

**DANIELLE BARBOSA MORAIS**

**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA TESTICULAR EM MORCEGO INSETÍVORO  
(*Molossus molossus*, PALLAS, 1776 CHIROPTERA: MOLOSSIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M827m  
2008

Morais, Danielle Barbosa, 1983-  
Morfologia e morfometria testicular em morcego  
insetívoro (*Molossus molossus*, Pallas, 1776 Chiroptera :  
Molossidae) / Danielle Barbosa Moraes. – Viçosa, MG,  
2008.

xv, 74f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Morcego - Reprodução. 2. Morcego - Testículos -  
Variações sazonais. 3. Espermatogênese em animais.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

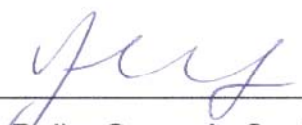
CDD 22.ed. 599.4

**DANIELLE BARBOSA MORAIS**

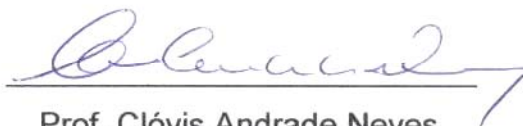
**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA TESTICULAR EM MORCEGO INSETÍVORO  
(*Molossus molossus* PALLAS, 1776) (CHIROPTERA, MOLOSSIDAE)**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Estrutural, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

APROVADA: 25 de julho de 2008



Prof. Deiler Sampaio Costa



Prof. Clóvis Andrade Neves



Prof. Cláudio César Fonseca



Prof. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho

  
Prof. Sérgio Luís Pinto da Matta  
(Orientador)

## DEDICATÓRIA

*Ao meu saudoso e amado pai  
À minha amada mãe  
Às minhas amadas irmãs e irmãos*

## AGRADECIMENTOS

Minha amada família...

Ao meu amado pai, por todo o exemplo de dignidade, bondade, humildade e respeito que representou em minha vida, e por ter me guiado durante estes preciosos anos.

À minha amada mãe, pelo amor incondicional, pelos cuidados, pelas orações e por tentar entender minha ausência nestes 2 anos.

Às minhas amadas irmãs e irmãos, Neide, Celinha, Angela, Vera, Celeste, Ronildo, Ronaldo e Robson, por serem a Minha Família.

Ao meu querido sobrinho Gabriel, meu príncipe, meu anjinho, pela alegria de ser chamada de “Dindinha”.

Aos meus queridos sobrinhos Ruan, Maria Eduarda, Daiane, Renan, Roger, Ramon e Luana e aos cunhados, cunhadas e tias pelas alegrias, pelas orações e pela torcida.

Por tudo o que são e por tudo o que representam na minha vida.

Obrigada pela confiança, por todo amor, e pelo incentivo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Geral, pela oportunidade de realização deste mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de estudos, sem a qual nada disto teria sido possível.

Ao professor Sérgio Luis Pinto da Matta, orientador e amigo, por ter me acolhido desde a época do estágio até meu ingresso no mestrado e durante toda a realização deste, pelos ensinamentos, por suas palavras de sabedoria, pela paciência e pelos incentivos. Por tanto ter contribuído em minha formação profissional e pessoal.

À professora Mariella Bontempo Duca Freitas pela receptividade e disponibilidade desde o primeiro momento, por todo o suporte durante as atividades de campo, pelos ensinamentos no Laboratório de Morfofisiologia, e por ter desempenhado de forma tão brilhante seu papel de co-orientadora.

Ao professor Tarcízio Antonio Rego de Paula pela co-orientação e fundamental contribuição com seus conhecimentos em espermatogênese.

Ao Departamento de Biologia Animal pelo imprescindível apoio às coletas.

Aos professores do Laboratório de Biologia Estrutural, Sérgio Luís Pinto da Matta, Clóvis Andrade Neves, José Lino Neto, Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado e Adilson Ariza Zácara, pelos preciosos ensinamentos, competência e exemplo de profissionalismo.

Aos professores do Departamento de Veterinária, Tarcízio Antonio Rego de Paula, Cláudio César Fonseca e Laércio dos Anjos Benjamin, pelos valiosos ensinamentos.

Ao professor Eduardo Paulino da Costa pelo grande auxílio nas análises estatísticas realizadas.

À amiga Ana Paula de Lima Florentino Matta, colega de mestrado, de espermatogênese, de disciplinas e de laboratório, pelo companheirismo a todo o momento, pelas parcerias realizadas, pelo exemplo de profissionalismo, seriedade e dedicação.

Às alunas de iniciação científica Marli do Carmo Cupertino e Luciana Coutinho de Oliveira, pela grande ajuda durante as atividades de campo, de laboratório e análises morfométricas.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Estrutural, alguns também companheiros de disciplinas, pela preciosa convivência, tendo tornado este período muito mais prazeroso: Ana Paula Matta, Marcos, Vinícius, Lílian, Mariana, Manuela, Edalton, Marli, Diane, Luciana, Katiane, Sirlene, Madu, Sílvia, Claudinha, Max, Jane, Tetsuo, Juliana, Fabíola, Diego, Ana Paula Cerqueira, Kyvia, Rose, Carolina, Marcília, Karine, Bruna, Fabiana, Luís e Reggiani.

Às colegas de república Joyce, Fernanda, Nivea, Milene, e à Jucelita, por terem tornado mais fácil minha adaptação em Viçosa e à Ana Carolina, amiga de todas as horas.

Aos funcionários (as) do Departamento de Biologia Geral, Diana, Beth, Salvadora, João e Alex, pela presteza no cumprimento de suas atividades.

Aos colegas do Laboratório de Morfofisiologia, Leandro, Thales, Mirlaine, Jercyane, Bruno, Túlio e Daniela, pela grande ajuda durante as coletas e pelos momentos de descontração.

