterior, alguns dados individuais durante os meses podem ter sido diluídos no agrupamento.

O padrão de expressão dos receptores de andrógenos na próstata acompanhou os picos reprodutivos de *M. molossus*, principalmente para a região dorsal. Esta apresentou picos em março (14398^{10^6} células positivas por área) e novembro (13685^{10^6} células positivas por área), já na região ventral os dois picos de receptores de andrógenos estão mais próximos do segundo pico reprodutivo da espécie (novembro), ocorrendo em maio-junho e agosto-outubro.

A proliferação celular exibiu o mesmo padrão dos receptores de andrógenos em ambas as regiões prostáticas, com dois picos presentes nos meses de fevereiro (2427^{10^6} células positivas por área) e novembro (1869^{10^6} células positivas por área) para a região dorsal, e maio-junho e agosto-outubro para a região ventral. Os dados de proliferação e de receptores de andrógenos indicaram que a região dorsal acompanha os dois picos reprodutivos descritos pelas análises do testículo (Beguelini et al., 2010, 2012; Morais et al., 2012, 2013) e de colônias da espécie (Fabián e Marques, 1989; Esbérard, 2002), enquanto que a região ventral, apesar de ter apresentado dois picos de AR e proliferação celular, teve maior representatividade no segundo pico reprodutivo.

O processo de liberação da secreção por meio da morte celular (glândula holócrina) explica a alta taxa de apoptose apresentada pela região ventral, bem como a menor quantidade de AR nessa região. A reposição celular descrita para outras espécies é um processo relativamente lento na próstata (Cunha et al., 1987; Toivanen e Shen, 2017), assim, mesmo após a

morte celular estas continuam compondo o arcabouço celular da região ventral, por isso a elevada marcação pela técnica de TUNEL, a baixa quantidade de AR presente na região bem como o atraso observado nos picos de proliferação e de AR em relação ao primeiro pico reprodutivo (março-abril).

Os dois picos de maior atividade exibidos pela próstata de *M. molossus* apresentaram sincronia com o previamente observado para os testículos desta espécie que são um no outono, em que há elevada produção de espermatozoides (espermatogênese), e outro no verão, onde há uma elevada produção de hormônio (esteroidogênese) (Barros et al., 2013). Houve maior atividade secretora de ambas as regiões no período de outono-inverno, e menor atividade secretora no período do verão. A região dorsal apresentou maior quantidade de receptores de andrógenos e proliferação celular em ambos os picos reprodutivos (março-abril e novembro), enquanto a região ventral apresentou um atraso nesses parâmetros em relação ao primeiro pico reprodutivo (março-abril).

5. Conclusão

Os resultados do presente trabalho mostraram que há variação na morfologia da próstata quando comparados os diferentes meses do ano. Nos meses finais e iniciais do ano (dezembro a abril) a próstata encontra-se com menor tamanho (peso), epitélio com menor altura e com lúmen reduzido, principalmente na região ventral, indicando menor atividade secretora. Já nos meses intermediários do ano (maio-outubro), a próstata apresentou maior peso e tamanho, lúmen amplo e estroma reduzido, bem como epitélio com maior altura, indicando maior atividade secretora e preparação para o próximo pico reprodutivo. Os receptores de andrógenos e a proliferação celular apresentaram dois picos tanto na região dorsal, (março e novembro) quanto na região ventral (maio/julho e agosto/outubro), acompanhando a variação dos componentes da glândula e reforçando a presença dos dois picos reprodutivos

da espécie, um principal em novembro e outro entre março e maio. Concluimos que a prostata varia sazonalmente de forma similar aos testículos, mas com um atraso para a prostata ventral. Essa sincronia é devido a maior expressão de receptores nos meses de março e novembro, principalmente para a região dorsal, que coordenam uma maior produção de secreção necessária para o processo de reprodução que ocorre em nesses meses. Por outro lado, a diminuição da expressão de tais receptores leva a diminuição da atividade prostática nos meses iniciais e finais do ano.

Agradecimentos

Agradecemos Luiz Roberto Falleiros Junior pelo suporte técnico. Agradecemos também o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processos: 2009 / 16181-9 e 2013 / 11859-2) e a bolsa concedida à Manuela Tosi Comelis Martins (Processo: 2015/06923-9).

6. Referências

- Altringham, J.D., 1998. Bats: biology and behavior. Oxford University Press: New York.
- Barros, M.S., Moraes, D.B., Araújo, M.R., Carvalho, T.F., Matta, S.L.P., Pinheiro, E.C., Freitas, M.B., 2013. Seasonal variation of energy reserves and reproduction in neotropical free-tailed bats *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). Braz. J. Biol. 73, 629-635
- Beguelini, M.R., Sergio, B.F.S., Leme, F. L. J., Taboga, S. R., and Morielle-Versute, E. 2010. Morphological features and morphometric analysis of the epididymis of two neotropical bats, *Eumops glaucinus* and *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). Chiropt. Neotr. 16, 769–779.

Beguelini, M.R., Taboga, S. R., Morielle-Versute, E. 2012. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in Pallas's mastiff bat, *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). Microsc. Res. Tech. 75, 856–868.

Beguelini, M.R., Góes, R.M., Rahal, P., Morielle-Versute, E., Taboga, S.R., 2015. Impact of the processes of testicular regression and recrudescence in the prostatic complex of the bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). J. Morphol. 276, 721–732.

Beguelini, M.R., Puga, C.C.I., Morielle-Versute, E., Taboga, S.R., 2016. Comparative analysis of the male reproductive accessory glands of bats *Noctilio albiventris* (Noctilionidae) and *Rhynchonycteris naso* (Emballonuridae). J. Morphol. 277, 1459–1468.

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

Crichton, E. G., and Krutzsch, P. H. 2000. 'Reproductive Biology of Bats'. (Academic Press: London).

Christante, C.M.; Beguelini, M.R.; Puga, C. C.; Negrin, A.; Morielle-Versute, E.; Vilamaior, P. S.; Taboga, S. R. 2013. Structure, histochemistry and seasonal variations of the male reproductive accessory glands in the Pallas's mastiff bat, *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). Reprod. Fertil. Dev. 27, 313–22.

Cunha, G.R., Donjacour, A.A., Cooke, P.S., Mee, H., Bigsby, R.M., Higgins, S.J., Sugimura, Y., 1987. The Endocrinology and Developmental Biology of the Prostate. Endocr. Rev. 8, 338–362.

De Knecht, L.V., Silva, J.A., Moreira, E.C., Sales, G.L., 2005. Bats found in the city of Belo Horizonte, MG, 1999–2003. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 57, 576–583.

Esbérard, C., 2002. Composição de colônia e reprodução de *Molossus rufus* (E. Geoffroy) (Chiroptera, Molossidae) em um refúgio no sudeste do Brasil. Revta. Bras. Zool. 19, 1153 – 1160.

Esbérard, C., 2011. Variação do tamanho de colônias de *Molossus* no Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. Neotr Biol Conser. 6, 71–77.

Esbérard, C., Bergallo, H.C., 2010. Foraging activity of the free-tailed bat *Molossus molossus* (Chiroptera; Molossidae) in southeastern Brazil. Brazilian J. Biol. 70, 1011–1014.

Eger, J., 2008. The family Molossidae, in: Gardner, A.L. (Ed.), Mammals of South America. The University of Chicago Press: Chicago. pp. 399–439

Fabian, M.E., Gregorin, R., 2007. Família Molossidae, in: Reis, N.L. et al. (Eds.), Morcegos do Brasil. Universidade Estadual de Londrina: Londrina.

Fabián, M.E., Marques, R.V., 1989. Contribuição ao conhecimento da biologia reprodutiva de *Molossus molossus*, Pallas, 1766 (Chiroptera, Molossidae). Rev. Bras. Zool. 6,603–610

Gregorin, R., Tahara A.S., Buzzato D.F., 2011. *Molossus aztecus* and other small Molossus (Chiroptera: Molossidae) in Brazil. Acta Chiropterol. 13, 311–317.

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

Hayashi, N., Sugimura, Y., Kawamura, J., Donjacour, A.A., Cunha, G.R., 1991. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. Biol. Reprod. 45, 308–321.

Jesik, C.J., Holland, J.M., Lee, C., 1982. An anatomic and histologic study of the rat prostate. Prostate. 3, 81–97.

Junqueira, L.M., Carneiro, J. 2008. 'Histologia Básica'. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro.

Kunz, T.H., Anthony, E.L.P., 1982. Age estimation and postnatal growth in the little brown bat, *Myotis lucifugus*. J. Mammal. 63, 23–32.

Laczkó, I., Hudson, D. L., Freeman, A., Feneley, M. R., Masters, J. R., 2005. Comparison of the zones of the human prostate with the seminal vesicle: Morphology, immunohistochemistry, and cell kinetics. The Prostate. 62, 260–266.

Loureiro, L.O., Gregorin, R., Perini, F.A., 2018. Diversity, morphological phylogeny, and distribution of bats of the genus *Molossus* E. Geoffroy, 1805 (Chiroptera, Molossidae) in Brazil. Zoosystema. 40, 425–452.

Martins, F.F., Puga, C.C.I., Beguelini, M.R., Morielle-Versute, E., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., 2015. Comparative analysis of the male reproductive accessory glands of bat species from the five Brazilian subfamilies of the Family Phyllostomidae (Chiroptera). J. Morphol. 276, 470–480.

Martins, F.F., Beguelini, M. R., Puga, C.C.I., Morielle-Versute, E., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S. R., 2016. Morphophysiology and ultrastructure of the male reproductive accessory glands of the bats *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina* and *Phyllostomus discolor* (Chiroptera: Phyllostomidae). Acta Histochem. 118, 640–651.

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

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

Negrin, A.C.; Beguelini, M.R.; Puga, C.C.; Christante, C. M.; Bueno, L. M.; Morielle-Versute, E.; Vilamaior, P. S.; Taboga, S. R., 2014. Structure, histochemistry, ultrastructure and seasonal variations of the male prostatic complex in the black Myotis bat, *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). Reprod. Fertil. Dev. 26, 1188-97.

Olsen, Bruce D. 2009. Understanding Human Anatomy Through Evolution (Second ed.). p. 112. ISBN 9780578021645.

Price, D.P., Williams-Ashman, H.G., 1961. The accessory reproductive glands of mammals, in: Young, W.C. (Eds.), Sex and Internal Secretions. Baltimore, Williams & Wilkins: Baltimore. pp. 366-448.

Price, D., 1963. Comparative aspects of the development and structure in the prostate. Natl Cancer Inst Monogr. 12, 1-27.

Puga, C.C.I., Beguelini, M.R., Negrin, A.C., Christante, C.M., Morielle- Versute, E., Vilamaior, P. S.L., Taboga, S.R., 2013. Structure, histochemistry and ultrastructure of the male reproductive accessory glands in the neotropical flat-faced fruit-eating bat *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). Reprod. Fertil. Dev. 25, 558–569.

Puga, C.C.I., Beguelini, M.R., Martins, F.F., Falleiros, L.R.Jr., Morielle-Versute, E., Vilamaior, P. S.L., Taboga, S. R., 2014. Seasonal changes in the prostatic complex of *Artibeus planirostris* (Chiroptera:Phyllostomidae). Gen. Comp. Endocrinol. 197,33–42.

Reis, N.L., Peracchi, A.L., Pedro, W.A., de Lima, I.P., 2007. Morcegos do Brasil. Londrina: Universidade Estadual de Londrina.

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).

Rochel, S. S.; Bruni-Cardoso, A.; Taboga, S. R.; Vilamaior, P. S. L.; Góes, R. M., 2007. Lobe identity in the mongolian gerbil prostatic complex: A new rodent model for prostate study. The Anat. Rec. 290, 1233-1247.

Santos, R.T.S., Pires, L.R.M., Albernaz, E.S.S., et al. 2018. Morphological analysis of the male reproductive accessory glands of the bat *Artibeus lituratus* (Phyllostomidae: Chiroptera). J. Morphol. 279, 228–241.

Simmons, N.B., 2005. Order Chiroptera, in: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference, 3rd edition. Johns Hopkins University Press: Baltimore. pp. 312–529.

Toivanen, R., Shen, M.M., 2017. Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. Published by The Company of Biologists Ltd | Development. 144, 1382-1398.

Weibel, E.R., Kistler, G.S., Scherle, W.F. 1966. Practical stereological methods for morphometric cytology. J. Cell Biol. 30, 23–38.

Legendas das Figuras

Figura 1. Próstata de *Molossus molossus* em vista estereoscópica. A: vista ventral; B: vista lateral; C: vista dorsal, na qual estão presentes os quatro lobos dessa região. v: lobo ventral; d: lobo dorsal; u: uretra; b: bexiga.

Figura 2. Cortes histológicos da próstata de *Molossus molossus*. A-C: Coloração por HE; D-E: Coloração por Reticulina de Gömöri, F-G: Coloração por PAS. A e D: visão geral da glândula; B e C: detalhe das regiões dorsal (B) e ventral (C). E: detalhe das regiões dorsal e ventral. F e G: detalhe das regiões ventral (F) e dorsal (G). U: uretra; V: região ventral; D: região dorsal. seta: camada de fibras reticulares entre os lobos dorsal e ventral.

Figura 3. Pesos corporais e dos complexos prostáticos (CP) de *Molossus molossus* nos 12 meses do ano (A e C) e pelas estações do ano (B e D). Nas estações as diferenças estatisticamente significativas ocorreram entre a primavera e o verão (B). Em C e D nota-se que os menores tamanhos da

próstata ocorreram no período chuvoso (verão: janeiro a março) e os maiores no período seco (junho a setembro). Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas entre as estações.

Figura 4. A: gráfico da variação da média da altura do epitélio da próstata dorsal de *Molossus molossus* ao longo do ano. B e C: fotomicrografias evidenciando a variação na altura do epitélio prostático, B mês de abril, C mês de junho. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os meses.

Figura 05. Percentual de cada componente (epitélio, lúmen, estroma) por meses do ano nas regiões dorsal (A) e ventral (D) da próstata de *Molossus molossus*. Fotomicrografias das regiões dorsal e ventral da próstata em períodos de baixa atividade (B e E) respectivamente, e alta atividade (C e F) respectivamente, evidenciando a variação de representatividade dos componentes. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes entre os mesmos componentes (epitélio Vs epitélio, lúmen vs lúmen e estroma Vs estroma).

Figura 06. Índice mensal da expressão de AR nas regiões dorsal e ventral da próstata (A e D) de *Molossus molossus*. B e E fotomicrografias mostrando período com alta expressão de AR na região B: dorsal e E: ventral. C e F fotomicrografias mostrando período com baixa expressão de AR na região C: dorsal e F: ventral. As setas mostram marcações em todas as imagens.

Figura 7. Índice mensal da proliferação celular nas regiões dorsal e ventral da próstata de *Molossus molossus* (A e D). B e E fotomicrografias mostrando período com alta proliferação celular na região B: dorsal e E: ventral. C e F fotomicrografias mostrando período com baixa proliferação celular na região C: dorsal e F: ventral. As setas mostram marcações em todas as imagens.

Figura 8. Fotomicrografias da próstata ventral de *Molossus molossus* mostrando o padrão das imuno-marcações de TÚNEL em período de alta (A) e

baixa atividade (B) prostática. As imagens evidenciam a alta reatividade da glândula ao marcador.

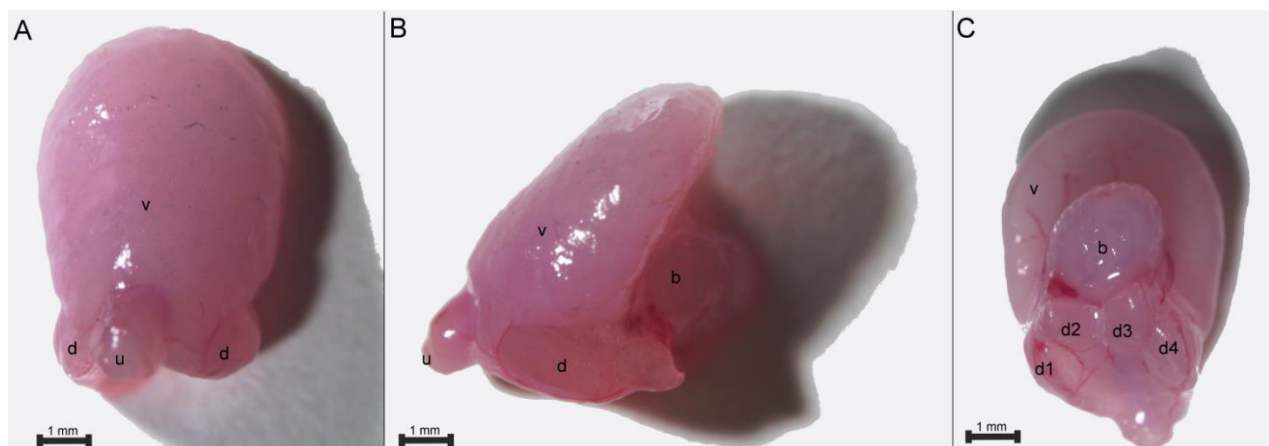


Figura 1. Próstata de *Molossus molossus* em vista estereoscópica. A: vista ventral; B: vista lateral; C: vista dorsal, na qual estão presentes os quatro lobos dessa região. v: lobo ventral; d: lobo dorsal; u: uretra; b: bexiga.