Aos colegas do Museu de Zoologia João Mojen, Clever e Maria Clara, pela fundamental ajuda na identificação dos animais.

Às professoras da graduação, Mariana Machado Neves e Larissa Pires Barbosa, responsáveis por meu ingresso na pesquisa científica e nos trabalhos em histologia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo importante apoio a eventos científicos ocorridos neste período.

Aos funcionários do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), por permitirem a realização das coletas e pela disponibilização do alojamento da Fazenda do Brigadeiro, utilizado durante as mesmas.

Ao Departamento de Engenharia Agrícola pelos dados meteorológicos fornecidos.

Aos professores Deiler Sampaio Costa, Clóvis Andrade Neves, Cláudio César Fonseca e Oswaldo Pinto Ribeiro Filho por participarem da banca examinadora.

À Deus, por toda a força, e por me permitir chegar até aqui.

## BIOGRAFIA

Danielle Barbosa Morais, filha de José de Paiva Morais (*in memoriam*) e Alídia Barbosa Morais, nasceu na cidade de Timóteo, Minas Gerais, em 01 de Maio de 1983.

Graduou-se como Bacharel em Ciências Biológicas em Julho de 2006, pelo Centro Universitário do Leste de Minas Gerais (UnilesteMG), Ipatinga-MG. Durante sua graduação desenvolveu trabalhos nas áreas de morfologia e morfofisiologia reprodutiva, tendo sido bolsista de iniciação científica por 2 anos e atuado também como monitora da disciplina Biologia do Desenvolvimento.

Iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, em Outubro de 2006, defendendo a dissertação em 25 de Julho de 2008.



## ÍNDICE

Lista de figuras .....	ix
Lista de tabelas.....	x
Resumo .....	xii
Abstract .....	xiv
1. Introdução .....	01
2. Revisão de literatura .....	03
2.1. Taxonomia, origem e evolução dos morcegos .....	03
2.2. Características gerais da ordem Chiroptera .....	04
2.2.1. Família Molossidae .....	06
2.3. Características reprodutivas dos morcegos .....	07
2.4. Testículo .....	09
2.5. Espermatogênese .....	11
2.6. Células de Leydig .....	12
3. Objetivos .....	14
3.1. Objetivo geral .....	14
3.2. Objetivos específicos .....	14
4. Referências Bibliográficas .....	15
<b>Artigo I: Morfologia e morfometria sazonal do compartimento tubular dos testículos de <i>Molossus molossus</i> (Chiroptera: Molossidae) .....</b>	<b>23</b>
Resumo .....	23
Abstract .....	24
1. Introdução .....	25
2. Material & Métodos .....	26
2.1. Área de estudo .....	26
2.2. Captura, coleta e manutenção dos animais .....	27
2.3. Análises morfológicas e morfométricas .....	28
2.3.1. Proporção volumétrica (%) e volume dos componentes do parênquima testicular .....	29
2.3.2. Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento dos túbulos seminíferos .....	29
2.4. Análise estatística .....	30

3.	Resultados .....	30
4.	Discussão .....	35
5.	Conclusões .....	42
6.	Referências Bibliográficas .....	42
<b>Artigo II: Organização e quantificação sazonal dos elementos do</b>		
<b>compartimento intertubular dos testículos do morcego insetívoro</b>		
<b><i>Molossus molossus</i> (Pallas, 1776) .....</b>		
	Resumo .....	50
	Abstract .....	51
1.	Introdução .....	52
2.	Material & Métodos .....	53
2.1.	Área de estudo .....	53
2.2.	Captura, coleta e manutenção dos animais .....	54
2.3.	Processamento histológico .....	55
2.4.	Análises morfométricas .....	55
2.4.1.	Proporção volumétrica (%) e volume dos elementos do intertúbulo .....	55
2.4.2.	Morfometria de células de Leydig .....	56
2.5.	Análise estatística .....	57
3.	Resultados .....	57
4.	Discussão .....	62
5.	Conclusões .....	66
6.	Referências Bibliográficas .....	67
	Conclusões gerais .....	72
	Apêndice 1 .....	73
	Apêndice 2 .....	74

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** *Molossus molossus* macho coletado na Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil. Morais, 2008 ..... 07

### Artigo I

**Figura 1.** Secções transversais dos testículos de *Molossus molossus*. **a.** ★: Albugínea; Detalhe: mastócitos. Barra: 25 µm. **b.** **CT:** Compartimento tubular. **CI:** Compartimento intertubular. ➡: Túnica própria. **ES:** Epitélio seminífero. **L:** lúmen. ⇨: Células de Sertoli. Detalhe: células de Sertoli. Barra: 30 µm. Azul de toluidina - borato de sódio ..... 31

**Figura 2.** Secção transversal testicular de *Molossus molossus* evidenciando o ducto eferente no compartimento intertubular. **a.** Controle. **b.** Fosfatase ácida. ➡: Lisossomos no ducto eferente. Nuclear fast red. Barra: 30µm ..... 35

### Artigo II

**Figura 1.** Secções transversais dos testículos de *Molossus molossus* coletados nas diferentes estações climáticas anuais. **a:** Verão, **b:** Outono, **c:** Inverno, **d:** Primavera. **CT:** compartimento tubular. **CI:** compartimento intertubular. **CL:** células de Leydig. **VS:** vasos sanguíneos. ★: Espaço linfático. ➡: Tecido conjuntivo. Azul de toluidina - borato de sódio. Detalhe: células de Leydig com grânulos de lipofucsina. Barra: 30µm ..... 58

**Figura 2.** Secções transversais dos testículos de *Molossus molossus*. **CT:** compartimento tubular. **CI:** compartimento intertubular. **a:** Azul de toluidina - borato de sódio. **b:** Fosfatase ácida. Barra: 30µm ..... 59

## LISTA DE TABELAS

### Artigo I

- Tabela 1.** Valores médios mensais da temperatura do ar (°C), precipitação pluviométrica (mm), fotoperíodo (hora/luz/dia) e umidade relativa do ar (%) na região de Viçosa, MG, nas quatro estações climáticas anuais, no período de Janeiro de 2007 a Maio de 2008. Fonte: Estação Meteorológica do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa ..... 27
- Tabela 2.** Pesos corporais (g), testiculares (g) e índice gonadossomático (IGS) (%) de *Molossus molossus* adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais ..... 32
- Tabela 3.** Pesos da albugínea (g), do parênquima testicular (g) e percentual de albugínea dos testículos de *Molossus molossus* adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais ..... 32
- Tabela 4.** Proporções volumétricas (%) entre os componentes do parênquima testicular, volume (mL) dos túbulos seminíferos e do compartimento intertubular e índice tubulossomático (ITS) (%) dos testículos de *Molossus molossus* adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais ..... 33
- Tabela 5.** Percentuais do compartimento tubular representados por lúmen, epitélio seminífero e túnica própria, nos testículos de *Molossus molossus* adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais ..... 34
- Tabela 6.** Diâmetro tubular ( $\mu\text{m}$ ), altura do epitélio seminífero ( $\mu\text{m}$ ), comprimento dos túbulos seminíferos por testículo, por grama de testículo e comprimento total dos túbulos seminíferos (m) nos testículos de *Molossus molossus* adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais ..... 34

### Artigo II

- Tabela 1.** Valores médios mensais da temperatura do ar (°C), precipitação pluviométrica (mm), fotoperíodo (hora/luz/dia) e umidade relativa do ar (%) na região de Viçosa, MG, nas quatro estações climáticas anuais, no período de Janeiro de 2007 a Maio de 2008. Fonte: Estação Meteorológica do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa ..... 54
- Tabela 2.** Proporções volumétricas (%) entre túbulos seminíferos e intertúbulo e volume (mL) dos túbulos seminíferos e do intertúbulo nos testículos de

<i>Molossus molossus</i> adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais .....	59
<b>Tabela 3.</b> Percentual de célula de Leydig, vaso sanguíneo, espaço linfático e tecido conjuntivo no compartimento intertubular dos testículos de <i>Molossus molossus</i> adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais .....	60
<b>Tabela 4.</b> Percentual de célula de Leydig, vaso sanguíneo, espaço linfático, tecido conjuntivo e de intertúbulo no testículo de <i>Molossus molossus</i> adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais .....	60
<b>Tabela 5.</b> Valor médio do volume total (mL) dos elementos do compartimento intertubular por parênquima testicular de <i>Molossus molossus</i> adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais .....	61
<b>Tabela 6.</b> Diâmetro nuclear de células de Leydig (CL), percentuais (%) de núcleo e citoplasma de CL, volumes (mL) de núcleo e citoplasma de CL e volume (mL) de CL nos testículo de <i>Molossus molossus</i> adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais .....	62
<b>Tabela 7.</b> Número total de células de Leydig (CL) e número de CL por grama de testículo em <i>Molossus molossus</i> adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais .....	62

## RESUMO

MORAIS, Danielle Barbosa. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2008.

**Morfologia e morfometria testicular em morcego insetívoro (*Molossus molossus*, Pallas, 1776 Chiroptera: Molossidae).** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-Orientadores: Mariella Bontempo Duca Freitas e Tarcízio Antônio Rêgo de Paula.

Foram aplicadas análises morfométricas testiculares a fim de inferir sobre a dinâmica gonadal e capacidade reprodutiva do morcego insetívoro *Molossus molossus* no sudeste de Minas Gerais, Brasil, capturados ao longo das quatro estações climáticas anuais, de 2007 a 2008. Após eutanásia dos animais os tecidos foram coletados e preparações histológicas incluídas em metacrilato foram avaliadas sob microscopia de luz. Foi obtida a proporção entre os elementos que constituem o parênquima testicular utilizando-se o software Image Pro Plus. A partir de então diversos parâmetros gonadais foram calculados. O percentual do parênquima testicular ocupado pelos túbulos seminíferos foi significativamente maior no outono e inverno em relação ao verão, refletindo diretamente no percentual ocupado pelo intertúbulo, que por sua vez foi maior no verão em relação ao outono e inverno. O índice tubulossomático foi menor no verão, assim como os percentuais do compartimento tubular ocupados por lúmen e túnica própria, e o diâmetro tubular, que foi menor nesta estação em relação ao outono e inverno e maior no outono em relação à primavera. O percentual dos testículos representado pelo intertúbulo foi maior no verão, assim como o percentual ocupado por células de Leydig (CL) em relação ao outono e inverno. O percentual das CL representado pelo núcleo foi maior no inverno, enquanto o percentual de citoplasma foi menor nesta estação. Observou-se maiores volumes citoplasmáticos e de CL a partir da primavera, com maiores valores no outono. Análises de correlação realizadas entre a morfometria testicular e fatores abióticos ambientais confirmaram a influência de fatores climáticos sobre a reprodução de *M. molossus* machos. O aumento de parâmetros morfométricos tubulares observado no outono, como o diâmetro dos túbulos seminíferos, indica maior atividade espermatogênica nesta estação. O maior investimento em tecido intertubular e em CL no verão e o aumento nos volumes citoplasmático e total de CL no outono indicam maior capacidade androgênica

nestas estações. Embora espermátides alongadas estivessem presentes no lúmen testicular, assim como espermatozóides no epidídimo durante todo o ano, conclui-se que *M. molossus* machos apresentam sazonalidade reprodutiva com alta capacidade espermatogênica no outono e picos de atividade androgênica no verão e outono, comprimento tubular muito acima da média de todos os mamíferos já estudados, uma das maiores proporções de túbulos seminíferos, e padrão testicular característico da maioria dos mamíferos.