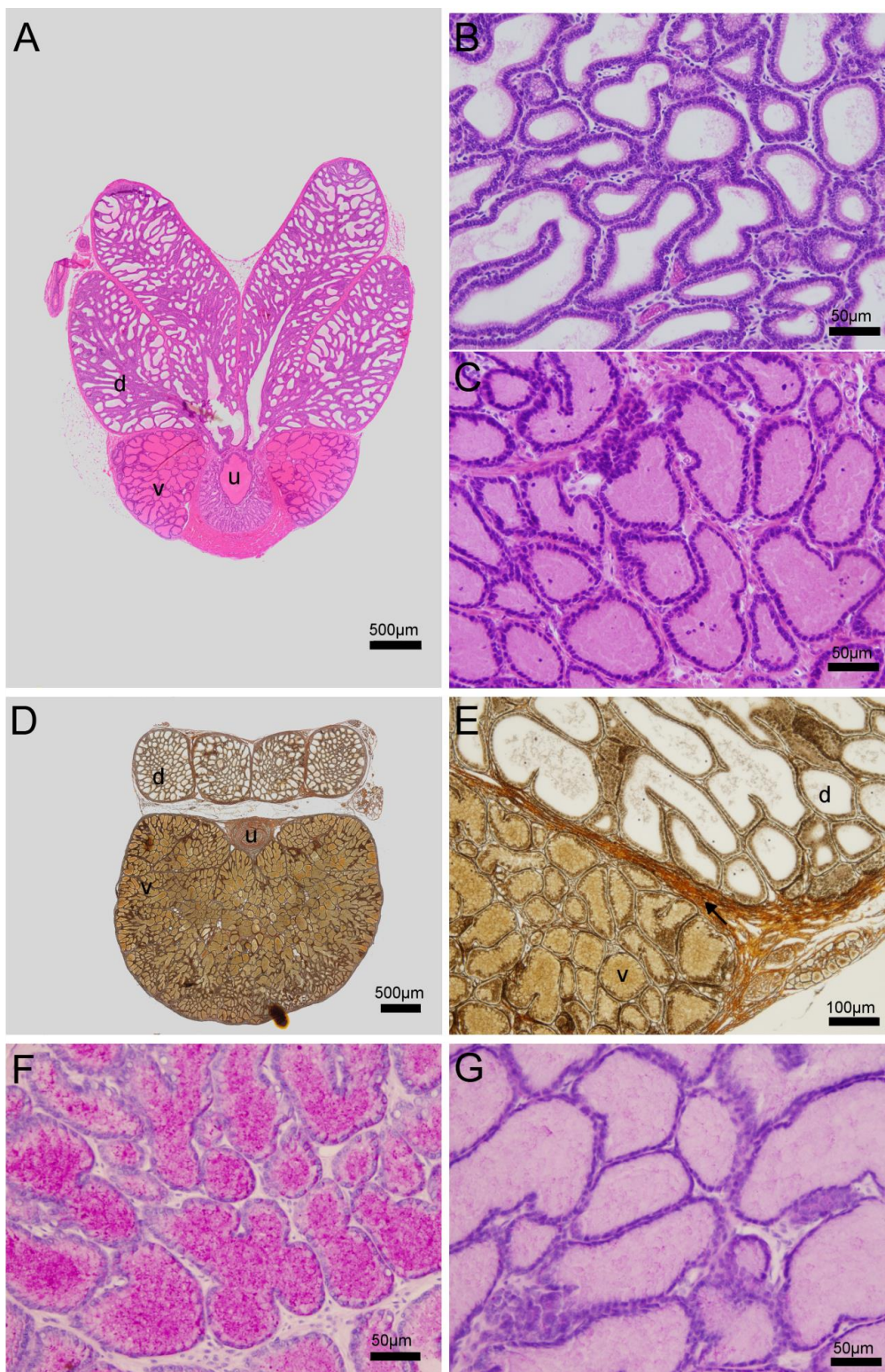


Figura 2. Cortes histológicos da próstata de *Molossus molossus*. A-C: Coloração por HE; D-E: Coloração por Reticulina de Gömöri, F-G: Coloração por PAS. A e D: visão geral da glândula; B e C: detalhe das regiões dorsal (B) e ventral (C). E: detalhe das

regiões dorsal e ventral. F e G: detalhe das regiões ventral (F) e dorsal (G). U: uretra; V: região ventral; D: região dorsal. seta: camada de fibras reticulares entre os lobos dorsal e ventral.

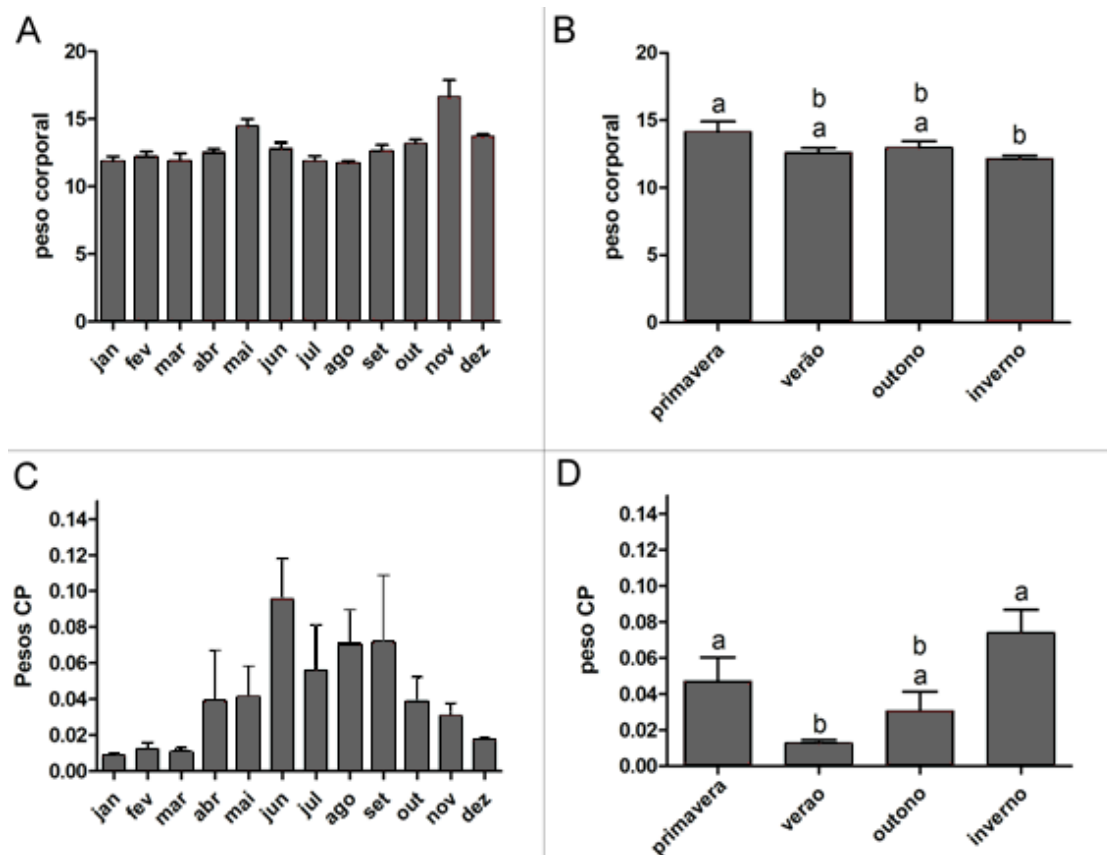


Figura 3. Pesos corporais e dos complexos prostáticos (CP) de *Molossus molossus* nos 12 meses do ano (A e C) e pelas estações do ano (B e D). Nas estações as diferenças estatisticamente significativas ocorreram entre a primavera e o verão (B). Em C e D nota-se que os menores tamanhos da próstata ocorreram no período chuvoso (verão: janeiro a março) e os maiores no período seco (junho a setembro). Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas entre as estações.

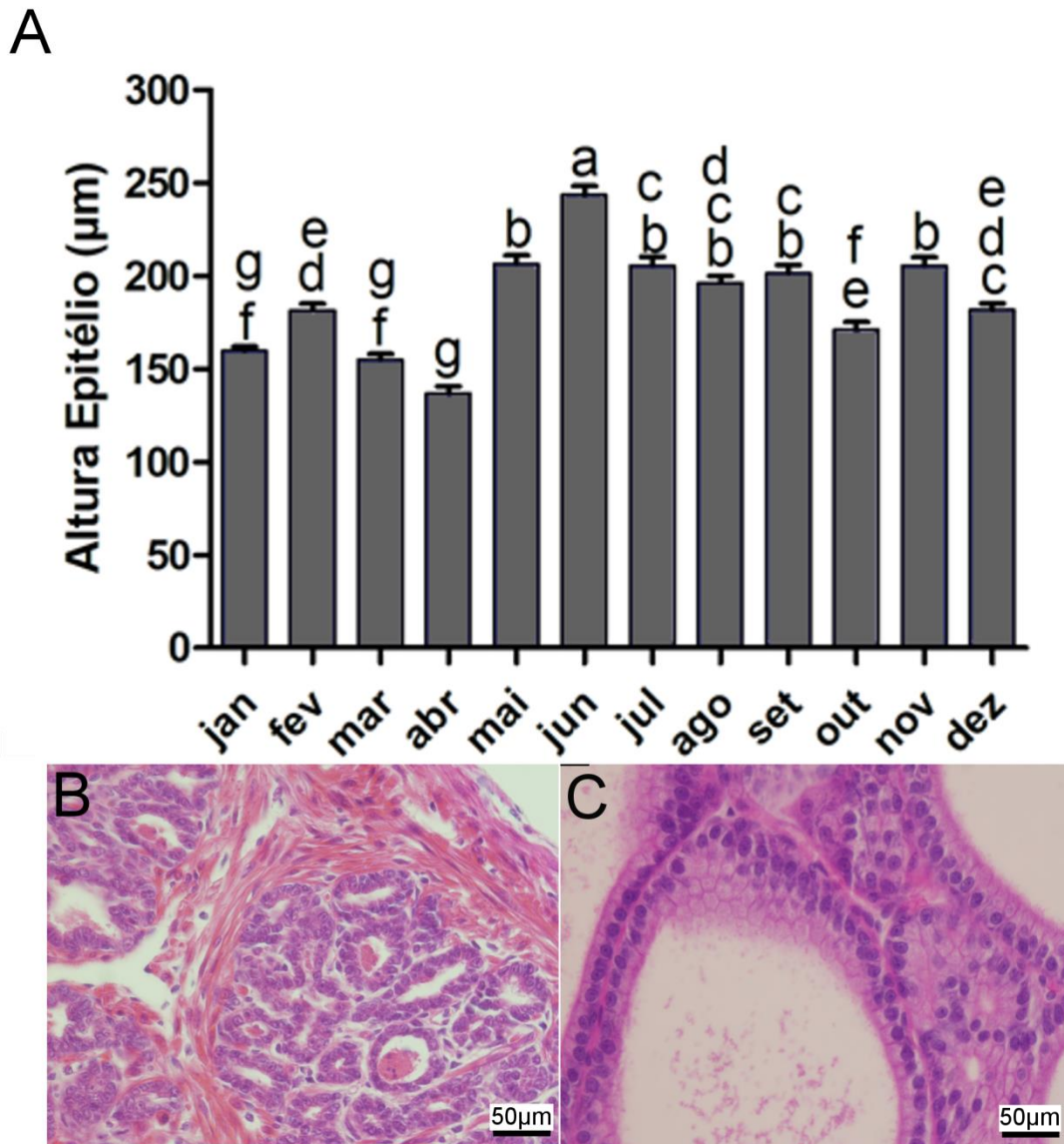


Figura 4. A: gráfico da variação da média da altura do epitélio da próstata dorsal de *Molossus molossus* ao longo do ano. B e C: fotomicrografias evidenciando a variação na altura do epitélio prostático, B mês de abril e C mês de junho. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os meses.

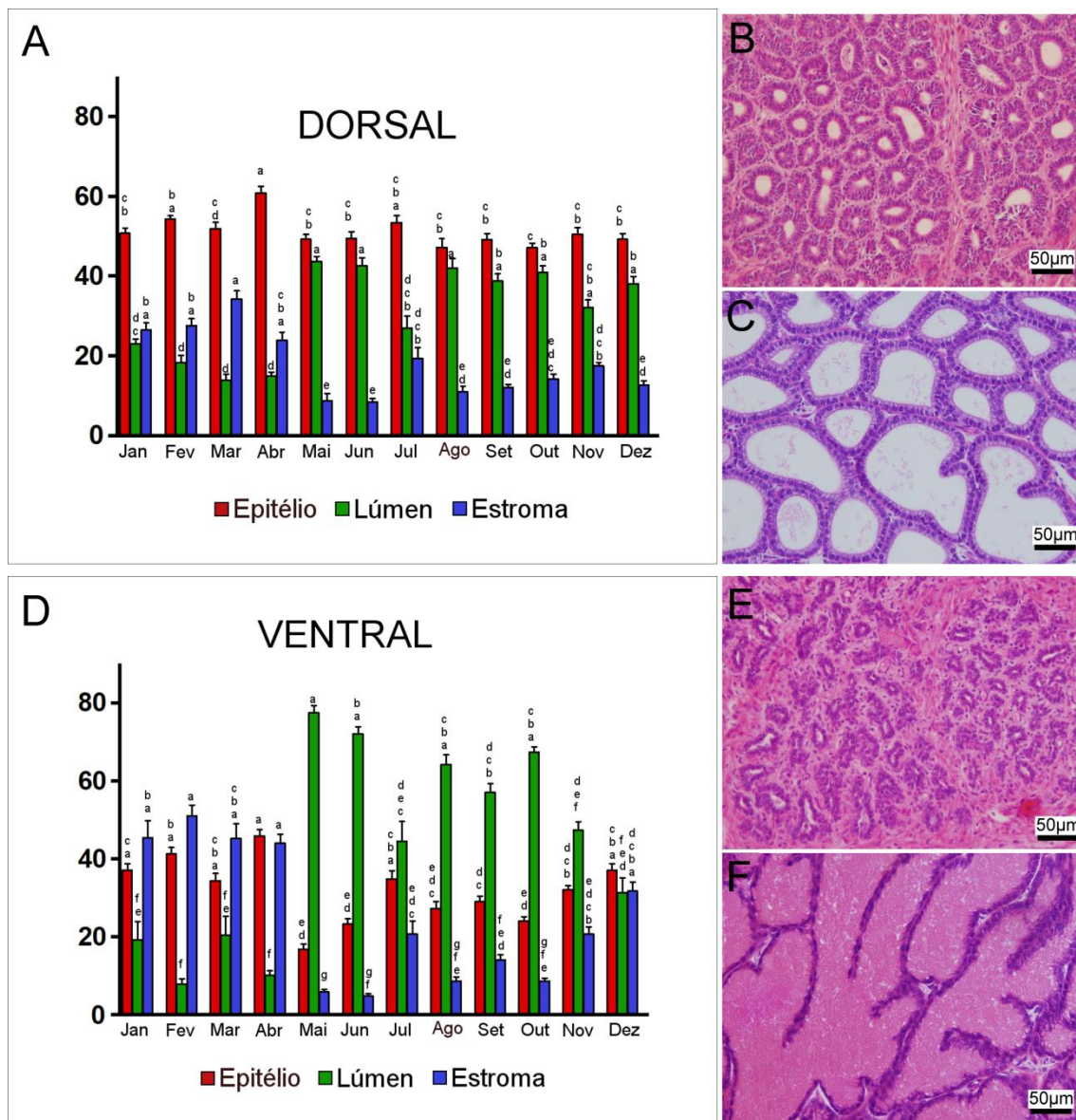


Figura 05. Percentual de cada componente (epitélio, lúmen, estroma) por meses do ano nas regiões dorsal (A) e ventral (D) da próstata de *Molossus molossus*. Fotomicrografias das regiões dorsal e ventral da próstata em períodos de baixa atividade (B e E) respectivamente, e alta atividade (C e F) respectivamente, evidenciando a variação de representatividade dos componentes. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes entre os mesmos componentes (epitélio Vs epitélio, lúmen vs lúmen e estroma Vs estroma).

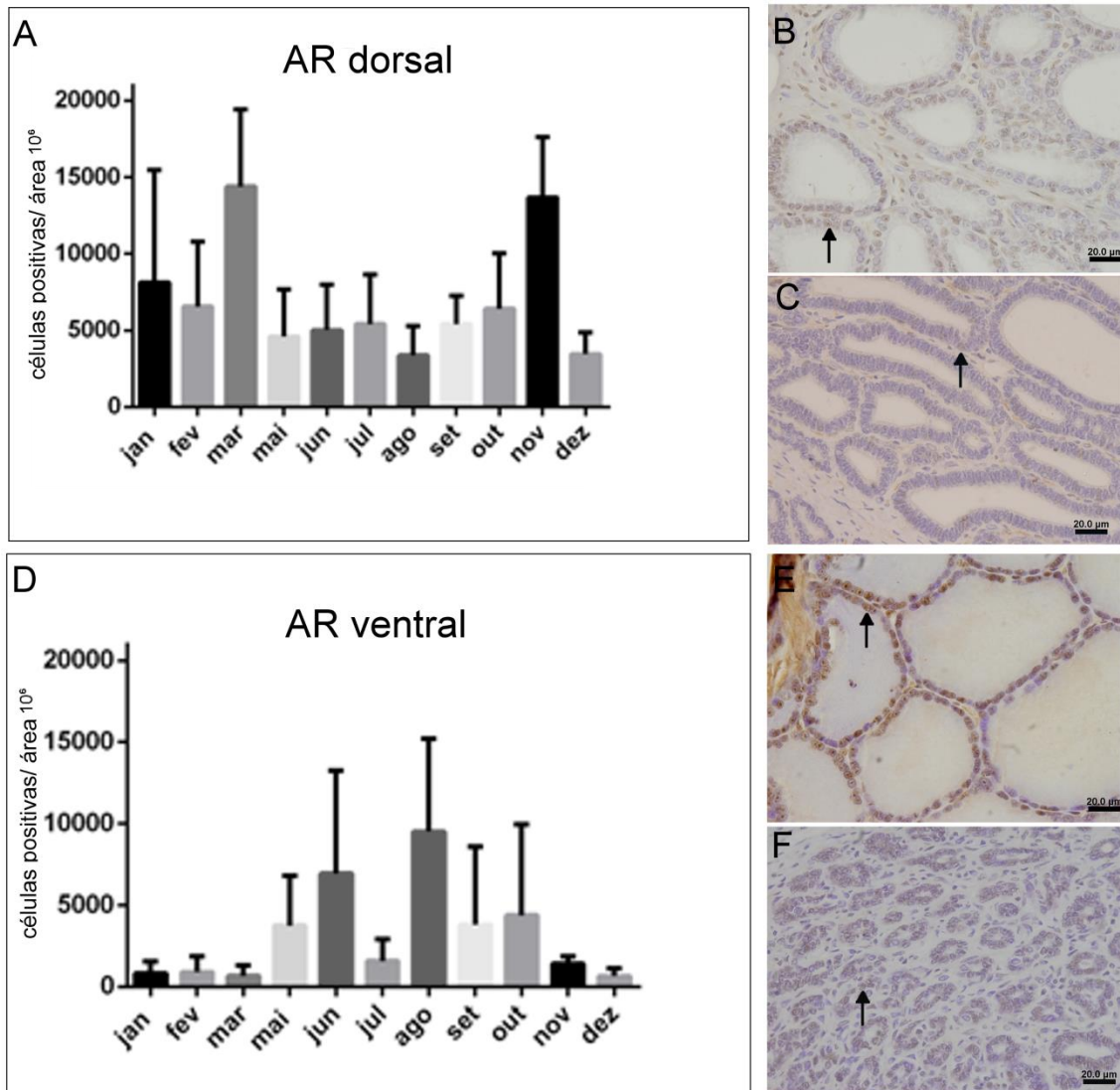


Figura 06. Índice mensal da expressão de AR nas regiões dorsal e ventral da próstata (A e D) de *Molossus molossus*. B e E fotomicrografias mostrando período com alta expressão de AR na região B: dorsal e E: ventral. C e F fotomicrografias mostrando período com baixa expressão de AR na região C: dorsal e F: ventral. As setas mostram marcações em todas as imagens.

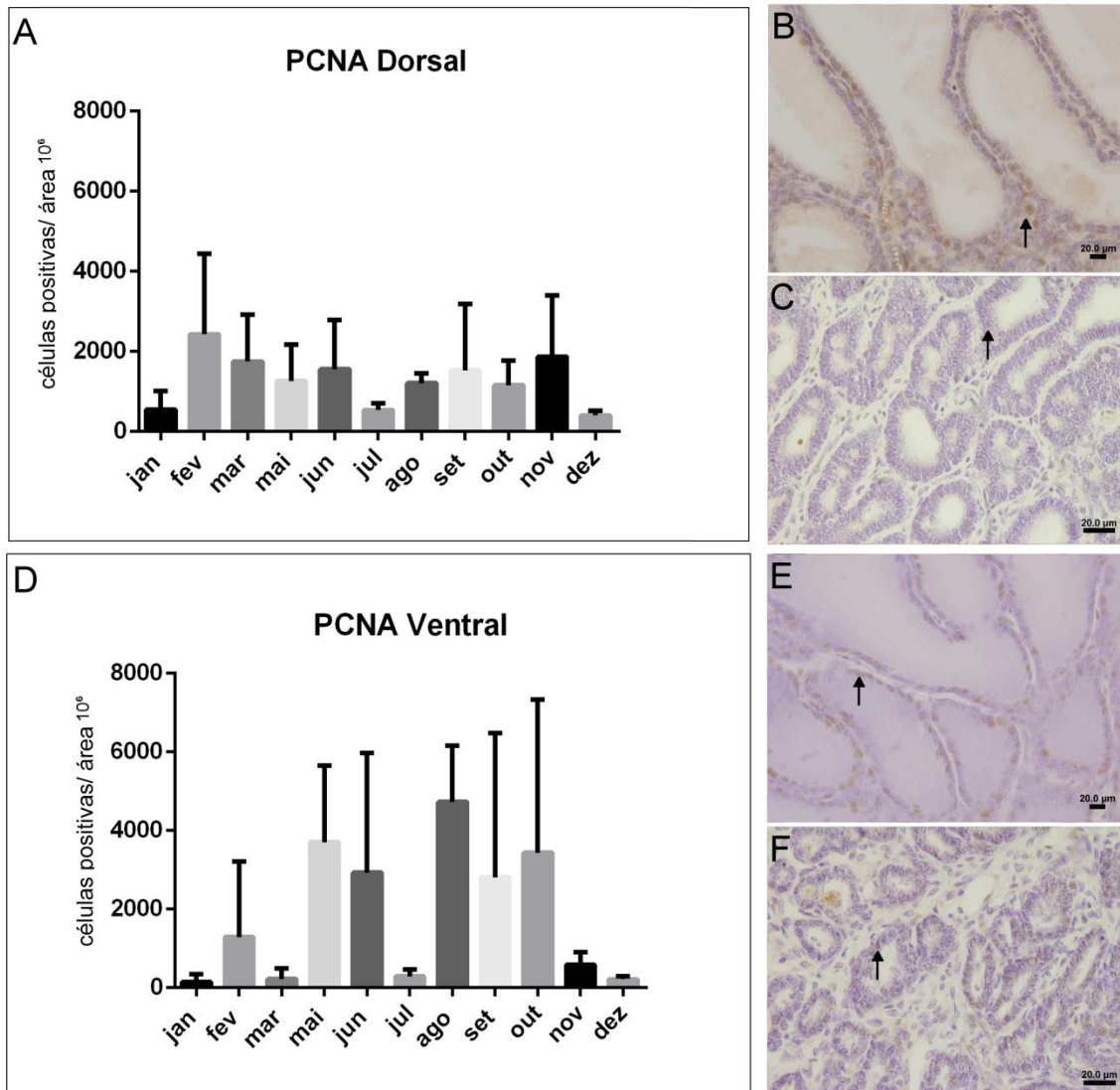


Figura 7. Índice mensal da proliferação celular nas regiões dorsal e ventral da próstata de *Molossus molossus* (A e D). B e E fotomicrografias mostrando período com alta proliferação celular na região B: dorsal e E: ventral. C e F fotomicrografias mostrando período com baixa proliferação celular na região C: dorsal e F: ventral. As setas mostram marcações em todas as imagens.

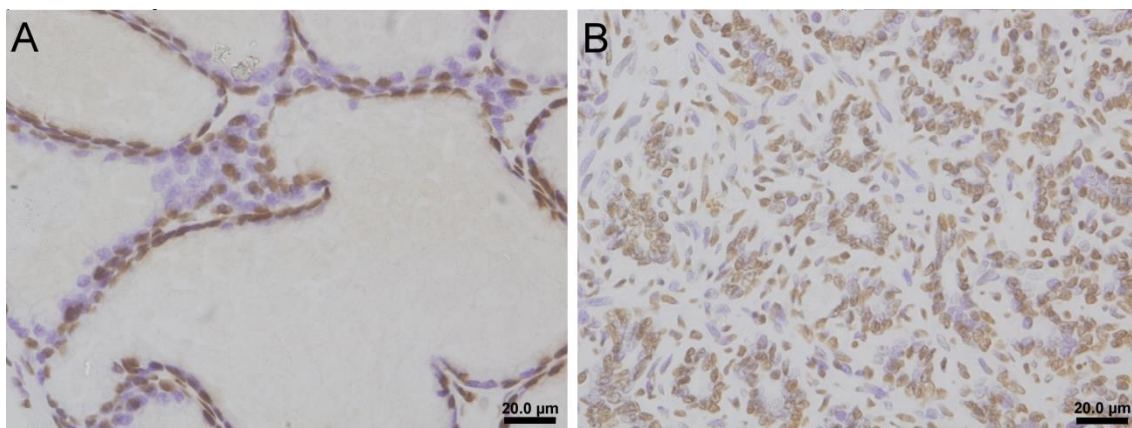


Figura 8. Fotomicrografias da próstata ventral de *Molossus molossus* mostrando o padrão das imuno-marcações de TÚNEL em período de alta (A) e baixa atividade (B) prostática. As imagens evidenciam a alta reatividade da glândula ao marcador.

VI.CAPÍTULO 3

Histomorphology of the glans penis in Vespertilionidae and Phyllostomidae species (Chiroptera, Mammalia).

Histomorphology of the glans penis in Vespertilionidae and Phyllostomidae species (Chiroptera, Mammalia)

Manuela T. Comelis^a, Fernanda C. Jubilato^a, Larissa M. Bueno^a, Sebastião R. Taboga^b, Rejane M. Góes^b, Eliana Morielle-Versute^a

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

²Department of Biology, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (IBILCE), Campus São José do Rio Preto, São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil

* Correspondence: Eliana Morielle-Versute, Department of Zoology and Botany, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (IBILCE), Campus São José do Rio Preto, São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil, email: eliana.morielle-versute@unesp.br

Key words: Glans penis; baculum; bat; male reproductive tract, Vespertilionidae, Phyllostomidae

Research Highlights

Histomorphology of the penis in phyllostomid and vespertilionid species show differences in the prepuce like erectile tissue surrounded by a tunica albuginea

and muscle bundles. Bacular differences between vespertilionid species were also observed.

ABSTRACT

Histomorphological studies of copulatory organs of bats are necessary to understand the successful reproductive strategies that they exhibit. Phyllostomidae and Vespertilionidae are the biggest families of Chiroptera and therefore, the studies on its characteristics to assist the recognition of the species are still needful. Studies were performed in thirteen adult male specimens representing species of vespertilionid and phyllostomid bats. Both families have the basic pattern of the vascular penis of mammals presenting the hydrostatic elements, the corpora cavernosa, the corpus spongiosum of the urethra, as well as the accessory cavernous tissue. Variation in the position and amounts of the tissues were also observed in the families. Vespertilionid bats have small glans penis, plenty of accessory cavernous tissue on the prepuce and a quite variable baculum. It varied in size and morphology, even among congeneric species, like the three *Lasiurus* species and in the two *Myotis* species. In the phyllostomid species no baculum were found and, we noticed that other vascular structures arise in order to optimize penile stiffening, with emphasis on the glans. We also observed some variation in the histological constitution of the phyllostomid prepuce: *Artibeus* species have an accessorie cavernous tissue surrounded by a tunica albuginea, *Carollia perpicillata* has two bundles of striated musculature and some adipose tissue and plenty of pigments were present in the prepuce of almost all species. For the first time, these features were observed in bats.

1. INTRODUCTION

Male and female reproductive tracts are thought to co-evolve and copulatory behavior, physiology and morphology all have the potential to influence sexual selection on genital traits (Eberhard, 1985, 2009; Birkhead & Olbrich, 1995; Presgraves, Baker & Wilkinson, 1999; Hosken & Stockley, 2004; Cordoba-Aguilar, 2005; Minder, Hosken & Ward, 2005; Beese, Beier, & Baur, 2006; Brennan et al., 2007; Ramm, 2007; Schulte-Hostedde, Bowman, & Middel, 2011; Simmons & Firman, 2014). As male genitalia is argued to be subject to more rapid divergent evolution than any other form in the animal kingdom, most of the investigations have analyzed the morphology of male intromittent organs under different approaches, such as gross morphology (Hooper & Musser, 1964; Long, 1969; Ryan, 1991 a,b; Comelis, Bueno, Góes, Taboga, & Morielle-Versute, 2018), histology (Ryan, 1991a,b; Herdina, Herzig-Straschil, Hilgers, Metscher, Plenk Jr., 2010; Comelis, Bueno, Góes, & Morielle-Versute, 2015, Comelis et al., 2018), 3D reconstruction (Herdina et al., 2014, 2015a,b; Comelis et al., 2015), and genetic basis of size and shape divergence (Schultz et al., 2016).

In mammals, the greatest morphological variations occur at the distal end of the male copulatory organ – the glans that has species-specific morphology (Zug, 1966; Webb et al., 1984; Hosken & Stockley, 2004; Ramm, 2007; Ziegler & Olbort, 2007; Comelis et al., 2015, 2018). Contributing to this great variation in penile morphology in mammals is the baculum, or penis bone, that has been described as ‘the most diverse of all bones’ varying in length, width and shape across Mammalia (Burt, 1960; Romer, 1970).

Although in almost all mammals there is a mechanical interaction between the genitals of both sexes during copulation, the baculum is not uniformly present across mammals. It was identified only in seven mammalian orders, Afrosoricida, Carnivora, Chiroptera, Erinaceomorpha, Primates,

Soricomorpha, and Rodentia, but it is not present in all species (Patterson & Thaeler, 1982; Hosken et al., 2001; Larivière & Ferguson, 2002; Ramm, 2007).

The function of the baculum in these species is still uncertain, but it was admitted that it could facilitate sperm transfer to inside of female tract, stimulate the cervix, inducing ovulation, protecting the opening of the urethra, and forming a functional unit with the corpus cavernosum providing stiffness to the glans (Long & Frank, 1968; Dixson, 1987, 1995; Patterson & Thaeler, 1982; Larivière & Ferguson, 2002; Herdina et al., 2015).

The histological characterization of the penile constitution, especially in glans, has been able to determine not only the origin and development of the baculum, but also the specific mechanical functions of the os penis in bats, as well as provide evidences of penile tissue organization in its absence (Glucksmann, Ooka-Souda, Miura-Yasug, Mizuno, 1976; Smith & Madkour, 1980; Murakami & Mizuno, 1986; Kelly, 2000; Herdina et al., 2015; Comelis et al., 2018).

Genital or penile features have proved useful phylogenetic characters, although it is not possible to recognize in different animal groups, at what level among taxa that it should be expected to resolve. However its use, especially the bacular morphology in association with other morphological characters has made possible to differentiate genera and even species of Carnivora (Burt, 1960; Long & Frank, 1968; Long, 1969; Baryshnikov, Olaf & Bininda-Emonds, 2003), Rodentia (Larivière & Ferguson, 2002; Ramm, 2007; Stockley et al., 2013), Primates (Perkin, 2007; Fooden, 2006) and Chiroptera (Benda & Tsytulina, 2000; Cotterill, 2002; Herdina et al., 2014; Reardon et al., 2014; Gregorin & Cirranello, 2016).

Phyllostomidae and Vespertilionidae are the biggest families of Chiroptera (Simmons, 2005; Gardner & Handley Jr, 2007) and therefore, the studies on its characteristics to assist the recognition of the species are still needful. The baculum, that has already been identified in several vespertilionid

species, was important in the recognition of some species (Hosken, Jones, Chipperfield & Dixon, 2001; Parnaby, 2009; Benda & Gvoždík, 2010; Volleth et al., 2015).

However, unlike these, the baculum does not occur in the species of phyllostomid analyzed (Brown, Genoways & Jones et al., 1971; Hosken et al., 2001; Kruttsch & Nellis, 2006). This is attributed to the probable loss of the baculum in these species (Smith & Madkour, 1980). In species in which the baculum is very small or absent the success of copulatory events are due to penile tissues themselves, as well as the vascular mechanisms and specializations, like folds and spines, which may be present on the external surface of the glans (Baur, 1998; Dixon, 2018; Comelis et al., 2018).

In two recent approaches, our research group was able to describe the glans and baculum histomorphology in one vespertilionid and eleven molossid species (Comelis et al., 2015, 2018). We have continued to study the histomorphological traits of the penis and bacula, not only for their value in bat species discrimination, but also for determining variations in penile tissue organization which may be related to the presence or absence of the baculum in glans, as well as to the different reproductive specializations of bat species.

The aim of the present study was to characterize histomorphologically the glans penis of six vespertilionid and seven phyllostomid bat species and identify and describe the (micro) morphology of the baculum of vespertilionid species.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Specimens

The specimens analyzed at the present study are represented by animals preserved in alcohol (at Chiroptera Collection of São Paulo State

University -DZSJRP) and/or captured in situ (alive) 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, License Number: 21707-1; Sisbio: 59765825-13/04/2010). The study proposal was approved by the Institutional Ethics Committee for Animal Experimentation (Document: Protocols. 013/2009 and 102/2014 CEEA/IBILCE-UNESP). Vouchers are deposited in the Chiroptera collection (DZSJRP-UNESP).

Studies were performed in eighty-six adult male specimens representing thirteen species of three vespertilionid: *Histiotus velatus* (L. Geoffroy, 1824), *Lasiurus blossevillii* (Lesson & Garnot, 1826), *Lasiurus cinereus* (Palisot de Beauvois, 1796), *Lasiurus ega* (Gervais, 1856), *Myotis albescens* (E. Geoffroy, 1806) and *Myotis nigricans* (Schinz, 1821), and six phyllostomid genera: *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818), *Artibeus planirostris* Spix, 1823, *Carollia perspicillata* (Linnaeus, 1758), *Glossophaga soricina* (Pallas, 1766), *Phyllostomus discolor* Wagner, 1843, *Platyrrhinus lineatus* (E. Geoffroy, 1810) and *Sturnira lilium* (E. Geoffroy, 1810). The numbers of specimens analyzed in each procedure are discriminated in Table 1. Bats were aged as adults based on body weight, complete ossification of the metacarpal-phalangeal epiphyses, and degree of tooth wear (De Knecht, Silva & Moreira et al., 2005).

2.2. Animal processing for baculum visualization (morphology) and histological analysis

Penises of preserved specimens were diaphonized. After removal by incision proximally to the ischial attachment of the penis, they were 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 penises were transferred to a staining solution of 5% Alizarin Red (Taylor, 1967) for 2 hours to identify bone

structure (baculum). Diaphonized penises were analyzed under a Leica MZ 16 stereomicroscope equipped with a Leica DFC 295 digital camera and capture and image analysis software (Leica Application Suite–LAS, Version 3.8). After documentation, the length of the glans penises was measured and then dissected to isolate the baculum. The baculum was then photographed, and length (from base to apex) measurements were recorded.

Fresh animals were killed by cervical dislocation, and penises were removed by dissecting proximally to the ischial attachment of the penis. Next, specimens were fixed in buffered paraformaldehyde fixative solution at room temperature for 48 hours, dehydrated in a series of ethanol (50 to 100%), clarified in xylene, embedded in paraffin and sectioned (5 μ m) in a Leica RM 2155 microtome. Hematoxylin-eosin staining was used for general characterization of the penises and to distinguish cell types. Masson Tushmann's blue was used to highlight collagen and smooth muscle. Microscopic analyses were performed 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).

Descriptions and orientation of the baculum in the glans refer to a flaccid and cranially directed organ from a ventral urethral perspective. To compare results with published data for other bat species, we adopted the terminology suggested by Hooper (1958) and Smith and Madkour (1980) to identify the glans, which state that the glans in Chiroptera is that part of the penis distal to the glans-prepuce junction.

3. RESULTS

3.1 Vespertilionidae taxa

3.1.1 Glans and baculum morphology

The penis of the analyzed species is semi-pendulous, reaching a cylindrical form and caudally directed. In the six analyzed species, the penis consisted of two parts, the body that carries the most pendulous portion of the penis, and the glans, that is the distal portion following the glans-prepuce junction. A boundary between the glans and the penis body is not easily visible. Both are covered by the prepuce, a sheath of hair-covered tissue that covers the entire outer surface of the penis, including the glans when the penis is flaccid. Gross morphology of the glans is similar in the six species, it is small (0.66mm to 1.14mm) with subconical morphology, i.e, the base is wider than the apex (distal end), and the surface is smooth and has no epidermal projections (Figure 1). The urinary meatus occurs in the ventral region. A quite variable baculum in morphology and size was observed inside the glans of all species.

Genus *Histiotus* (Gervais, 1856)

The *H. velatus* baculum had an average length of 1.03 mm. With a triangular morphology, it was broad basally and rounded at the distal end. Its base had two distinct lobes that unite as they project to the distal region, giving rise to a unique structure, a rounded axis that becomes thinner as it reaches the tip. This axis constituted 2/3 of the total length of the baculum. Its morphology resembled an inverted Y. The base and tip bows slightly upwards. In lateral view, there was a slight concavity in the ventral surface that begins in the base and ends in half of the bone (Figure 1A-C).

Genus *Lasiurus* (Gray, 1831)

L. blossevillii

The average length of *L. blossevillii* baculum was 0.78 mm. Its morphology is complex, which makes difficult its description. The dorsal region is concave, which causes the elevation of the extremities (proximal and distal) in the axis of its length. The base is wider and projected forward by its elevation, reaching a greater height and tilting it slightly over the main axis. The dorsal sides of the base are concave and connect to the main axis forming two narrow lateral flanges. They extend throughout the length of the bone, which has a deep central concavity, except at the tip of the baculum, where the flanges merge constituting an ascending protuberance, dorsally elevated, but not as high as the base. (Figure 1D-F).

Lasiurus cinereus

The baculum of this species had an average of 0.72 mm. Although it is similar to the *L. blossevillii* baculum, it is more robust and rounded. The baculum is bowed ventrally, like a comma; the base and the tip have the same proportions. Dorsally observed the bone is prominently concave, with both extremities (proximal and distal) facing the dorsal region of the penis, the tip being slightly higher. Ventrally it is traversed by a groove that closes before the end of the bone. (Figure 1G-I).

Lasiurus ega

The penile bone of this species is the largest in length, averaging 1.14 mm. It is distinguished from the others because of its broad base and the narrow rounded distal end. The base consists of two broad lateral flanges that narrow abruptly, approximately at half of the baculum length, forming a single rounded axis, extremely thin, and slightly elevated in the dorsal region. There is a concavity in the ventral region that begins between the broad flanges of the base and ends when the flanges narrow on the distal end (Figure 1J-L).