## ABSTRACT

MORAIS, Danielle Barbosa. M.Sc. Federal University of Viçosa, August of 2008.

**Testicular morphometry and morphology in insectivorous bat (*Molossus molossus*, Pallas, 1776 Chiroptera: Molossidae).** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-Advisers: Mariella Bontempo Duca Freitas and Tarcízio Antônio Rêgo de Paula.

Testicular morphometric analysis have been implemented in order to infer on the gonadal dynamics and reproductive capacity of the insectivorous bat *Molossus molossus* in the southeast of Minas Gerais, Brazil, collected during the four annual climatic seasons, from 2007 to 2008. After euthanasia animal tissues were collected and included in methacrylate, and histological preparations were evaluated in light microscopy. The ratio between the elements that constitute the testicular parenchyma was obtained using the software Image Pro Plus. So various gonadal parameters were calculated. The percentage of testicular parenchyma occupied by seminiferous tubules was significantly higher in fall and winter for the summer, reflecting directly on the percentage occupied by intertubular compartment, which in turn was higher in the summer for the fall and winter. The tubulosomatic index was lower in summer, as well as the percentage of the tubular compartment occupied by lumen and tunica propria, and the tubular diameter, which was lower in this station for the fall and winter and highest in the fall for the spring. The percentage of testes represented by the intertubular compartment was higher in the summer, as the percentage occupied by Leydig cells (LC) for fall and winter. The percentage of LC represented by the nucleus was greater in winter, while the percentage of cytoplasm was lower in this season. There was greater volume cytoplasmatic and of LC from the spring, with higher values in the fall. Analysis of correlation between the testicular morphometry and abiotic environmental factors confirmed the influence of climatic factors on the reproduction of males *M. molossus*. The increase of various tubular morphometric parameters observed in the fall, as well as the diameter of the seminiferous tubules, indicating increased of spermatogenic activity in this season. The greater investment in intertubular tissue and LC in the summer and the increase in cytoplasmatic and total of LC volume in the fall indicate greater androgenic capacity in those seasons. Although elongated spermatids were present in the



testicular lumen, as well as spermatozoa in the epididymis throughout the year, we concluded that male *M. molossus* presents reproductive seasonality with high spermatogenic capacity in the fall and peaks of androgenic capacity in the summer and fall, tubular length far above the average of all mammals already studied, one of the largest proportions of seminiferous tubules, and testicular pattern characteristic of most mammals.

## 1. INTRODUÇÃO

Morcegos (Mammalia, Chiroptera) são encontrados em todos os continentes, em regiões tropicais e temperadas, sendo reconhecidamente importantes na regulação dos ecossistemas tropicais como a Mata Atlântica. No Brasil constituem o segundo maior grupo de mamíferos em riqueza de espécies (Reis et al., 2007), representando em algumas áreas 50% das espécies de mamíferos (Patterson e Pascual, 1972; Timm, 1994).

Estes animais merecem especial atenção, principalmente por atuar de diversas maneiras no ambiente, seja como dispersores de sementes, ou como agentes polinizadores, agentes controladores de populações de insetos e vetores de zoonoses. Além disso, possuem características exclusivas que os tornam alvo de grande interesse científico, por serem os únicos mamíferos voadores e, portanto, possuem grande facilidade de dispersão e uma fisiologia única adaptada ao vôo. Possuem hábito noturno e apresentam uma diversidade de hábitos alimentares sem precedentes dentre os mamíferos (Altringham, 1998; Reis et al., 2007).

A biologia reprodutiva de morcegos pode ser tão variável quanto os hábitos que eles apresentam. Dependendo de seu tipo de habitat, da localização deste, do abrigo, das condições climáticas e da disponibilidade de alimentos, diferentes espécies apresentam diferentes estratégias reprodutivas (Pirlot, 1967; Dweyr, 1970). É fato ainda que o período reprodutivo seja uma fase crítica para a maioria dos organismos e condições ambientais e fatores endógenos, estão fortemente associados com a reprodução em morcegos (Neuweiler, 2000).

Em regiões tropicais, o ciclo reprodutivo está fortemente associado à estação chuvosa. Fatores climáticos combinados, como temperatura e precipitação pluviométrica, influenciam a disponibilidade de alimento, o que interfere diretamente no ciclo reprodutivo dos morcegos (Fleming et al., 1972; Racey, 1982).

Morcegos insetívoros apresentam padrão reprodutivo tipicamente monoestral. No entanto, em espécies onde a disponibilidade de alimento não está sujeita a variações sazonais, pode-se observar poliestria, com picos de nascimento duas vezes ao ano (Fleming et al., 1972; La Val e Fitch, 1977).

O morcego insetívoro *Molossus molossus* apresenta ampla distribuição pelo Brasil. Fabián e Marques (1989), estudando a biologia reprodutiva desta espécie no estado do Ceará, a definiu como poliéstrica sazonal. Já Pacheco (2001), estudando

a mesma espécie no estado do Rio Grande do Sul, a definiu como monoestral sazonal, citando ainda que os machos apresentavam espermatozoides no epidídimo durante todas as estações do ano.

Não foram encontrados na literatura consultada trabalhos que descrevessem os padrões de espermatogênese nesta espécie no Brasil, ou mesmo em outras áreas de sua ocorrência. O conhecimento da função testicular por meio de medidas morfométricas, aliadas à morfologia das gônadas, permite inferir sobre a dinâmica gonadal e conseqüente capacidade reprodutiva do animal, fornecendo desta forma informações acerca de seu ciclo reprodutivo, bem como sobre sua variação reprodutiva sazonal.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Taxonomia, origem e evolução dos morcegos

Os morcegos pertencem à ordem Chiroptera (do grego *cheir* – mão e *pteron* – asa) (Reis et al., 2007), e constituem um dos grupos de mamíferos mais diversificados do mundo, com 18 famílias, 202 gêneros e 1024 espécies (Simmons, 2005; IUCN, 2008), o que representa aproximadamente 22% das espécies de mamíferos conhecidas atualmente (Wilson e Reeder, 2005).

A ordem Chiroptera é dividida em duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera. Os megaquirópteros ocorrem nas regiões tropicais da África, Índia, sudeste da Ásia e Austrália (Fenton, 1992). Seu peso corporal pode ultrapassar 1,5 Kg, com envergadura de 1,7 a 2 m (Taddei, 1976; Simmons, 2005). Esta subordem compreende apenas a família Pteropodidae, com 42 gêneros e 185 espécies.

Os microchiropteros encontram-se amplamente distribuídos por todo o globo, não ocorrendo apenas nas regiões polares. Envolvem 17 famílias, 157 gêneros e 930 espécies, com variações de peso entre 2 e 200 gramas (Simmons, 2005). No Brasil são conhecidas nove famílias, 64 gêneros e 167 espécies. Representa a segunda ordem em riqueza de espécies dentre os mamíferos, sendo superada apenas pela ordem Rodentia, com 235 espécies habitando todo o território nacional, inclusive áreas urbanas (Reis et al., 2007).

Por apresentarem um esqueleto delicado, pequeno e leve, que não se preserva bem, é difícil encontrar fósseis com informações sobre o período inicial da evolução dos morcegos, além do fato de as condições em florestas não serem favoráveis à fossilização. É aceito que os morcegos tenham surgido há cerca de 80 a 100 milhões de anos, tendo permanecido sem mudanças expressivas em sua arquitetura corpórea. Especula-se que tenham evoluído com o início da diversificação das plantas com flores, que trouxe como consequência a abundância de insetos (Reis et al., 2007).

Da mesma forma, os mamíferos da ordem Insetívora se estabeleceram, e para escapar da pressão de predação exercida por estes, os morcegos teriam desenvolvido hábito noturno, evoluindo de um mamífero pequeno e arborícola. Após milhões de anos saltando atrás de insetos, de árvore a árvore, o processo de seleção natural direcionou para o desenvolvimento de membranas nos membros

anteriores, o que lhes possibilitou planar, até se lançarem ao vôo. Esta estratégia lhes conferiu menor gasto energético do que correndo ou caminhando, além de lhes ter possibilitado escapar de predadores terrestres (Altringham, 1998; Reis et al., 2007).

## 2.2. Características gerais da ordem Chiroptera

Morcegos são encontrados em ambientes naturais e em áreas urbanas, podendo abrigar-se em cavernas, ocos e copas de árvores, entre galhos e folhas de palmeiras e bananeiras, e em áreas urbanas, em construções abandonadas ou não, e forros de telhados. Em geral apresentam alta longevidade se comparados a mamíferos de mesmo porte; enquanto um rato de 40 g vive até dois anos, um morcego vampiro de aproximadamente 30 g pode viver até 20 anos na natureza (Bernard, 2005).

Devido à similaridade facial com raposas, os megachiroptera são conhecidos popularmente como raposas voadoras. Utilizam a visão para navegação, apresentando para tal olhos grandes. Além disto, têm orelhas pequenas e sem o *tragus* (apêndice membranoso na abertura auricular) e não tem ornamentações faciais e nasais, pois não apresentam ecolocalização. Não hibernam e não entram em torpor (Taddei, 1976).

Os microchiroptera, como animais noturnos, têm poucos cones na retina, mas não são cegos. Embora todas as famílias brasileiras usem a ecolocalização para se orientar, alguns frugívoros maiores também se orientam pela visão. Como utilizam primariamente o sistema de ecolocalização, os olhos são pequenos, as orelhas grandes, o *tragus* bem desenvolvido e as ornamentações nasais e faciais muitas vezes estão presentes. Durante o processo de ecolocalização, os morcegos emitem sons de alta frequência pela boca ou pelo nariz, que são refletidos por superfícies do ambiente, indicando a distância relativa dos objetos. Este importante sentido adicional lhes permite localizar suas presas, desviar de obstáculos durante o vôo e se comunicar uns com os outros (Fenton, 1992; Reis et al., 2007).

Apesar de alguns mamíferos conseguirem planar por longas distâncias, os quirópteros são os únicos capazes de realizar o vôo verdadeiro (Fenton, 1992). Esta habilidade é favorecida por seus ossos longos, finos e leves (Kunz e Racey, 1998) e graças à presença de membranas ou patágios, presentes entre as longas falanges

das mãos. Dentre outras especializações da coluna vertebral para o voo, suas vértebras cervicais permitem a manutenção da cabeça erguida durante o voo e o repouso, de modo que o ambiente não pareça invertido (Neuweiler, 2000; Reis et al., 2007).

Apresentam coloração que varia entre tons de preto e pardo, com algumas espécies ruivas ou amarelas. Por serem animais noturnos, uma coloração viva, como observada em alguns *Diclidurus* e *Ectophylla*, de pelagem branca, implica em aumento de predação (Reis et al., 2007).

Apesar de vários animais serem capazes de predação morcegos, como corujas, gaviões, falcões, guaxinins, gatos, cobras, sapos e aranhas grandes, apenas uma águia africana é realmente especializada em se alimentar de morcegos. Há ainda morcegos que se alimentam de espécies diferentes da sua, embora não sejam canibais (Fenton, 1992).

Os morcegos apresentam grande diversidade de hábitos alimentares, existindo espécies frugívoras, insetívoras, piscívoras, polinívoras, nectarívoras, carnívoras, hematófagas e onívoras. Tal flexibilidade alimentar pode ser apontada como causa de seu grande sucesso de colonização (Reis et al., 2007). Deste hábito provém sua grande importância ecológica, como a atuação dos frugívoros como dispersores de sementes, contribuindo para a regeneração de florestas neotropicais (Bredt et al., 1996); os insetívoros como controladores das populações de insetos daninhos a lavouras, transmissores de doenças, e cupins; e os polinívoros e nectarívoros como polinizadores de pelo menos 500 espécies de plantas neotropicais (Vogel, 1969).