Genus *Myotis* (Kaup, 1829)

M. albescentis

With an average size of 0.85 mm, the *M. albescentis* baculum has the proximal region wider than the distal and consists of two rounded lobes. Ventrally it is markedly concave. This concavity starts from below the proximal lobes and extending throughout the length and width of the bone. From the base to the apical end, the bone gradually narrows, which gives it the triangular morphology resembling an arrowhead. Both, the base and the distal end are slightly elevated (Figure 1M-O).

M. nigricans

The *M. nigricans* baculum had an average size of 0.66 mm. Slightly similar to *M. albescentis*' baculum, it also had a triangular shape. The base is formed by two undeveloped lobes that narrow to form a single axis, narrower than the base, and which extends about 2/3 of the total length. In the ventral region, the bone is very concave, while in the dorsal region it is subtly convex up to half the length. In lateral view, a dorsal projection is seen in the central region of the base, which extends to the middle portion of the bone length. The distal end of the single axis curve projecting toward the dorsal region of the penis (Figure 1P-R).

3.1.2 Internal penile morphology

Penises of the six analyzed species were a vascular type and had in its constitution three erectile tissues, the corpora cavernosa and the corpus spongiosum with its respective tunic albuginea, and the accessory cavernous body. The glans of all the species were surrounded by a thick, vascularized and retractile prepuce and were constituted entirely by the accessory cavernous tissue. Few pigmentary cells and a thin layer of keratin were found in both

prepuce epithelium (internal and external) and glans penis epithelium of all the species. No adipose cells were observed in the glans of any species. Despite the similarities, organization and the presence of these tissues varied among species.

The *H. velatus* penis had a thin, slightly glandular prepuce in the base, and a thick, highly vascularized and glandular prepuce in the glans region (Figure 2A-C). Constituting the bulk of the penis body were two corpora cavernosa dorsolaterally arranged, separated by a septum and surrounded by a thick tunica albuginea. They were observed from the base of the penis to the beginning of the glans. The corpus spongiosum was well developed and appears surrounding the urethra that is positioned ventrally, until its exteriorization in the urinary meatus. The corpus spongiosum tunica albuginea is thinner than that of the corpora cavernosa (Figure 2A and B). The accessory cavernous tissue was observed from the median region of the penile body, forming two latero-dorsal tissue masses, which unify in the most apical portion of the glans (Figure 2B). The baculum was dorsal to the urethra, and half of it was found in the penis body and half in the glans (Fig. 2C). The complex morphology of the baculum could be verified in the histological sections, those also identified the presence of a broad medullary canal, occupying the bulk of the baculum's interior (Figure 2 C-G).

The analysis of *Lasiurus* species penis identified similarities as well as some differences between them. The prepuce features were shared by the three species, it was thinner and less glandular in the proximal region of the penis, becoming thicker, more glandular and more vascularized as it protrudes into the distal region (glans). Only in *L. ega* was observed adipose tissue in the prepuce (Figures 3 and 4).

In *L. blossevilli* the penis was constituted by only one well-developed corpora cavernosa, which was dorso-medial disposed throughout its length and was surrounded by a thick tunica albuginea (Figure 3A-C). Different from this, in

L. cinereus and *L. ega* the penis presented in the most proximal region, two cavernous bodies separated by a septum and located in the dorsum-laterally region of the penis. As they extend towards the distal region, they merge into a single tissue (Figure 4 A-E). Like *L. blossevilli*, the corpora cavernosa of *L. cinereus* and *L. ega* were surrounded by a thick tunica albuginea. The corpus spongiosum was relatively well developed in the three species and surrounds the urethra until its exteriorization (Figures 3 and 4).

The accessory cavernous tissue was present in all three species and appears from the median region of the penis body. However, it was more lateral in *L. blossevilli* and *L. cinereus*, and more dorsal in *L. ega* (Figures 3 and 4). The baculum had an essentially bony constitution, it was observed on the glans of all analyzed specimens and was located dorsally to the urethra (Figures 3B-G and 4E-G). It appeared surrounded by remnants of tunica albuginea and periosteum. In *L. blossevilli* a medullary canal was observed constituting the bulk of the baculum (Figure 3 D). In the other species, no medullary canal was observed inside the baculum (Figures 4 E-F). The histological sections images reinforce the morphological descriptions.

The two *Myotis* species analyzed also showed some differences in the constitution and arrangement of the tissues in the penis. These differences are especially represented by the variation in the number of corpora cavernosa (Figures 5 and 6).

The *M. albens*' prepuce showed the same characteristics observed in the previous species, that was, it was thin and glandular when more proximal, becoming thicker, glandular and vacularized as it approaches the distal region of the penis. The *M. nigricans*' prepuce was thick and highly vascularized from the most basal region, containing a large amount of accessory cavernous tissue (Figures 5 and 6).

In *M. albens* the penis consisted of a single corpora cavernosa, which was disposed in the dorsal medial region, up to the beginning of the glans and,

similar to the other species, was surrounded by a thick tunica albuginea (Figure 5A). Unlike this, the *M. nigricans*' penis presented three corpora cavernosa easily identified in the proximal region of the penis, which, as extending to the distal region merge yielding a single corpora cavernosa. The corpora cavernosa were surrounded by a thick tunica albuginea (Figure 6A-B). The urethra, ventrally positioned, was surrounded by the corpus spongiosum, which was poorly developed in both species, and surrounded by its thin tunica albuginea (Figure 6A-E).

In *M. albescens* the accessory cavernous tissue appeared in two masses dorsolaterally arranged, from the basal region of the penis and remained until the most distal region, being the only erectile tissue present in the glans. In *M. nigricans* the accessory cavernous tissue was more developed and broad, being disposed around the corpora cavernosa in the most basal part of the penis body, occupying the entire dorsal and lateral region, reaching the glans in its most distal portion (Figures 5B-D and 6A-F).

The baculum, present in both species, was dorsal to the urethra and in *M. nigricans* presented medullary canal (Figure 6D-F). In both species, it was surrounded by tunica albuginea and periosteum. In *M. nigricans* chondrocytes were observed near the baculum, reinforcing its endochondral origin (Figure 6E-F). Also for these species, the histological images reinforce the morphological descriptions.

3. 2. Phyllostomidae taxa

3.2.1 Glans morphology

Similar to the vespertilionid species, the phyllostomid taxa analyzed had a pendulous penis. However, the glans was easily identified and its morphology was variable among species. Despite presenting overall a keratin layer on the

glans, similar to observed in vespertilionid taxa, there was no formation of epidermal projections. No baculum was detected inside of the glans.

Genus Artibeus (Leach, 1821)

A. lituratus and *A. planirostris* glans were very similar, presenting a globose shape (2.6 mm and 3.0 mm length respectively). The surface has grooves in its entire length, which gives it a wrinkled appearance, similar to elephant skin. In dorsal view, it was possible to observe two lateral folds that compress the glans forming a more central globular portion. These folds were more prominent in *A. planirostris* than in *A. lituratus*. The glans was bent towards the ventral surface, where the urinary meatus was found (Figure 7A-B).

Genus Platyrrhinus (Saussure, 1860)

In *P. lineatus* the glans (which is about 1.6 mm), had a cylindrical shape with a rounded apical end. There was no variation in the morphology between the dorsal and ventral regions, except for the urinary meatus present in the ventral region, which has a U-shaped. The surface of the glans is slightly wrinkled (Figure 7C-D).

Genus Sturnira (Gray, 1842)

The differentiated morphology of *S. lilium*'s glans makes it difficult to determine its size and its description. When observed dorsally it was high and Y-shaped, extending to the ventral region, where it presented a rounded shape. In the glans apical portion, the urinary meatus begins, which extended from the dorsal to the ventral surface (Figure 7E-F).

Genus Carollia (Gray, 1838)

C. perspicillata's glans had about 1.8 mm in length. It had a cylindrical shape, with a rounded apical end. There was no variation in morphology

between dorsal and ventral surfaces, except for the urinary meatus, found in the ventral region. The urinary meatus is a U-shaped rectilinear groove. The glans was slightly wrinkled in both regions (Figure 7G-H).

Genus *Glossophaga* (E. Geoffroy, 1818)

The *G. soricina* glans had an average length of 1.74 mm. Its surface presented some folds and there was practically no morphological variation in the dorsal and ventral regions. In the ventral surface, there was a well-marked groove in the mid-apical region, the U-shaped urinary meatus (Figure 7I-J).

Genus *Phyllostomus* (Lacépède, 1799)

The *P. discolor*' glans had 1.6 mm in length, having a cylindrical shape, slightly tapered towards the rounded apex. Its morphology was very similar to that of *C. perpicilatta* and *P. lineatus*. As observed in these species, there was no morphological variation between the dorsal and ventral surfaces, except for the U-shaped urinary meatus, present in the mid-apical region of the ventral surface. The surface was generally slightly wrinkled (Figure 7K-L).

3.2.2. Internal penile morphology

The penis of the phyllostomid specimens analyzed had the basic pattern of the vascular penis of mammals presenting as hydrostatic elements, the corpora cavernosa, the corpus spongiosum of the urethra, as well as the accessory cavernous tissue.

The pattern of tissue organization in the penis of *A. lituratus* and *A. planirostris* was similar. The corpora cavernosa extended from the base of the penis to more apical portions of the glans. They were divided by a variable number of tunica albuginea septa into more basal portions and no septa in more apical regions where they were fused into a single structure. It is a well-developed tissue, constituting most of the glans dorsal region. The accessory

cavernous tissue began in intermediate portions of the penis, in the ventral region. With the separation of the prepuce and the beginning of the glans, part of this tissue was held in the prepuce, and part was maintained in the glans ventrolateral regions. Both, cavernous and accessory cavernous tissue, were composing the most apical portions of the glans. The corpus spongiosum was more developed in basal than apical regions but was generally poorly developed (Figure 8).

It was identified in the ventral region of these two species prepuce, another type of erectile tissue, another type of erectile tissue, as confirmed by Tushmmans's blue trichrome staining, hitherto referred in Chiroptera. Similar to the traditional erectile bodies, this tissue was totally surrounded by a tunic albuginea, despite the differentiated location. The prepuce was thicker ventrally, in the region of this erectile tissue localization, and exhibited many pigmentary and adipose cells. The glans epithelium also had several pigmentary cells (Figure 8).

In *P. lineatus* the prepuce was thin, retractile and glandular; with pigmentary cells and keratin in both epithelia. The glans epithelium had pigmentation and a thin layer of keratin. Three corpora cavernosa were observed divided by two septa of the tunica albuginea most of the body and glans length, and only a copora cavernosa in more apical portions of the glans. The corpus spongiosum was relatively well developed and its tunic was thicker than that of the corpora cavernosa. The accessory cavernous tissue appeared in small quantities mainly filling the sides of the glans (Figure 9A-B).

The *S. liliun* penis has a thin, glandular prepuce. The penis body consisted of three corpora cavernosa. These were divided by two septa of the tunica albuginea into more basal portions of the penis body. The corpus spongiosum was well developed and around it lied the accessory cavernous tissue. The accessory cavernous tissue was the main vascular tissue present in the glans, and only in the basal portions of the glans, there were corpus

spongiosum and corpus cavernosum. The corpus spongiosum, similar to that observed in *P. lineatus*, was more developed in basal than apical regions, being generally underdeveloped. The glans epithelium was also well pigmented, presenting several pigmentary cells. Some adipose cells can be found in the corpus cavernosum (Figure 9C-D).

In *C. perspicillata* the prepuce was very thick and highly glandular, presenting a large amount of adipose tissue. In its outer epithelium, it had several pigmentary cells. In the dorsal region of the prepuce, there were two well-developed bundles of striated muscles, not observed in the previous species. These muscle bundles were seen from the most basal portions of the prepuce in the region of the penis body to final intermediate portions of the glans (Figure 10A-B).

The glans epithelium had a layer of keratin and few pigmentary cells. In more basal portions of the penis the corpora cavernosa was divided in two, and in more apical portions of the body and in the glans these bodies merge into a single dorsal corpora cavernosa. The corpus spongiosum was poorly developed in all regions of the penis. The accessory cavernous tissue appeared only in the glans sides (Figure 10A-B).

In the species *G. soricina* the prepuce was thin, glandular and retractile, with plenty of adipose tissue and a small amount of striated musculature. The corpora cavernosa were dorsally located. It was divided into three into more basal regions of the body, while in the glans it appeared as a single structure, containing fat cells in its interior. The accessory cavernous tissue appeared aplenty filling most of the glans, mainly in the lateroventral regions. At some points, it was difficult to distinguish it from the corpus spongiosum, which was poorly developed. The trabeculae in the accessory cavernous tissue of *G. soricina* were more evident than in any of the other species. The epithelium of the glans had a thin layer of keratin and plenty of pigment cells. The cavernous

body and accessory cavernous tissue were found in more apical portions of the glans, after exteriorization of the urethra by the urinary meatus (Figure 10C-D).

P. discolor had a thin, resectile prepuce, with a thin layer of keratin in both esphitelium. There was a higher concentration of pigmentary cells in the external epithelium. The glans also presented keratin in the epithelium, with many pigment cells. The corpora cavernosa was divided by a septum of the tunica albuginea for almost the entire length of the body and the glans, and presented, as in *G. soricina*, many adipose cells in its interior. The corpus spongiosum was poorly developed throughout the penis. The accessory cavernous tissue, which appeared in small quantity, was concentrated to two lateral masses of the glans, not being observed in the penis body. The accessory tissue makes up almost the entire glans after the urinary meatus (Figure 10E-F).

4. DISCUSSION

Studies on bats copulatory structures are relatively scarce when considering a large number of taxa (1300 species) that make up the order Chiroptera. This order is notorious for its diversity of forms, habits, ecological and reproductive specializations, all adapted for the flight and wide geographical distribution (Fenton, 1992; Nowak, 1999; Simmons, 2005). Although the families Vespertilionidae and Phyllostomidae are the two largest in number of species within the order, few studies have evaluated them from a histomorphological perspective, with emphasis on the reproductive structures of males (Wimsatt & Kallen, 1952; Brown et al., 1971; Hosken et al., 2001; Benda, Hanák, & Veith, 2004; Herdina et al., 2010, 2014).

With some variations in their constitution, the penises of the thirteen vespertilionid and fillostomid species analyzed presented the basic pattern of the

mammals' vascular penis, characterized by the presence of the corpora cavernosa and the corpus spongiosum, surrounded by their tunica albuginea. The urethra was ventrally located in all species, the corpora cavernosa were dorsal or dorsolateral, and the baculum, present only in vespertilionid species, was always dorsal in relation to the urethra. The accessory cavernous tissue, present in all species varied in quantity and location. In general, the glans of the fillostomids analyzed had much more pigment and keratin in their epithelium and prepuce when compared to the glans of vespertilionids.

According to Hooper (1958) and Smith and Madkour (1980), the glans on bats is only the distal part of the penis after the glans-prepuce junction. Based on this definition Matthews (1937, 1941) described two general types of Microchiroptera glans: the first with small glans and thick and vascularized prepuce (vespertilionids and emballonurids) and the second with larger glans with complex structure and thin and retractile prepuce (molossids, rhinolophids, nycterids, and megadermatids).

Based on the definition and in the two types of glans described by Matthews (1937, 1941), we can state from the results of the present work that the six species of Vespertilionidae analyzed have a small, simple glans surrounded by thick and highly vascularized prepuce, fitting into the first type of glans described by the author. In the tiny glans was the baculum, which varied in morphology and size among species. These features were also observed in other vespertilionids taxa already analyzed as *Plecotus austriacus* (Herdina et al., 2010), *Eptesicus furinalis* (Comelis et al., 2015), *Pipistrellus nathusii* e *Pipistrellus pipistrellus* (Herdina et al., 2015).

In Phyllostomidae species, on the other hand, the glans presented proportionally to the penis, larger size than those observed in vespertilionids, little interspecific morphological variation, and, in general, thin and retractile prepuce. This condition for the prepuce is shared with the species of molossids already analyzed. However, phyllostomid species do not have ornamented

glands, with epidermal projections and complex morphology such as those found in molossid species (Ryan, 1991, a,b; Comelis et al., 2018), nor were seen a baculum in the glans interior. Therefore, in general, despite some discrepancies with the description, the glans of phyllostomids analyzed can be considered of the second type described by Matthews (1937, 1941).

Histological analysis revealed variation in the penis of the Vespertilionidae species analyzed. The corpora cavernosa varied in numbers from one to three, but in all specimens they were surrounded by a tunica albuginea. They are well developed along the entire length of the penis but merge into the median region of the penis in those species that have three (*M. nigricans*) and two (*H. velatus*, *L. cinereus*, and *L.ega*) corpora cavernosa. Despite the great development, they did not extend until the glans in the species.

In the six species, the corpus spongiosum was well developed, especially compared to that observed in Molossidae family bats (Ryan, 1991a, b; Comelis et al., 2018). The accessory cavernous tissue, present in the six species, was the main tissue constituting the glans of vespertilionid species, along with the baculum. The accessory cavernous tissue was also the largest constituent of the prepuce.

Literature data indicate that the absence or reduction of corpora cavernosa in the glans is a derived condition within the taxa, along with the reduction or absence of the baculum and a more developed corpus spongiosum, as found in the penis of humans (Smith & Mardkour, 1980; Ryan, 1991a, b). Although the features observed in the analyzed species attend these conditions, it is not possible to rely solely on this information to suggest that the condition in the species of vespertilionid analyzed is derived.

Among the Phyllostomidae species analyzed, *C. perspicillata* was the one with the thickest and glandular prepuce. This feature is similar to the condition found for the vespertilionids species here analyzed and in other

species of Chiroptera, from Vespertilionidae and Rhinolophidae families (Matthews, 1937; Herdina et al., 2010, 2014; Comelis et al., 2015). In addition to adipose tissue and pigment cells was identified in *C. perspicillata* prepuce two well-developed bundles of striated muscles, a characteristic hitherto reported for species of Chiroptera. This striated musculature present in the prepuce suggests that they may have some control of the structure, allowing some motility for the prepuce and penis, similar to what occurs in the human's penis (Knobil & Neill, 1999).

Striated muscle cells were also observed in the *G. soricina* prepuce, along with adipose tissue, although in a small amount. Among the vespertilionids analyzed only *L. ega* presented adipose tissue in its prepuce, but also in a small amount. Although it is a tissue with the function of damping and absorption of impacts, the presence of adipose tissue in the prepuce and corpora cavernosa seems to be uncommon in other species. (Rodriguez et al., 2017).

In *Artibeus*, the prepuce is thinner, similar to that found in the Molossidae family (Ryan, 1991 a, b; Comelis et al., 2018). However, it presented in the ventral region another mass of erectile tissue, which, unlike the accessory cavernous tissue present in the vespertilionids prepuce, is surrounded by its own tunica albuginea, similar to that of the traditional erectile tissues. There are no previous reports of the observation of such structure for Chiroptera.

The erectile nature of this tissue was confirmed by Tushman's blue trichrome staining, which allows the staining of collagen and smooth muscle cells. Although further studies are needed to determine the possible functions of this tissue we can, based on our previous studies (Comelis et al., 2015, 2018), in literature (Wimsatt & Kallen, 1952; Ryan, 1991 a,b) and our knowledge about the subject, infer that one of its possible functions is to make a coital locking, as described for the domestic dog (bulbus glandis) and for the thick prepuce of vespertilionid species (Wimsatt & Kallen, 1952; Evans & Christensen, 1979),

especially *H. velatus* and *M. nigricans* in the present work. The coital lock is a mechanism that prevents the male's penis to withdrawn the female's reproductive tract during the copulation.

As well as the corpora cavernosa, the accessory cavernous tissue is composed of loose connective tissue (trabeculae), and smooth muscle cells grouped into the vascular sinuses or lacunae. During the erection the blood fills the cavernous sinuses, stretching the tunic around and hardening the glans and prepuce in *Artibeus*. So, another possibility for this structure is to harden the prepuce.

Another noteworthy feature found in the glans of *P. discolor* and *G. soricina* is the presence of thicker trabeculae in the accessory cavernous tissue. The accessory cavernous tissue in these species is similar to that observed in the prepuce of the *Artibeus* species, but without the tunic, which may suggest a similar function.

In Chiroptera, the presence of epidermal projections or papillae on the glans is a shared characteristic among the majority molossid taxa for which there are registers (Ryan, 1991 a,b; Comelis et al., 2018). However, they are absent in most of the vespertilionid species (Herdina et al., 2010; Cryan et al., 2008, 2012; Comelis et al., 2015).

Epithelial spines are absent in both families, although phyllostomid species had a significantly higher keratin layer around the glans than those of the vespertilionids. Although these specializations are not present, a similar function to those indicated for epithelial projections can be attributed to the thick prepuce found in the vespertilionids, the erectile tissue present in *Artibeus* prepuce, the musculature in *C. perspicillata* and *G. soricina* prepuce and to the accessory cavernous tissue found in the species of both families (Sachs, Glater & ÓHanlon et al., 1984).

The baculum, absent in all specimens of Phyllostomidae and present in all Vespertilionidae specimens, varied in size and morphology, even among congeneric species, the three *Lasiurus* species and in the two *Myotis* species. Another variation present in the baculum was related to the presence of the medullary canal, which was observed in *H. velatus*, *L. blossevillei*, and *M. nigricans* glans and absent in the other species. The morphology of *H. velatus* and *L. ega* baculum had greater similarity to that of *Eptesicus furinalis* (Comelis et al., 2015), and those of other species shared similarities with species of the same genus or other vespertilionid genera, whose characteristics can be observed and described in Brown (1971) and Hill & Harrison (1987) publications. The baculum has also been considered an important structure for the success of copula in the species, since among its functions is the female stimulation during the copulation, to induce the ovulation or to prepare the uterus for the implantation (Patterson & Thaeler, 1982, Orr & Brennan, 2016; Comelis et al., 2018). Studies in Chiroptera suggest that the baculum protects the urethra opening and forms a functional unit with the corpora cavernosa providing stiffness to the glans (Herdina et al., 2015; Comelis et al., 2018).

Dixson (1989) reported in primates a correlation between baculum size and periods of intrusion, wherein species with a smaller bacular size the copula usually occurred with one or several short intrusions, whereas for species with a larger bacular size the copulation occurred with prolonged intrusions or with continued copulation after ejaculation. Analyzes in non-feline carnivores and primates have revealed that the baculum tends to be larger and the genitalia more complex in species where females copulate with several males (Dixson, 1987; Verrell, 1992; Ferguson & Larivière, 2004).

Since the baculum is not present in all mammals, and not even in all individuals of the same species, despite numerous speculations about its existence and persistence, the baculum is still one of the puzzles of mammalian morphology (Larivière & Ferguson, 2002; Ramm, 2007; Stockley, 2012; Comelis et al., 2018).

In the results of the present study, what we have observed is that in the filostomid species where there is no baculum, other vascular structures arise in order to optimize penile stiffening, with emphasis on the glans. As an example, we can mention the tissue in the *Artibeus* prepuce, the presence of striated musculature in the species *C. perspicillata* and *G. soricina*, and also a greater amount of accessory cavernous tissue in the glans in general.

This feature was also observed in the molossid bats *Cynomops planirostris* and *Molossops temminckii*, where the absence of the baculum was supplied by the displacement of the traditional cavernous bodies and the increase of the accessory cavernous tissue in the glans (Comelis et al., 2018). In the species of Vespertilionidae, on the other hand, the highly vascular prepuce and the presence of the baculum in its diminutive glans provide all necessary stiffness to the glans.

As for the species of vespertilionids analyzed, the determination of the evolutionary condition of the penile characteristics of phyllostomid taxa was not possible, since the characteristics were contradictory. Although they do not have a baculum, a characteristic considered to be derived in the clade, they all present the well-developed corpora cavernosa in the penile glans, a characteristic considered basal for the group. The species of both families showed no epidermal projections covering the glans, a characteristic derived for the group. Thus, the penile features, although useful for the group taxonomy, should be evaluated together for an effective contribution, regarding the taxonomy of the group.

Little is known about genital evolution in Chiroptera and relatively few studies address the subject, making it difficult to understand the structures, their functions, and their taxonomic potential. Thus, studies such as the present are important for the glans penis and baculum characterization in the species, increasing the knowledge about the structures and facilitating their understanding. Therefore, we can conclude that further studies of the penile

glans are needed to ascertain the differentiated erectile tissue found in the species, as well as the function of these and of the musculature in *Carollia*'s prepuce.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Luiz Roberto Falleiros Junior for technical help. The scholarships awarded to Manuela Tosi Comelis by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP: 2012/24288-0 and 2015/06923-9). We are also grateful for the support by the Brazilian National Research and Development Council (CNPq) Processes: 300163/2008-8 and 301596/2011-5, for research fellowships to SRT and Processes: 302008/2010 and 301073/2013-9 to EMV; and the financial support from grants (2009/16181-9 and 2013/11859-2) from the São Paulo State Research Foundation (FAPESP).

5. REFERENCES

- Baryshnikov, G. F., Bininda-Emonds, O. R., & Abramov, A. V. (2003). Morphological variability and evolution of the baculum (os penis) in Mustelidae (Carnivora). *Journal of Mammalogy*, 84(2), 673-690.
- Baur, B., (1998). Sperm competition in molluscs. In: Sperm Competition and Sexual Selection (T. R. Birkhead & A. P. Møller, eds), pp. 255–305. Academic Press, London.
- Beese, K., Beier, K., & Baur, B. (2006). Coevolution of male and female reproductive traits in a simultaneously hermaphroditic land snail. *Journal of Evolutionary Biology*, 19(2), 410-418.
- Benda, P., & Tsulina, K. A. T. (2000). Taxonomic revision of *Myotis mystacinus* group (Mammalia: Chiroptera). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 64, 331-398.
- Benda, P., Kiefer, A., Hanák, V., & Veith, M. (2004). Systematic status of African populations of long-eared bats, genus *Plecotus* (Mammalia: Chiroptera). *Folia Zoologica*, 53 (Monogr 1), 47 pp.

- Benda, P., & Gvoždík, V. (2010). Taxonomy of the genus *Otonycteris* (Chiroptera: Vespertilionidae: Plecotini) as inferred from morphological and mtDNA data. *Acta Chiropterologica*, 12(1), 83-102.
- Birkhead, A., James, C.S., & Olbrich, B.W. (1995). Monitoring the bank storage dynamics component of the riparian water balance in the Sabie River, Kruger National Park. *Water SA*. Water S.A. 21. 211-220.
- Brennan, P. L., Prum, R. O., McCracken, K. G., Sorenson, M. D., Wilson, R. E., & Birkhead, T. R. (2007). Coevolution of male and female genital morphology in waterfowl. *PLoS one*, 2(5), e418.
- Brown, R.E., Genoways, H.H., Jones Jr., J.K., (1971). Bacula of some neotropical bats. *Mammalia*, 35, 456–464.
- Burt, W.H., (1960). Bacula of North American mammals: University of Michigan. *Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology*, 113, 1–75.
- Comelis, M. T., Bueno, L. M., Góes, R. M., & Morielle-Versute, E. (2015). Penile histomorphology of the neotropical bat *Eptesicus furinalis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 258, 92-98.
- Comelis, M. T., Bueno, L. M., Góes, R. M., Taboga, S. R., & Morielle-Versute, E. (2018). Morphological and histological characters of penile organization in eleven species of molossid bats. *Zoology*, 127, 70-83.
- Córdoba-Aguilar, A. (2005). Possible coevolution of male and female genital form and function in a calopterygid damselfly. *Journal of evolutionary biology*, 18(1), 132-137.
- 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(2), 165-179.
- Cryan, P. M. (2008). Mating behavior as a possible cause of bat fatalities at wind turbines. *The Journal of Wildlife Management*, 72(3), 845-849.
- Cryan, P. M., Jameson, J. W., Baerwald, E. F., Willis, C. K., Barclay, R. M., Snider, E. A., & Crichton, E. G. (2012). Evidence of late-summer mating readiness and early sexual maturation in migratory tree-roosting bats found dead at wind turbines. *PLoS One*, 7(10), e47586.
- De Knecht, L. V., Silva, J. A., Moreira, E. C., & Sales, G. L. (2005). Morcegos capturados no município de Belo Horizonte, 1999-2003. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57(5), 576-583.

- Dixson, A. F. (1987). Baculum length and copulatory behavior in primates. *American Journal of Primatology*, 13(1), 51-60.
- Dixson, A. F. (1989). Sexual selection, genital morphology, and copulatory behavior in male galagos. *International Journal of Primatology*, 10(1), 47.
- Dixson, A. F. (1995). Baculum length and copulatory behaviour in carnivores and pinnipeds (Grand Order Ferae). *Journal of Zoology*, 235(1), 67-76.
- Dixon, A., (2018). Reproduction in Mammals: the Female Perspective Quarterly Review of Biology, 93(3) p. 279.
- Eberhard, W.G., (1985). Sexual Selection and Animal Genitalia. Harvard University Press, Cambridge.
- Eberhard, W. G. (2010). Evolution of genitalia: theories, evidence, and new directions. *Genetica*, 138(1), 5-18.
- Evans, H. E., & Christensen, G. C. (1979). Miller's anatomy of the dog. Second ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1181 pp.
- Fenton, M. B., Acharya, L., Audet, D., Hickey, M. B. C., Merriman, C., Obrist, M. K., & Adkins, B. (1992). Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the Neotropics. *Biotropica*, 440-446.
- Fooden, J. (2006). Comparative review of fascicularis-group species of macaques (Primates: Macaca). *Fieldiana Zoology*, 1-43.
- Gardner, A. L., & Handley Jr, C. O. (2007). Genus *Lasiurus* Gray, 1831. *Mammals of South America*, 1, 457-468.
- Glucksmann, A., Ooka-Souda, S., Miura-Yasugi, 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. *Journal of Anatomy*, 121(Pt 2), 363.
- Gregorin, R., & Cirranello, A. (2016). Phylogeny of *Molossidae* Gervais (Mammalia: Chiroptera) inferred by morphological data. *Cladistics*, 32(1), 2-35.
- Lariviere, S., & Ferguson, S. H. (2002). On the evolution of the mammalian baculum: vaginal friction, prolonged intromission or induced ovulation? *Mammal Review*, 32(4), 283-294.
- Handley Jr., C.O., & A.R. Gardner. 2007. Genus *Histiotus* P. Gervais, 1856. In: (A.R. Gardner, ed.) *Mammals of South America*. Vol. 1. Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats. The University of Chicago Press, Chicago, IL. pp. 450 – 457.

- 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). *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 293(7), 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(1), 157-168.
- Herdina, A. N., Kelly, D. A., Jahelková, H., Lina, P. H., Horáček, I., & Metscher, B. D. (2015a). Testing hypotheses of bat baculum function with 3D models derived from microCT. *Journal of Anatomy*, 226(3), 229-235.
- Herdina, A. N., Plenk Jr, H., Benda, P., Lina, P. H., Herzig-Straschil, B., Hilgers, H., & Metscher, B. D. (2015b). Correlative 3D-imaging of *Pipistrellus* penis micromorphology: Validating quantitative microCT images with undecalcified serial ground section histomorphology. *Journal of Morphology*, 276(6), 695-706.
- Hooper, E.T. (1958). The male phallus in mice of the genus *Peromyscus*. Misc. Publ.Mus. Zool. Univ. Mich. 105, 1–40.
- Hooper, E. T., & Musser, G. G. (1964). The glans penis in Neotropical cricetines (family Muridae) with comments on classification of muroid rodents.
- Hosken, D. J., & Stockley, P. (2004). Sexual selection and genital evolution. *Trends in ecology & evolution*, 19(2), 87-93.
- Hosken, D. J., Minder, A. M., & Ward, P. I. (2005). Male genital allometry in Scathophagidae (Diptera). *Evolutionary Ecology*, 19(5), 501-515.
- Hosken, D., Jones, K., Chipperfield, K., & Dixon, A. (2001). Is the bat os penis sexually selected?. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 50(5), 450-460.
- Kelly, D. A. (2000). Anatomy of the baculum–corpus cavernosum interface in the Norway rat (*Rattus norvegicus*), and implications for force transfer during copulation. *Journal of Morphology*, 244(1), 69-77.
- Knobil and Neill., (1999). Physiology of reproduction, anatomy, vasculature, and innervation of the male reproductive tract. Volume 1, 3 ed. The prepuce. British Journal of Urology, Volume 83, Suppl. 1: Pages 34-44.
- Krutzsch, P. H., & Nellis, D. W. (2006). Reproductive anatomy and cyclicity of the male bat *Brachyphylla cavernarum* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Acta Chiropterologica*, 8(2), 497-507.

Lariviere, S., & Ferguson, S. H. (2002). On the evolution of the mammalian baculum: vaginal friction, prolonged intromission or induced ovulation? *Mammal Review*, 32(4), 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(1), 32-43.

Long, C.A., (1969). Gross morphology of the penis in seven species of the Mustelidae. *Mammalia* 33, 145–160.

Matthews, L. H. (1937). The Form of the Penis in the British Rhinolophid Bats, compared with that in some of the Vespertilionid Bats; and (2) The Female Sexual Cycle in the British Horse-shoe Bats, *Rhinolophus ferrum-equinum insulanus* Barrett-Hamilton and *R. hipposideros minutus* Montagu. *The Transactions of the Zoological Society of London*, 23(4), 213-223.

Matthews, L.H., 1941. 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. *Development*, 92(1), 133-143.

Nowak, R. M. (1999). Walker's mammals of the world. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland 6:253-470.

Parnaby, H. E. (2009). A taxonomic review of Australian Greater Long-eared Bats previously known as *Nyctophilus timoriensis* (Chiroptera: Vespertilionidae) and some associated taxa. *Australian Zoologist*, 35(1), 39-81.

Patterson, B. D., & Thaeler Jr, C. S. (1982). The mammalian baculum: hypotheses on the nature of bacular variability. *Journal of Mammalogy*, 63(1), 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: Official Journal of the American Society of Primatologists*, 69(1), 16-26.

Presgraves, D. C., Baker, R. H., & Wilkinson, G. S. (1999). Coevolution of sperm and female reproductive tract morphology in stalk-eyed flies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266(1423), 1041-1047.

Ramm, S. A. (2007). Sexual selection and genital evolution in mammals: a phylogenetic analysis of baculum length. *The American Naturalist*, 169(3), 360-369.

Reardon, T. B., McKenzie, N. L., Cooper, S. J. B., Appleton, B., Carthew, S., & Adams, M. (2014). A molecular and morphological investigation of species boundaries and

phylogenetic relationships in Australian free-tailed bats *Mormopterus* (Chiroptera: Molossidae). *Australian Journal of Zoology*, 62(2), 109-136.

Romer, A.S. (1970). *The Vertebrate Body*. W. B. Saunders, Philadelphia. Novel Histologic Finding: Adipose Tissue Is Prevalent Within Penile Tunica Albuginea and Corpora Cavernosa: An anatomic study of 63 specimens and considerations for cancer invasion.

Ryan, J. M. (1991b). Morphology of the glans penis in four genera of molossid bats (Chiroptera: Molossidae). *Journal of Mammalogy*, 72(4), 658-668.

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 the American Museum of Natural History*, 206, 122–137.

Sachs, B. D., Glater, G. B., & O'Hanlon, J. K. (1984). Morphology of the erect glans penis in rats under various gonadal hormone conditions. *The Anatomical Record*, 210(1), 45-52.

Schulte-Hostedde, A. I., Bowman, J., & Middel, K. R. (2011). Allometry of the baculum and sexual size dimorphism in American martens and fishers (Mammalia: Mustelidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 104(4), 955-963.

Schultz, N. G., Ingels, J., Hillhouse, A., Wardwell, K., Chang, P. L., Cheverud, J. M., & Dean, M. D. (2016). The genetic basis of baculum size and shape variation in mice. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(5), 1141-1151.

Simmons, L. W., & Firman, R. C. (2014). Experimental evidence for the evolution of the mammalian baculum by sexual selection. *Evolution*, 68(1), 276-283.

Simmons, N.B. (2005). Order Chiroptera. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*, 3rd edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 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 Press, Lubbock. pp. 347–365.

Stockley, P., Ramm, S. A., Sherborne, A. L., Thom, M. D., Paterson, S., & Hurst, J. L. (2013). Baculum morphology predicts reproductive success of male house mice under sexual selection. *BMC biology*, 11(1), 66.

Verrell, P.A., 1992. Primate penile morphologies and social systems: further evidence for an association. *Folia Primatologica*, 59, 114–120.

Volleth, M., Loidl, J., Mayer, F., Yong, H. S., Müller, S., & Heller, K. G. (2015). Surprising genetic diversity in *Rhinolophus luctus* (Chiroptera: Rhinolophidae) from Peninsular Malaysia: description of a new species based on genetic and morphological characters. *Acta Chiropterologica*, 17(1), 1-20.

Webb, P. W. (1984). Body form, locomotion and foraging in aquatic vertebrates. *American Zoologist*, 24(1), 107-120.

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.

Ziegler, T., & Olbort, S. (2007). Genital structures and sex identification in crocodiles. *Crocodile Specialist Group Newsletter*, 26(3), 16-17.

Zug, G. R. (1966). The penial morphology and the relationships of cryptodiran turtles. *Occasional papers of the Museum of Zoology, University of Michigan*, 647, 1-24.

Figure legends

Figure 1. Glans penis and baculum of vespertilionid species after the diaphonization. A-C: *Histiotus velatus*; D-F: *Lasiurus blossevillii*; G-I: *Lasiurus cinereus*; J-L: *Lasiurus ega*; M-O: *Myotis albescens*; P-R: *Myotis nigricans*. B, E, H, K, N and Q: dorsal view; C, F, I, L, O and R: lateral view. The baculum scale corresponds to 0.2mm.

Figure 2. Penile section of *Histiotus velatus* from de base (A) to the apice (C). D-G: histological details of the baculum. Abbreviations: p: prepuce, cc: corpora cavernosa, cs: corpus spongiosum, u: urethra, tca: accessory cavernous tissue, ta: tunica albuginea, arrow: baculum, arrow head; medullary canal.