Frugívoros da família Phyllostomidae podem ocasionalmente serem considerados prejudiciais aos produtores de frutos, embora Greenhall (1956) e Greenhall et al. (1966) afirmem que estes danos sejam poucos ou de nenhuma importância. Já as espécies hematófagas estão associadas à transmissão do vírus rábico, que é comum nos morcegos-vampiro (*Desmodus rotundus*), mas segundo Constantine (1970), raramente é transmitida ao homem, sendo mais importante relacionada ao gado.

Dentre as mais de mil espécies de morcegos conhecidas, apenas 3 espécies são hematófagas. Porém, erroneamente costuma-se incriminar todas as espécies, e mesmo aquelas benéficas, como os insetívoros ou frugívoros são injustamente exterminadas. Apesar de estarem relativamente livres da ameaça de extinção, o que

provavelmente se deve à sua grande capacidade de dispersão, as espécies brasileiras *Lonchophylla bokermanni*, *L. dekeyseri*, *Platyrrhinus recifinus*, *Lasiurus ebenus* e *Myotis ruber* encontram-se na categoria vulnerável em alguns estados (IBAMA, 2008), ou seja, apesar de não estarem criticamente em perigo, há elevado risco de extinção na natureza em médio prazo (IUCN, 2008).

### **2.2.1. Família Molossidae**

Os animais da família Molossidae caracterizam-se por apresentar a cauda livre, ultrapassando a borda distal do uropatágio e projetando-se em pelo menos um terço de seu comprimento total. Apresentam asas longas e estreitas, cuja envergadura varia entre 240 e 450 mm. Esta característica morfológica corresponde à adaptação ao voo rápido e manobrável (Fabián e Gregorin, 2007). Em molossídeos geralmente há dimorfismo sexual em relação ao tamanho corporal, com os machos maiores que as fêmeas, além de diferenças na morfologia externa das gônadas. São morcegos exclusivamente insetívoros (Fabián e Gregorin, 2007).

Esta família é representada por 26 espécies, distribuídas em 7 gêneros. O gênero *Molossus* ocorre na América do Sul, sendo reconhecidas no Brasil quatro espécies. *Molossus molossus* é encontrada na Flórida (EUA), México, América Central e Caribe, Colômbia, Equador, Venezuela, Suriname, Peru, Brasil, Paraguai, Uruguai e norte da Argentina (Barquez et al., 1988; González, 1989; Koopman, 1993). No Brasil está amplamente distribuída, estando presente nos cinco grandes biomas (Marinho-Filho e Sazima, 1998), com registro para os estados do AM, PA, CE, MA, PE, BA, DF, MT, MS, PR, SC e em todos os estados da região sudeste (Tavarez et al., no prelo). Observações realizadas tanto no nordeste quanto no sul do Brasil indicam que a espécie parece não realizar migrações (Fabián e Gregorin, 2007).

Machos sexualmente maduros apresentam uma glândula bem desenvolvida na região do pescoço, chamada glândula gular (ou glândula hedônica). Acredita-se que esteja relacionada com a atração sexual, demarcação de território e locais de abrigo (Taddei et al., 2001). O tamanho e a atividade secretória dessa glândula são cíclicos, alcançando picos durante o início da primavera coincidindo com o acasalamento sazonal (Davis et al., 1962).

A espécie *Molossus molossus* apresenta pelagem dorsal aveludada e coloração que varia de castanho escuro a enegrecida, sendo que alguns indivíduos podem apresentar-se marrom-avermelhados (Figura 1). A base dos pelos é mais clara e a coloração ventral um pouco mais clara que a dorsal (Fabián e Gregorin, 2007).

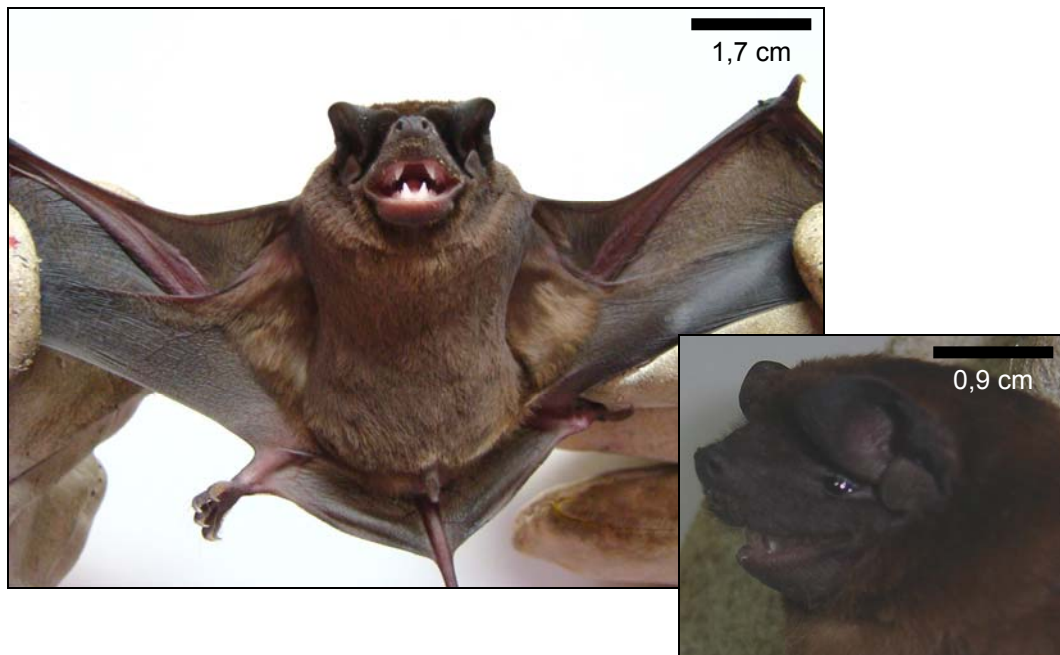


Figura 1. *Molossus molossus* macho coletado na Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil. Moraes, 2008.