Figure 3. Histological sections of *Lasiurus blossevillii* glans from the most basal region (A) to the most apical (C). D-G baculum details inside the glans. Abbreviations: p: prepuce, cc: corpora cavernosa, cs: corpus spongiosum, u: urethra, tca: accessory cavernous tissue, ta: tunica albuginea, arrow: baculum, asterisk: medullary canal.

Figure 4. Histological sections of A-B: *Lasiurus cinereus* and C-G: *Lasiurus ega* glans; from the basal to the more apical portion. F and G: details of baculum inside the glans.

Abbreviations: p: prepuce, cc: corpora cavernosa, cs: corpus spongiosum, u: urethra, tca: accessory cavernous tissue, ta: tunica albuginea, b: baculum.

Figure 5. Histological sections of A-D: *Myotis albescens* glans; from the basal (A) to the more apical (D) portion. Abbreviations: p: prepuce, cc: corpora cavernosa, cs: corpus spongiosum, u: urethra, tca: accessory cavernous tissue, ta: tunica albuginea, b: baculum.

Figure 6. Histological sections of A-F: *Myotis nigricans* glans; from the basal (A) to the more apical (F) portion. Abbreviations: p: prepuce, cc: corpora cavernosa, cs: corpus spongiosum, u: urethra, tca: accessory cavernous tissue, ta: tunica albuginea, b: baculum, arrow: medullary canal. Arrow head: chondrocytes. A, B, C, E, and F: HE staining; D: Tushmman's blue trichrome

Figure 7. Glans penis of filostomid species after the diaphonization. A-B: *Artibeus lituratus*; C-D: *Platyrrhinus lineatus*, E-F: *Sturnira lilium*; G-H: *Carollia perspicillata*; I-J: *Glossophaga soricina*; k-l: *Phyllostomus discolor*. A, C, E, G, I and K: ventral view; B, D, F, H, J and L: dorsal view.

Figure 8. Histological sections of *Artibeus lituratus* glans, from the basal (A) to more apical (F) portions. C and D: prepuce accessory cavernous tissue details. Abbreviations: p: prepuce, cc: corpora cavernosa, cs: corpus spongiosum, u: urethra, tca: accessory cavernous tissue, ta: tunica albuginea, arrow: pigment in the ephitelium, a: adipose tissue, asterisk: accessory cavernous tissue in the prepuce. A, B, C, E, and F: HE staining; D: Tushmman's blue trichrome.

Figure 9. Histological sections of A-B: *Platyrrhinus lineatus* and C-D: *Sturnira lilium* glans; from the basal to more apical portion. Abbreviations: p: prepuce, cc: corpora cavernosa, cs: corpus spongiosum, u: urethra, tca: accessory cavernous tissue, ta: tunica albuginea, arrow: pigment in the ephitelium, arrow head: adipose cells. HE staining.

Figure 10. Histological sections of A-B: *Carollia perspicillata*; C-D: *Glossophaga soricina* and E-F: *Phyllostomus discolor* glans; from the basal to more apical portions. Attention for the fat cells in the corpora cavernosa in D and F. Abbreviations: p: prepuce, cc: corpora cavernosa, arrow: corpus spongiosum, u: urethra, tca: accessory cavernous tissue, ta: tunica albuginea, arrow head: pigment in the ephitelium, a: adipose tissue, m/ asterisk: muscle. HE staining.

Table 1. Number of analyzed specimens for each species according to the applied procedures

Family	Genus	Species	Morphology	Histology	Total
Vespertilionidae	Histiotus	<i>H. velatus</i>	5	2	7
		<i>L. blossevilli</i>	5	2	7
	Lasiurus	<i>L. cinereus</i>	2	2	4
		<i>L. ega</i>	2	2	5
	Myotis	<i>M. albecens</i>	5	2	7
		<i>M. nigricans</i>			
			5	2	7
Phyllostomidae	Artibeus	<i>A. lituratus</i>	5	2	7
		<i>A. planirostris</i>			
			5	2	7
	Carollia	<i>C. perspicillata</i>	5	2	7
	Glossophaga	<i>G. soricina</i>	5	2	7
	Phyllostomus	<i>P. discolor</i>	5	2	7
	Platirrinus	<i>P. lineatus</i>	5	2	7
	Sturnira	<i>S. lilium</i>	5	2	7
Total			60	26	86

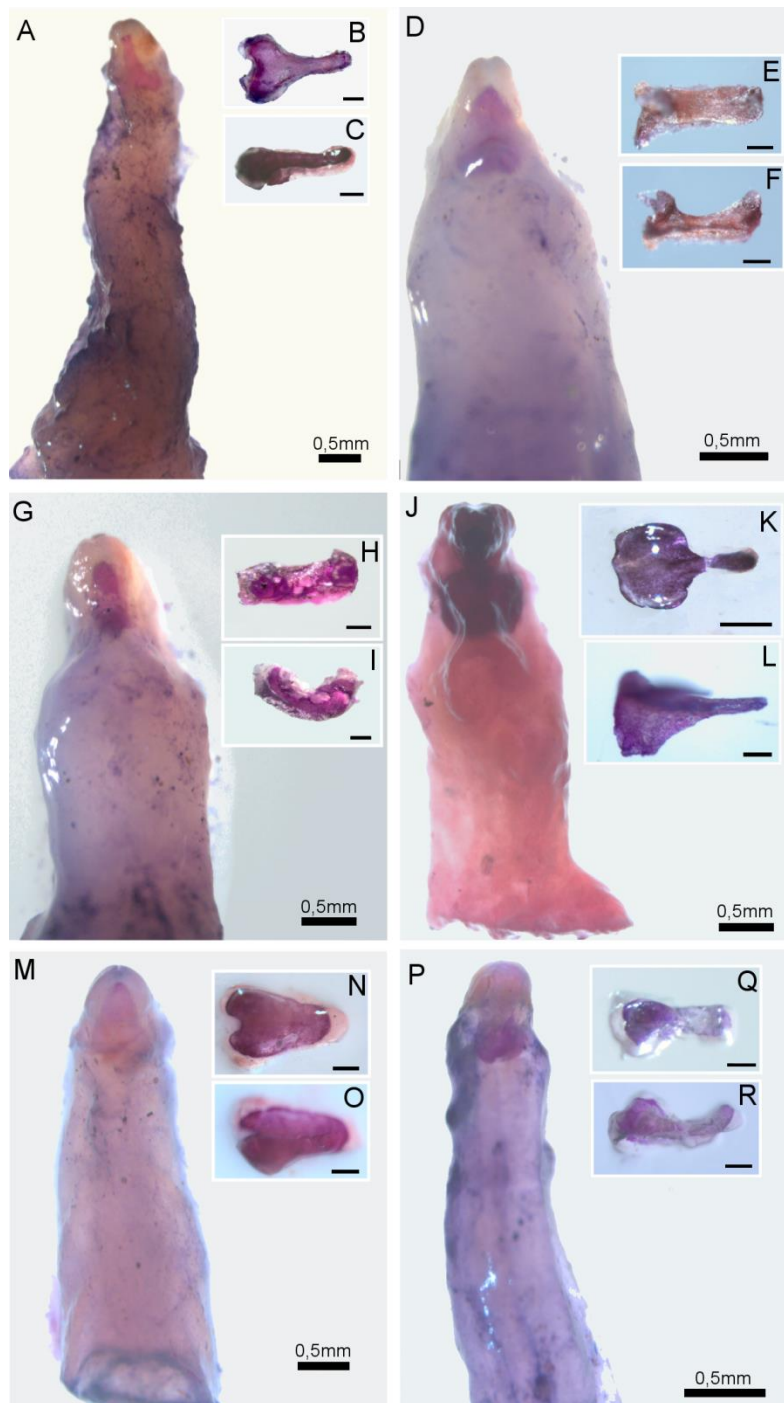


Figure 1. Glans penis and baculum of vespertilionid species after the diaphonization. A-C: *Histiotus velatus*; D-F: *Lasiurus blossevillei*; G-I: *Lasiurus cinereus*; J-L: *Lasiurus ega*; M-O: *Myotis albescens*; P-R: *Myotis nigricans*. B, E, H, K, N and Q: dorsal view; C, F, I, L, O and R: lateral view. The baculum scale corresponds to 0.2mm.

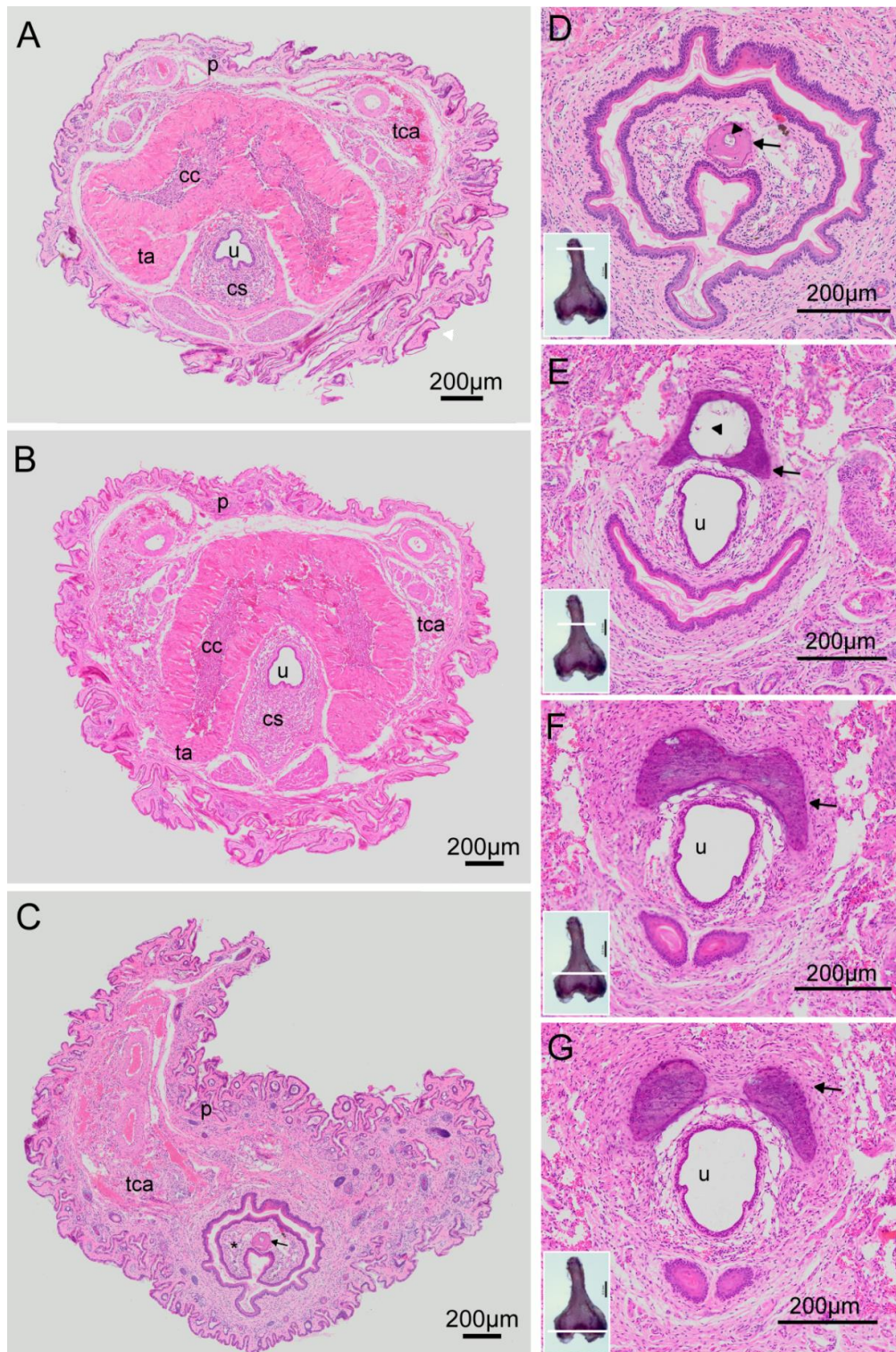


Figure 2. Penile section of *Histiopus velatus* from de base (A) to the apice (C). D-G: histological details of the baculum. Abbreviations: p: prepuce, cc: corpora cavernosa, cs: corpus spongiosum, u: urethra, tca: accessory cavernous tissue, ta: tunica albuginea, arrow: baculum, arrow head; medullary canal.

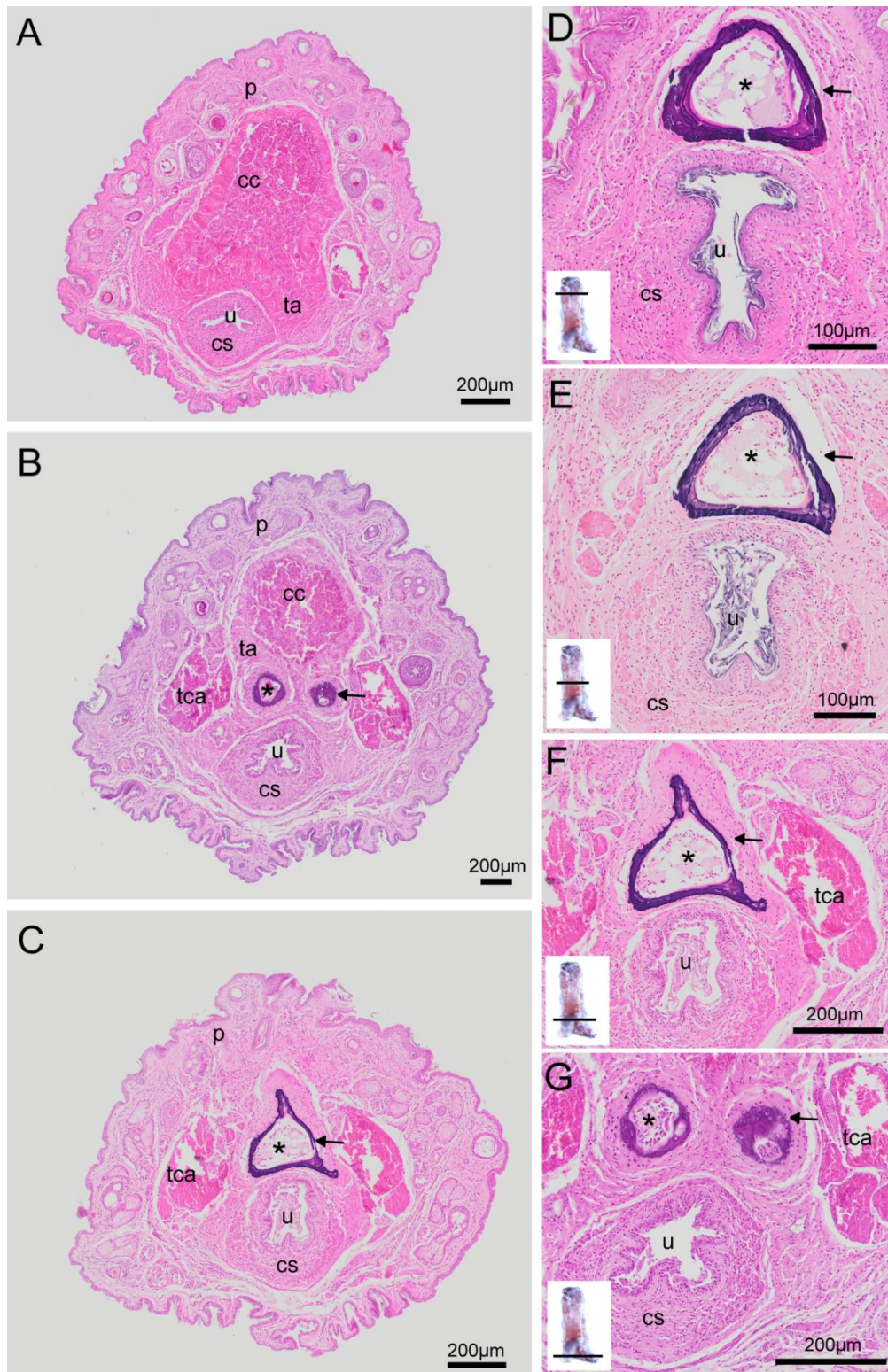


Figure 3. Histological sections of *Lasiurus blossevillii* glans from the most basal region (A) to the most apical (C). D-G baculum details inside the glans. Abbreviations: p:

prepuce, cc: corpora cavernosa, cs: corpus spongiosum, u: urethra, tca: accessory cavernous tissue, ta: tunica albuginea, arrow: baculum, asterisk: medullary canal.

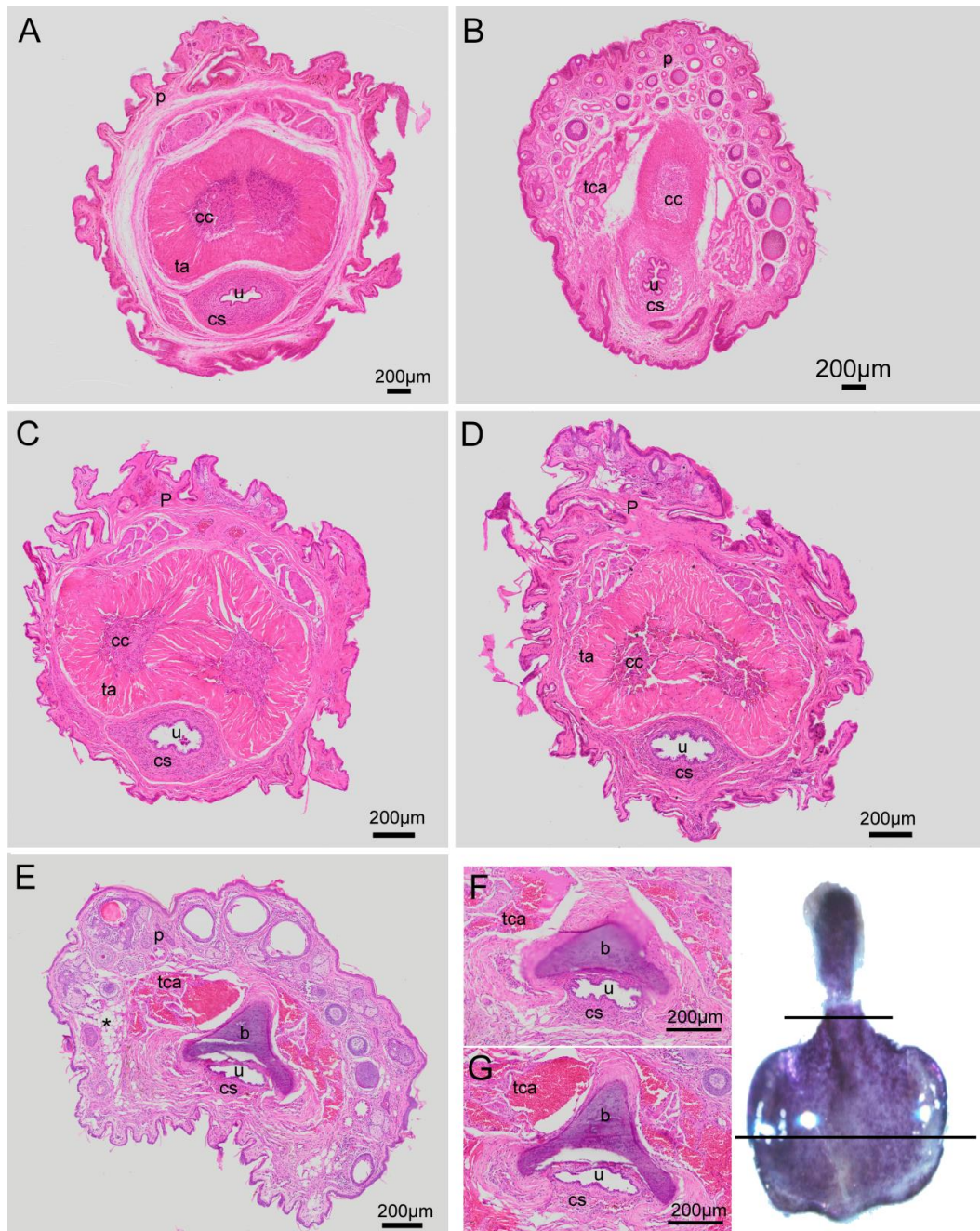


Figure 4. Histological sections of A-B: *Lasiurus cinereus* and C-G: *Lasiurus ega* glans; from the basal to the more apical portion. F and G: details of baculum inside the glans. Abbreviations: p: prepuce, cc: corpora cavernosa, cs: corpus spongiosum, u: urethra, tca: accessory cavernous tissue, ta: tunica albuginea, b: baculum.