### 2.3. Características reprodutivas dos morcegos

Morcegos apresentam em geral os mais variados padrões de atividade reprodutiva. Como fatores ambientais interferem diretamente em seu ciclo reprodutivo, uma mesma espécie pode comportar-se de diferentes maneiras, dependendo da área de sua ocorrência e das condições climáticas que lá predominam (Altringham, 1998; Neuwiler, 2000).

Segundo Fleming et al. (1972) e Wilson (1979), os morcegos da região tropical apresentam padrão reprodutivo sazonal, que é o que ocorre na família Molossidae. Desenvolve-se freqüentemente um filhote por gestação, sendo que algumas espécies podem apresentar dois ou três, e raramente quatro filhotes (Carter, 1970; Fabián e Marques, 1989; Reis et al., 2007). A gestação pode durar de



44 dias a 11 meses, dependendo da espécie. Os nascimentos ocorrem em época de maior oferta de alimentos (Reis e Peracchi, 1987) e o cuidado parental dura cerca de 3 meses (Reis et al., 2007).

Fêmeas de *M. molossus* foram classificadas por Fabián e Marques (1989) como poliestrais sazonais no estado do Ceará, apresentando dois períodos reprodutivos por ano, na estação úmida. Pacheco (2001) as definiu como monoestrais sazonais com ciclo longo no Rio Grande do Sul, com período de gestação de 90-110 dias. Estes resultados demonstram clara influência das condições climáticas sobre o ciclo reprodutivo desta espécie. Nos dois estudos, desenvolveu-se apenas um filhote por gestação.

Uma estratégia reprodutiva comum entre estes animais é o sistema de acasalamento poligínico, onde um macho defende um harém, não permitindo que outros machos se aproximem, e este macho dominante pode então copular com várias fêmeas (Bradbury e Vehrencamp, 1977; Altringham, 1998). A poliginia é provavelmente o sistema de acasalamento que prevalece entre morcegos (Nowak, 1994), embora possam também ser observados os sistemas de acasalamento dos tipos monogâmico e promíscuo, dependendo da região e da espécie (Nowak, 1994; Altringham, 1998). O tamanho do harém é variável, dependendo da espécie e do grupo. Segundo Bradbury e Vehrencamp (1977), o morcego neo-tropical *Saccopteryx bilineata*, por exemplo, pode formar haréns compostos de um macho para oito fêmeas, em um grupo de cerca de 40 morcegos.

Segundo Bonaccorso (1979) e Happold e Happold (1990), a atividade reprodutiva de quirópteros está diretamente vinculada ao clima e à disponibilidade de alimentos. As espécies que dependem da sazonalidade são classificadas em sazonal monoestral e sazonal poliestral, ou poliestral anual. Aquelas espécies que não dependem de sazonalidade são denominadas assazonais e, neste caso, estão freqüentemente relacionadas ao comportamento dos machos (Pacheco, 2001).

É amplamente relatado que os testículos de morcegos tropicais passam por migrações sazonais entre o abdômen e o escroto (Krutzsich, 1955; Marshall e Corbet, 1959; Krutzsich e Crichton, 1987; Jolly e Blakshaw, 1988; Pacheco, 2001), a fim de adequar os testículos às flutuações sazonais de temperatura às quais estão expostos. Segundo Jolly e Blakshaw (1988), existe uma alta correlação entre a máxima temperatura ambiental e o número de espermatogônias, sugerindo que a temperatura pode exercer íntima influência sobre a reprodução do morcego

insetívoro *Taphozous georgianus*, na Austrália. A influência da temperatura sobre seu ciclo reprodutivo permitiu classificar estes machos como assazonais, já que apresentaram atividade espermatogênica contínua

Para Beasley e Zucker (1984), a temperatura em certas épocas do ano exerce maior influência sobre o ciclo reprodutivo de morcegos que o fotoperíodo. Racey (1978) não observou influência do fotoperíodo sobre o ciclo reprodutivo de *Pipistrellis pipistrellis* e *T. georgianus* em cativeiro.

Bernard (1986) observou variação sazonal na atividade secretora de células de Leydig no morcego hibernante *Rhinolophus capensis*, de modo que a espermiogênese esteve associada com o período de maior atividade dessas células, o que foi confirmado pelo pico na concentração plasmática de testosterona, ocorrendo do final do inverno ao início do verão sul-africanos. Variações na atividade secretora de células de Leydig em morcegos também foram observadas por Racey e Tam (1974), Gustafson e Shemesh (1976) e Gustafson (1987).

#### **2.4. Testículo**

A habilidade reprodutiva dos machos sexualmente maduros depende da capacidade dos testículos em produzir grande número de espermatozóides viáveis e de concentrações adequadas de andrógenos para libido e maturação dos órgãos reprodutivos (Gier e Marion, 1970).

O testículo é um órgão com funções exócrina e endócrina, geralmente localizado no escroto e envolvido por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, a albugínea testicular. Esta túnica, de maneira variada nas diferentes espécies de mamíferos, emite septos para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, dividindo o testículo em lóbulos nem sempre aparentes (Russell et al., 1990).

Funcionalmente o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos principais: o compartimento intertubular ou intersticial, e o compartimento dos túbulos seminíferos, ou tubular (Russell et al., 1990). Os elementos que compõem o compartimento intertubular são as células de Leydig, vasos sangüíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável do tecido conjuntivo, constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Russell et al., 1990; Setchell, 1991).