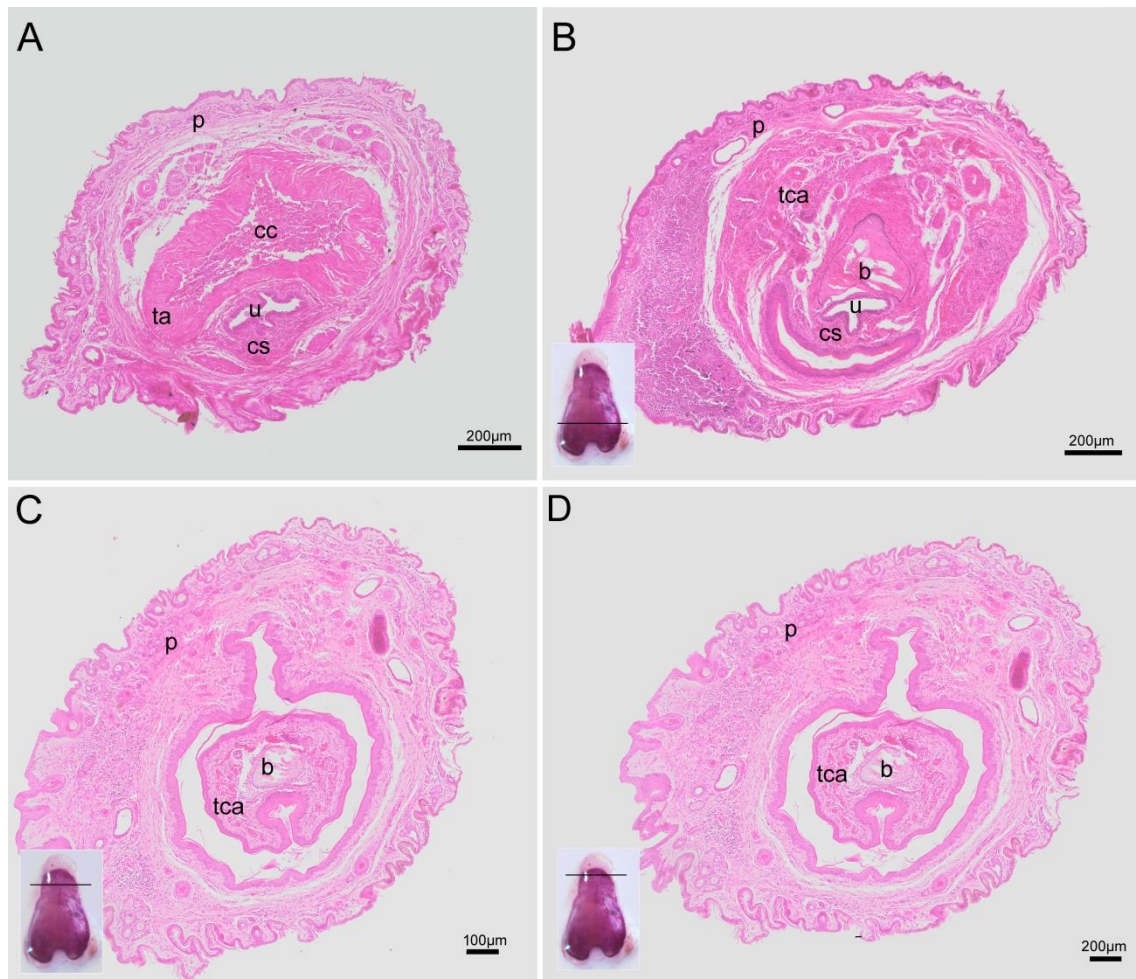


Figure 5. Histological sections of A-D: *Myotis albescens* glans; from the basal (A) to the more apical (D) portion. Abbreviations: p: prepuce, cc: corpora cavernosa, cs: corpus spongiosum, u: urethra, tca: accessory cavernous tissue, ta: tunica albuginea, b: baculum.

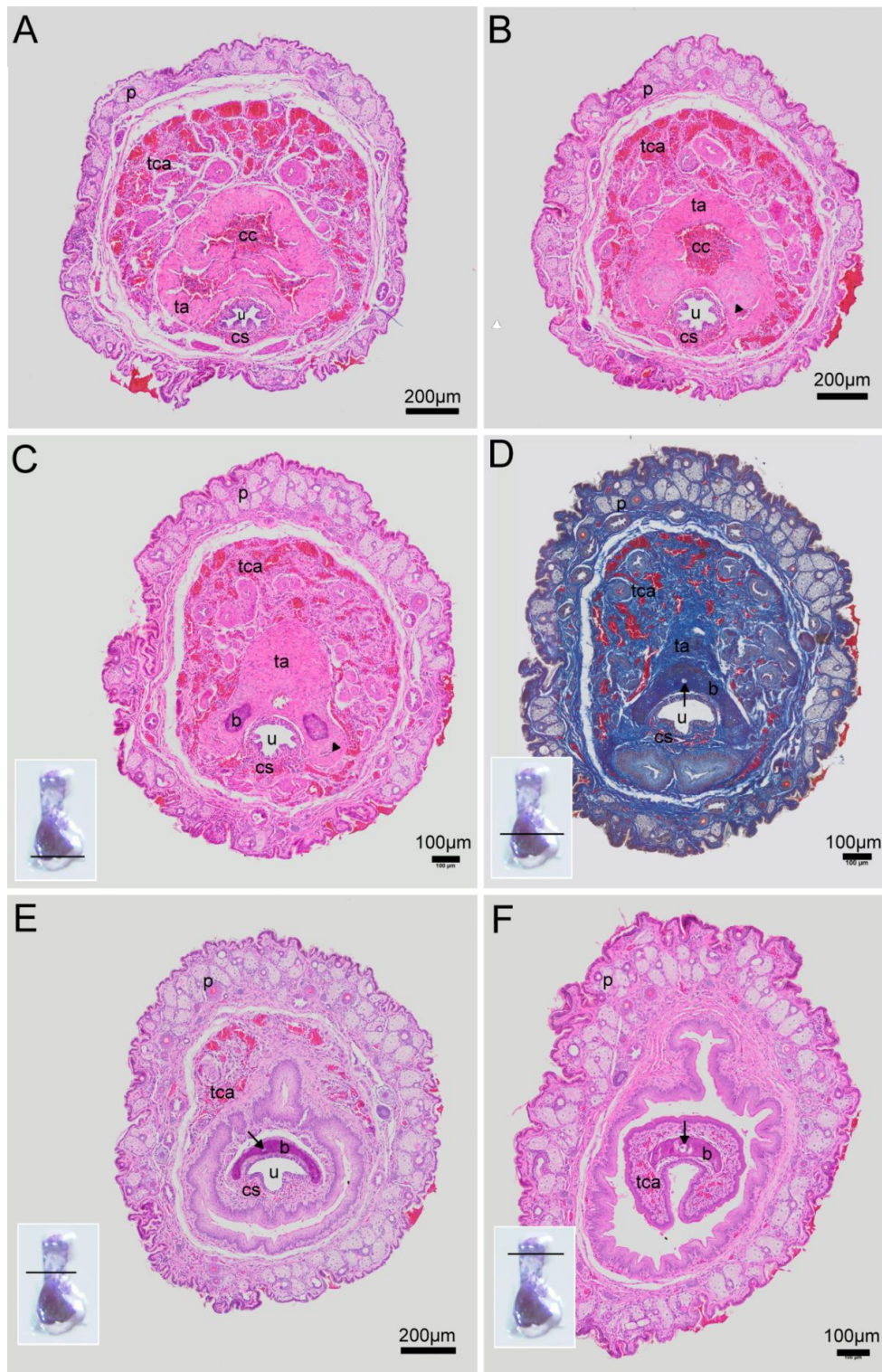


Figure 6. Histological sections of A-F: *Myotis nigricans* glans; from the basal (A) to the more apical (F) portion. Abbreviations: p: prepuce, cc: corpora cavernosa, cs: corpus spongiosum, u: urethra, tca: accessory cavernous tissue, ta: tunica albuginea, b:

baculum, arrow: medullary canal. Arrow head: chondrocytes. A, B, C, E, and F: HE staining; D: Tushmman's blue trichrome

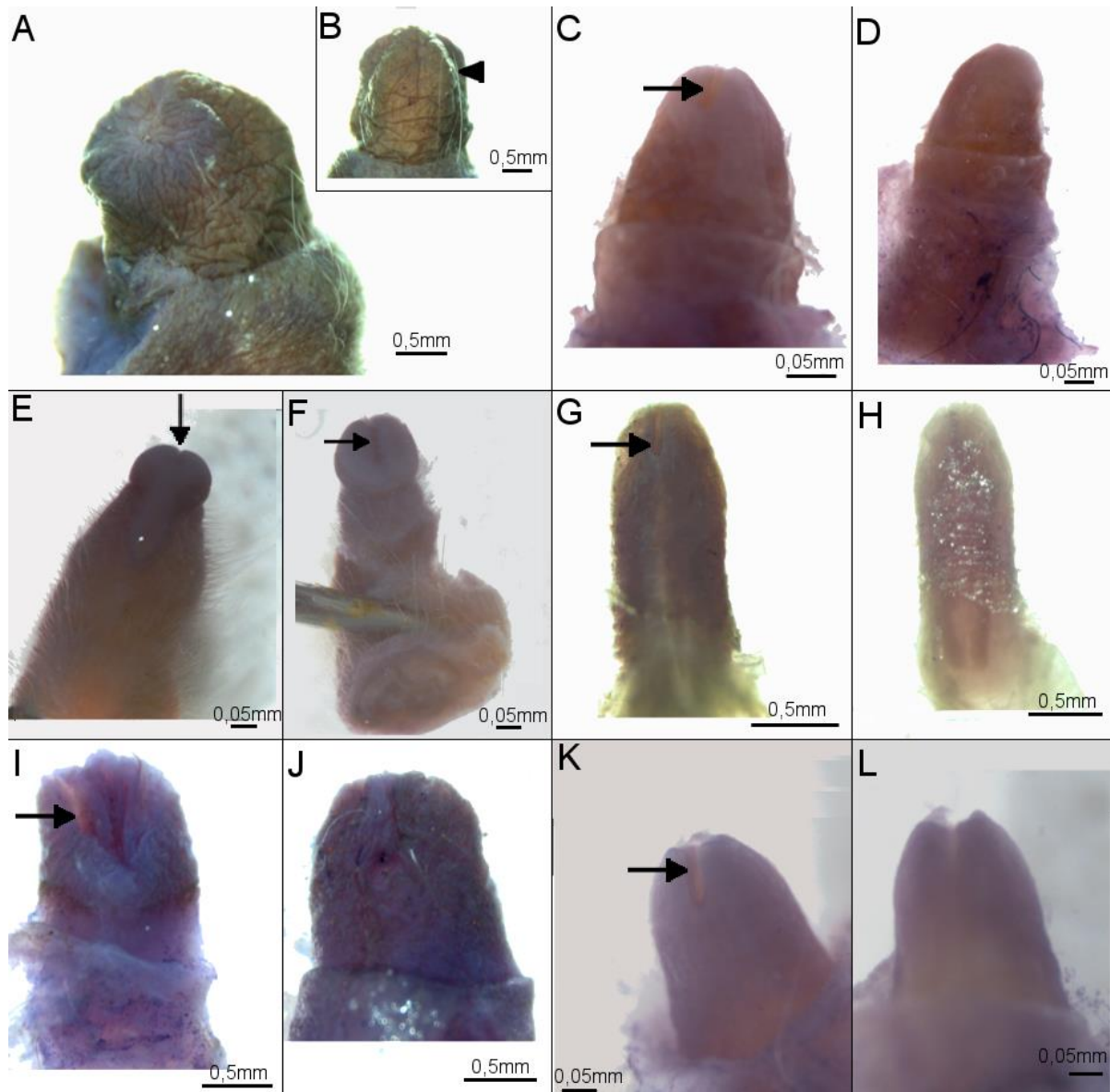


Figure 7. Glans penis of filostomid species after the diaphonization. A-B: *Artibeus lituratus*; C-D: *Platyrrhinus lineatus*, E-F: *Sturnira lilium*; G-H: *Carollia perspicillata*; I-J: *Glossophaga.soricina*; k-l: *Phyllostomus. discolor*. A, C, E, G, I and K: ventral view; B, D, F, H, J and L: dorsal view. Arrow head: lateral folds, arrow: medullary canal

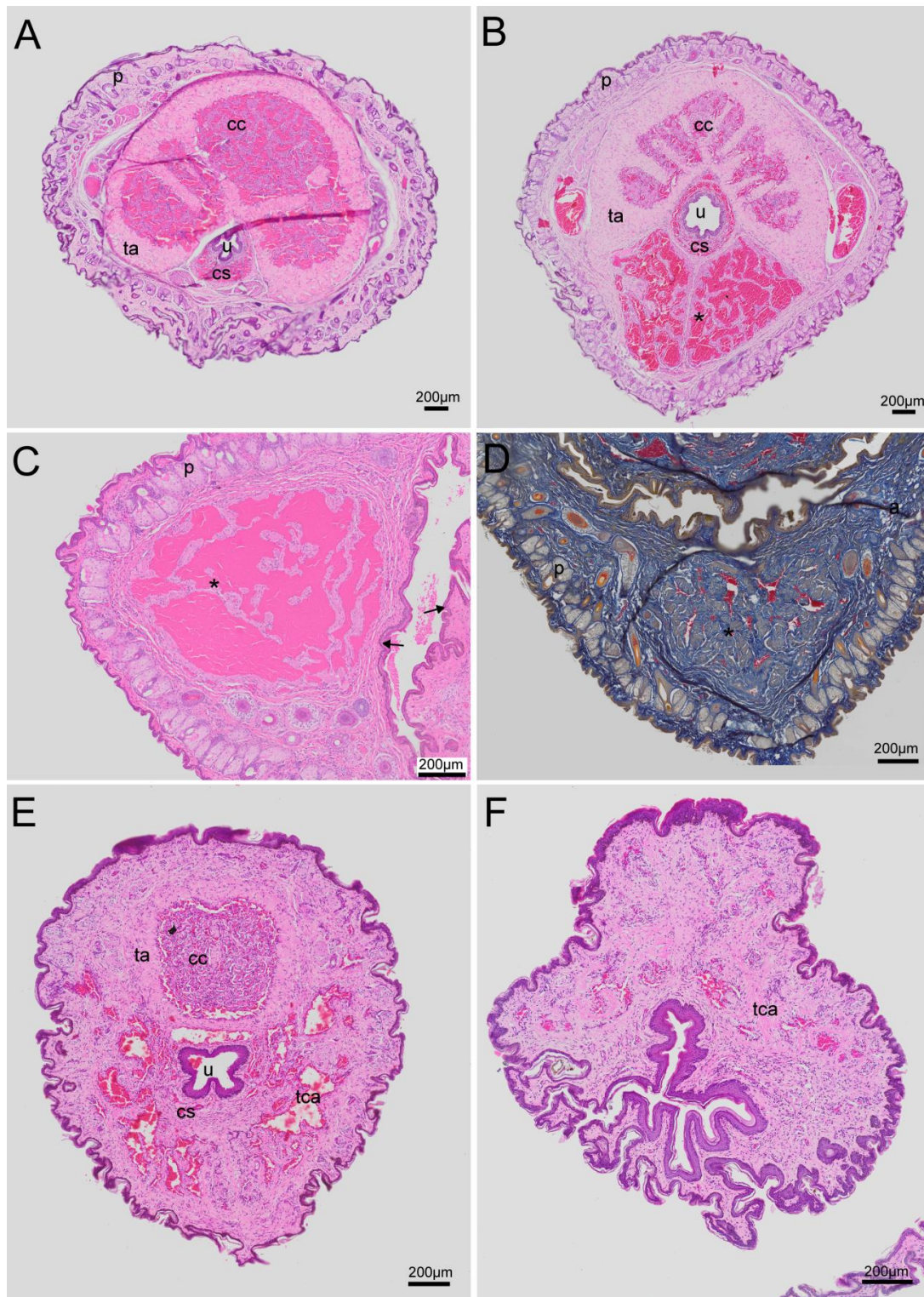


Figure 8. Histological sections of *Artibeus lituratus* glans, from the basal (A) to more apical (F) portions. C and D: prepuce accessory cavernous tissue details. Abbreviations: p: prepuce, cc: corpora cavernosa, cs: corpus spongiosum, u: urethra, tca: accessory cavernous tissue, ta: tunica albuginea, arrow: pigment in the epithelium,

a: adipose tissue, asterisk: accessory cavernous tissue in the prepuce. A, B, C, E, and F: HE staining; D: Tushmman's blue trichrome.

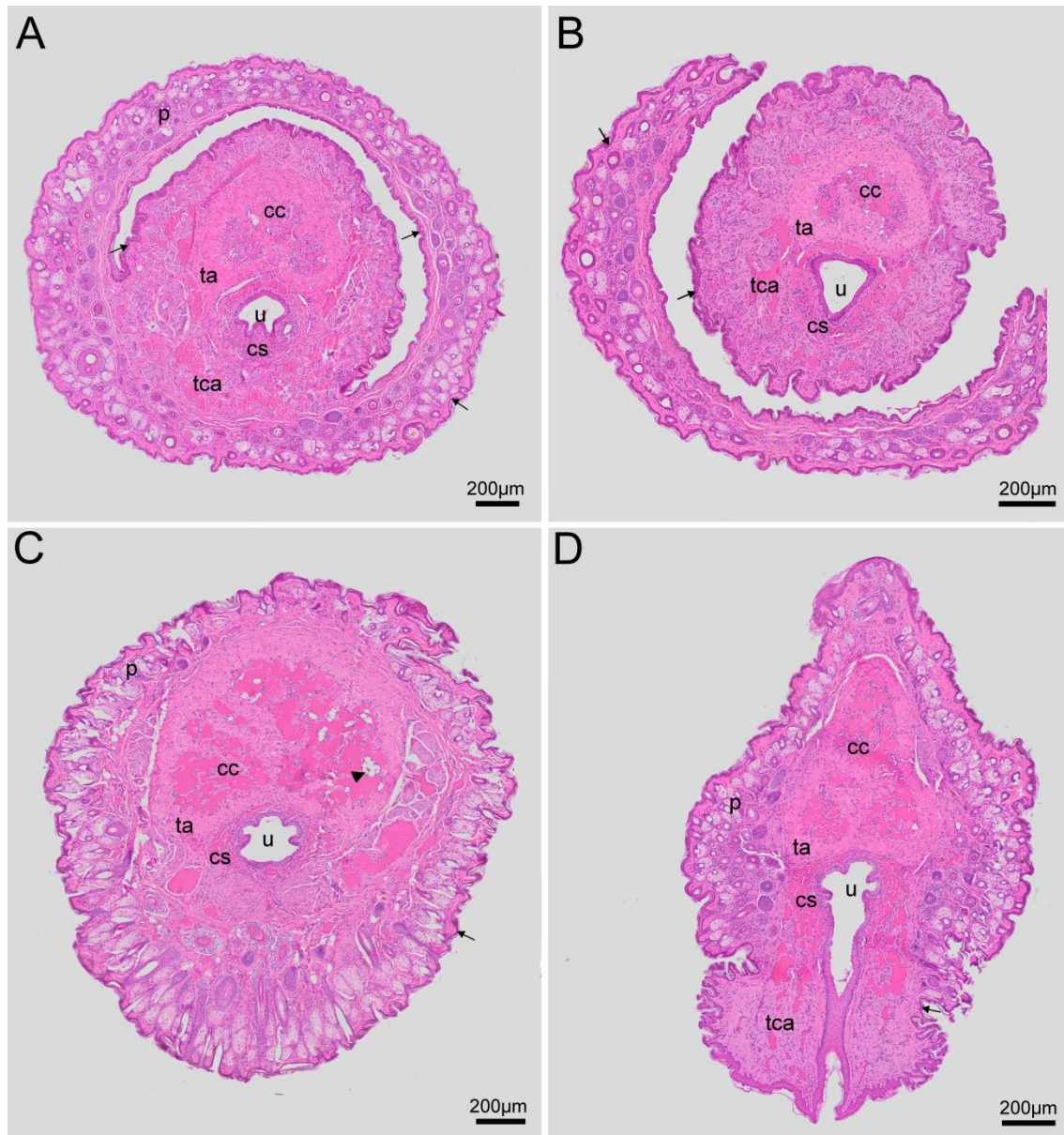


Figure 9. Histological sections of A-B: *Platyrrhinus lineatus* and C-D: *Sturnira lilium* glans; from the basal to more apical portion. Abbreviations: p: prepuce, cc: corpora cavernosa, cs: corpus spongiosum, u: urethra, tca: accessory cavernous tissue, ta: tunica albuginea, arrow: pigment in the epithelium, arrow head: adipose cells. HE staining.

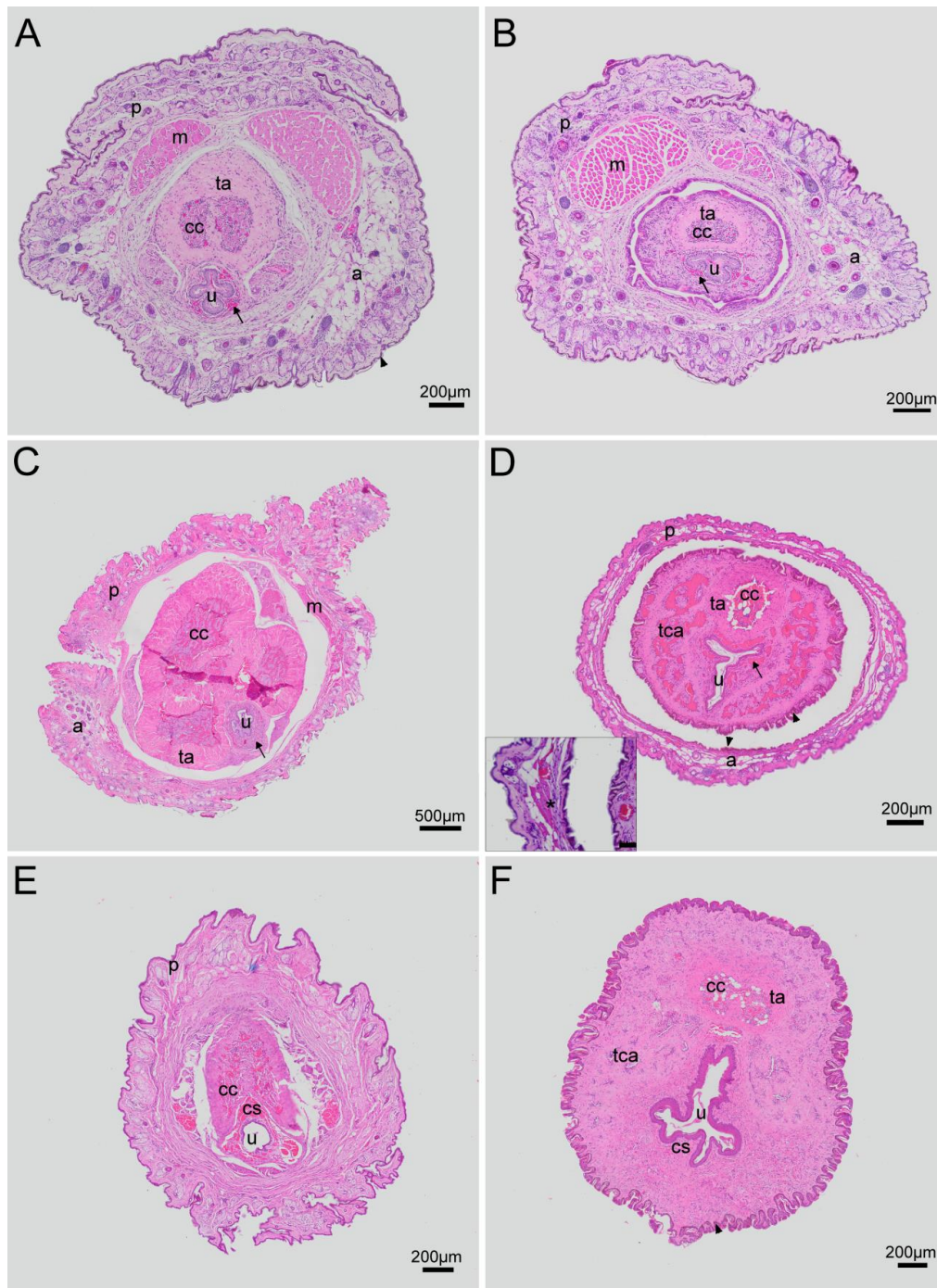


Figure 10. Histological sections of A-B: *Carollia perspicillata*; C-D: *Glossophaga soricina* and E-F: *Phyllostomus discolor* glans; from the basal to more apical portions. Attention for the fat cells in the corpora cavernosa in D and F. Abbreviations: p: prepuce, cc: corpora cavernosa, arrow: corpus spongiosum, u: urethra, tca: accessory cavernous tissue, ta: tunica albuginea, arrow head: pigment in the ephitelium, a: adipose tissue, m/ asterisk: muscle. HE staining.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados são considerações deste trabalho:

- A próstata de *Eptesicus furinalis* possui padrão semi-lobado, com duas regiões distintas: uma dorsal bilobulada e uma ventral única. Ambas apresentam constituição histológica e secreções diferentes.
- A região ventral é holócrina, de maneira similar a observada em outras espécies de morcego. O que mostra que esta característica única do grupo é bem conservada entre as espécies.
- O processo de regressão testicular presente na espécie *Eptesicus furinalis* interfere na morfologia da próstata, de modo que esta apresente mudanças significativas na quantidade de seus componentes (epitélio, lúmen e estroma), na presença de receptores de andrógenos e na taxa de proliferação celular. Todos variaram de modo sincrônico com a variação apresentada pelo estado reprodutivo do testículo.
- A próstata de *Molossus molossus* também possui um padrão semi-lobado, com duas regiões: uma dorsal tetralobulada e uma ventral única. Ambas apresentam constituição histológica e secreções diferentes.
- Assim como observado para *E. furinalis*, a próstata de *M. molossus* mantém a natureza holócrina da região ventral, enfatizando a conservação dessa característica no grupo.
- As avaliações mensais em *M. molossus* mostraram que apesar da espécie não apresentar períodos de regressão testicular a atividade prostática está maior nos dois picos reprodutivos descritos para a espécie (março e novembro), principalmente para o segundo pico.

- Há alterações nos componentes prostáticos em todos os meses avaliados, sendo os maiores parâmetros observados próximos aos picos reprodutivos da espécie e os menores nos meses finais e iniciais do ano (dezembro a abril)
- A próstata ventral apresenta atraso em relação ao primeiro pico reprodutivo, sendo sua atividade mais representativa no segundo pico.
- O pênis das espécies de filostomídeos analisados apresenta todos os elementos do pênis vascular de mamíferos (tecidos eréteis).
- Há variação na quantidade e localização dos tecidos eréteis nas glândulas.
- Nenhuma das espécies de filostomídeos apresenta báculo.
- O prepúcio nas espécies é altamente pigmentado, podendo apresentar tecido adiposo, tecido muscular e tecido cavernoso acessório com túnica em algumas espécies.

Com esses resultados, mostramos a complexidade da morfofisiologia da próstata nos machos de *E. furinalis* e *M. molossus* bem como a variação na morfologia peniana entre diferentes espécies de morcegos filostomídeos, descrevendo algumas características inéditas para o pênis de morcegos.

REFERÊNCIAS

- ALBAYRAK, I.; ASAN, N. The structure of the baculum in *Myotis myotis* and *Myotis blythi* (Chiroptera: Vespertilionidae) from Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, v. 25, p. 229-233, 2001.
- AUMULLER, G., SEITZ, J. Protein secretion and secretory process in male accessory sex glands. *International Review of Cytology*, v. 121, p. 127-231, 1990.
- BARCLAY, R. M. R.; BRIGHAM, R. M. Prey detection, dietary niche breadth and body size in bats: why are aerial insectivorous bats so small. *The American Naturalist*, v.137, p. 693-703, 1991.
- BEGUELINI, M.R. et al. Morphological characterization of the testicular cells and seminiferous epithelium cycle in six species of Neotropical bats. *Journal of Morphology*, v. 270, p. 943-953, 2009.
- BEGUELINI, M. R. et al. Morphological features and morphometric analysis of the epididymis of two neotropical bats, *Eumops glaucinus* and *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Chiroptera Neotropical*, v.16, p. 769-779, 2010.
- BEGUELINI, M.R. et al. Two periods of total testicular regression are peculiar events of the annual reproductive cycle of the black *Myotis* bat, *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Reproduction, Fertility and Development*, v. 26(6),p. 834-846, 2013.
- BEGUELINI, M.R. et al. Impact of the Processes of Total Testicular Regression and Recrudescence on the Epididymal Physiology of the Bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *PlosOne*, v.10(6), e0128484, 2015.
- BUENO, L.M. et al. Ultrastructure of spermatogenesis, spermatozoon and processes of testicular regression and recrudescence in *Eptesicus furinalis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Animal Reproduction Science*, v. 148, p. 228-244, 2014.
- BROWN, R. E.; GENOWAYS, H. H.; JONES Jr, J. K. *Bacula of some neotropical bats*. Museum, University of Nebraska State. 1971.
- CHRISTANTE, C. M. et al. Structure, histochemistry and seasonal variations of the male reproductive accessory glands in the Pallas's mastiff bat, *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Reproduction, Fertility and Development*, v. 27(2), p. 313-22, 2013.
- CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*, v. 52, p. 198-236, 1972.
- COMELIS, M. T., et al. Penile histomorphology of the neotropical bat *Eptesicus furinalis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Zoologischer Anzeiger*, v. 258,p. 92-98, 2015
- COMELIS, M. T. et al. Morphological and histological characters of penile organization in eleven species of molossid bats. *Zoology*, v.127, p. 70-83, 2018.
- CRICHTON, E.G.; KRUTSCH, P.H. *Reproductive biology of bats*. (Academic Press: London). 2000.
- COOKE, O. S.; YOUNG, P.; CUNHA, G. R. Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology*, v. 128, p. 2867-2873, 1991.

- CUNHA, G. R. et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrine Reviews*, v. 8, p. 338-362, 1996.
- DOUNJACOUR, A. A.; CUNHA, G. R. The effect of androgen deprivation on branching morphogenesis in the mouse prostate. *Developmental Biology*, v.128, p. 1-14, 1988.
- FAZZOLARI-CORRÊA, S. *Aspectos sistemáticos, ecológicos e reprodutivos de morcegos na Mata Atlântica*. 158 f. Tese (Doutorado em Zoologia)- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.
- FENTON, M.B. *Bats*. New York: Facts on File, Inc., 1992.
- FENTON, M.B.; SIMMONS, N.B. *Bats: a world of Science and mystery*. Chicago: The University of Chicago Press, 2014.
- FLEMING, T.H.; HOOPER, E.T.; WILSON, D.E. Three central American bat communities: structure, reproductive cycles and movement patterns. *Ecology*, v. 53, p. 555-569, 1972.
- GUSTAFSON, A.W. Male reproductive patterns in hibernating bats. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 56, p. 317-331, 1979.
- HAYWARD, S. W.; ROSEN, M. A; CUNHA, G. R. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *British Journal of Urology*, v. 79, p. 18-26, 1997.
- HERDINA, A.N. et al. Histomorphology of the penis bone (baculum) in the gray long-eared bat *Plecotus austriacus* (Chiroptera, Vespertilionidae). *Anatomical Records*, v. 293, p. 1248–1258, 2010.
- HERDINA, A. N. et al. Correlative 3D-imaging of *Pipistrellus* penis micromorphology: validating quantitative microCT images with undecalcified serial ground section histomorphology. *Journal of Morphology*, v. 276, p.695–706, 2015.
- KRUTZSCH, P. H. Reproduction of the canyon bat, *Pipistrellus hesperus*, in Southwestern United States. *American Journal of Anatomy*, v. 143, p. 163-200, 1975.
- KRUTZSCH, P.H. Male reproductive patterns in nonhibernating bats. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 56, p. 333-344, 1979.
- KUNZ T. H.; FENTON, M. B. *Bat ecology*. Chicago: The University of Chicago Press, 2003.
- LAVAL, R. K.; FITCH, H. S. Structure, movements and reproduction in three Costa Rican bats communities. *Ocasional Papers of the Museum Zoology*, v. 6, p. 1-28, 1977.
- LEÓN-GALVÁN, M. A. et al. Male reproductive cycle of Mexican big-eared bats, *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Southwest Nature*, v. 50, p. 453-460, 2005.
- MARTINS, F. F. et al. Comparative analysis of the male reproductive accessory glands of bat species from the five Brazilian subfamilies of the family Phyllostomidae (Chiroptera). *Journal of Morphology*, v. 276, p. 470–480, 2015.
- MARTINS, F. F. et al. Morphophysiology and ultrastructure of the male reproductive accessory glands of the bats *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina* and *Phyllostomus discolor* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Acta Histochemica*, v. 118(6), p. 640–651, 2016.

- MATTHEWS, L.H. The form of the penis in the British rhinolophid bats, compared with that of the vespertilionid bats. *Transactions of the Zoological Society of London*, v. 23, p. 213–223, 1937.
- MATTHEWS, L.H. Notes on the genitalia and reproduction of some African bats. *Proceedings of the Zoological Society of London*, v. 3, p. 289–346, 1941.
- MATSUMOTO, A.M. *Spermatogenesis. Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996.
- MIOTTI, M. D.; MOLLERACH, M. I.; BARQUEZ, R. M. Anatomy and histology of the prostate and glands of Cowper in three species of neotropical bats. *Journal of morphology*, v. 279, p. 294–301, 2017.
- MORAIS, D. B. et al. Cycle of the seminiferous epithelium of the bat *Molossus molossus*, characterized by tubular morphology and acrosomal development. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, v. 1, p. 303–307, 2012.
- MORAIS, D. B. et al. Organization and Seasonal Quantification of the Intertubular Compartment in the Bat *Molossus molossus* (Pallas, 1776) Testis. *Microscopy Research and Technique*, v. 76, p. 94–101, 2013.
- NEGRIN, A. C. et al. Structure, histochemistry, ultrastructure and seasonal variations of the male prostatic complex in the black *Myotis* bat, *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Reproduction, Fertility and Development*, v. 26, p.1188–97, 2014.
- NOGUEIRA, M.R. et al. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. *Check List*, v. 10, p. 808–821, 2014
- NOWAK, R.M. *Walker's bats of the world*. Baltimore: Johns Hopkin University Press, 1999.
- ORR, T. J., BRENNAN, P. L. R. All features great and small – the potential roles of the baculum and penile spines in mammals. *Integrative and Comparative Biology*, v. 56, p. 635–643, 2016.
- POUGH, F.H. *A vida dos vertebrados*. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2008.
- PRICE, D. Comparative aspects of the development and structure in the prostate. *National Cancer Institute Monographs*, v. 12, p. 1–27, 1963.
- PUGA, C. C. I. et al. Structure, histochemistry and ultrastructure of the male reproductive accessory glands in the neotropical flat-faced fruit-eating bat *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Reproduction, Fertility and Development*, v. 25, p. 558–569, 2013.
- PUGA, C. C. I. et al. Seasonal changes in the prostatic complex of *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). *General and Comparative Endocrinology*, v. 197, p.33–42, 2014.
- RACEY, P. A.; ENTWISTLE, A. C. Life-history and reproductive strategies of bats. In: CRICHTON, E.G.;KRUTZSCH, P. H. (Eds.). *Reproductive Biology of Bats*. London: Academic Press, 2000. p. 363–414.
- REIS, N.L. et al. *Morcegos do Brasil*. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2007.
- ROCHEL, S. S. et al. Lobe Identity in the Mongolian gerbil prostatic vomplex: a new rodent model for prostate study. *The Anatomical Records*, v. 290, p. 1233–1247, 2007.

ROSAI, J. Male reproductive system. In: Rosai, J.; Ackerman's Surgical Pathology. 8ed., eds. Mosby-Year, St. Louis-USA, v.1, p. 1221-1256, 1996.

RYAN, J. M. 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, v. 206, p. 122–137, 1991a.

RYAN, J. M. Morphology of the glans penis in four genera of molossid bats (Chiroptera: Molossidae). *Journal of Mammalogy*, v. 72, p. 658–668, 1991b.

SMITH, J. D.; MADKOUR, G. Penial morphology and the question of Chiroptera phylogeny. *Proceedings of the Fifth International Bat Research Conference*. p. 347–365, 1980.

SIMMONS, N.B. Order Chiroptera. In: Wilson, D.E.; Reeder, D.M. (Eds.), *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. 3rd edition. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. p. 312–529,

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

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

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

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

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

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

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 12 / 04 / 2019

Assinatura do autor