O compartimento dos túbulos seminíferos constitui a maior parte do testículo ocupando, na grande maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (França e Russell, 1998; França e Godinho, 2003). Estes túbulos formam alças bastante contorcidas, as quais possuem suas duas extremidades conectadas à rede testicular, que se encontra localizada numa região bastante rica em vasos e tecido conjuntivo, denominada mediastino testicular. A partir desta região, a rede testicular encontra-se conectada ao epidídimo através dos ductos eferentes (Russell et al., 1990).

Os túbulos seminíferos são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular. A túnica própria reveste o túbulo externamente, sendo composta de células mióides ou peritubulares e membrana basal. No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares de origem embriológica distinta: as células germinativas originárias do epiblasto e as células de Sertoli provenientes do epitélio celomático (Karl e Capel, 1998).

Juntamente com as células mióides, as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas que se encontram na porção basal do epitélio seminífero. As células de Sertoli, através de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois ambientes: o ambiente basal, onde se localizam as espermatogônias e os espermátócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (pré-leptótenos), e o ambiente adluminal, no qual se encontram os espermátócitos primários a partir da fase de leptóteno, espermátócitos secundários e espermátides. Desta forma, o ambiente adluminal está totalmente sob o controle das células de Sertoli, propiciando um microambiente isolado e protegido da ação do sistema imune, essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Setchell, 1991; Poccia, 1994; Sharpe, 1994). No lúmen tubular se encontram o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozóides recém espermiados.

Medidas morfométricas testiculares são empregadas com a finalidade de se conhecer a proporção dos elementos que constituem o parênquima testicular, bem como índices quantitativos de produção espermática e o desenvolvimento de células, de túbulos seminíferos e do epitélio seminífero. Apesar da estrutura geral do testículo seguir um padrão relativamente rígido para as diversas espécies de mamíferos, existem muitas variações no que concerne à proporção volumétrica

entre túbulos seminíferos e o compartimento intertubular. E neste segundo compartimento, pode-se ainda observar grande variação entre seus componentes (Russell et al., 1990).

Mensurações do diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero fornecem dados relevantes para a avaliação da eficiência espermatogênica. Existe grande variação no número e nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos nas diferentes espécies de mamíferos (França e Russell, 1998). O camundongo, por exemplo, possui aproximadamente 20 túbulos seminíferos por testículo perfazendo no total cerca de 2 metros de comprimento tubular por testículo (Bascom e Ostrud, 1925). Já no suíno doméstico existem de várias centenas a alguns poucos milhares de túbulos seminíferos por testículo e aproximadamente 3000 metros de túbulos no total (França e Russell, 1998).

De maneira geral, o valor observado para o diâmetro tubular na grande maioria das espécies de mamíferos está em torno de 180 $\mu$ m a 300 $\mu$ m (Roosen-Runge, 1977). O comprimento tubular depende do volume dos testículos, da proporção volumétrica dos túbulos seminíferos e do diâmetro tubular. A quantificação métrica do túbulo seminífero por unidade de massa testicular, diferente da quantificação total, é um parâmetro produtivo que permite a comparação entre animais de diferentes portes (Sarti, 2006).

## **2.5. Espermatogênese**

A espermatogênese é um processo complexo e bem organizado que ocorre nos túbulos seminíferos e dura de 40 a 60 dias, na maioria dos mamíferos investigados (França e Russell, 1998). Este processo pode ser dividido em três fases, baseado em considerações morfológicas e funcionais: (1) fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as células sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; (2) fase meiótica ou espermatocitogênica, na qual o material genético é duplicado, passa por duas divisões celulares sucessivas e por recombinação genética durante a meiose; e (3) fase de diferenciação ou espermiogênica, na qual as espermátides sofrem marcantes modificações, transformando-se em células muito especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos, os espermatozóides (Russell et al., 1990). Cada uma destas fases dura aproximadamente 1/3 do processo espermatogênico.

De maneira geral, nos animais sexualmente maduros as espermatogônias podem ser classificadas em duas categorias básicas: espermatogônias indiferenciadas e diferenciadas (De Rooij, 1998). As espermatogônias isoladas (Ai), pareadas (Apr) e alinhadas (Aal) pertencem à primeira categoria, enquanto as espermatogônias do tipo A, intermediárias (In) e espermatogônias do tipo B pertencem à categoria das diferenciadas, estando comprometidas de forma irreversível com a formação de espermatozóides. Vale ressaltar que existem consideráveis diferenças em relação ao número de gerações de espermatogônias diferenciadas nas diversas espécies de mamíferos. No entanto, este número não ultrapassa seis gerações (Russell et al., 1990; França e Russell, 1998; De Rooij e Grooten, 1998).

Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, as células espermatogênicas não estão arranjadas ao acaso, mas sim organizadas numa série bem definida de associações celulares ou estádios. Com exceção de algumas espécies de primatas, o arranjo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é segmentar em todos os mamíferos investigados e usualmente existe somente um estádio por secção transversal de túbulo seminífero (Leblond e Clermont, 1952; Russell et al., 1990). Os estádios se sucedem numa determinada área do epitélio seminífero com o decorrer do tempo. Esta seqüência, assim ordenada, constitui o processo denominado ciclo do epitélio seminífero (Leblond e Clermont, 1952; Ortavant et al., 1977; Russell et al., 1990). Dentre os sistemas utilizados para se estudar os estádios do ciclo do epitélio seminífero, o mais empregado é aquele baseado na forma e na localização dos núcleos das espermátides e na presença de figuras de divisões meióticas (Roosen-Runge e Giesel Jr., 1950; Courot et al., 1970; Guerra, 1983; França, 1991). Este sistema, designado como método da morfologia tubular por Berndtson (1977), permite a divisão de oito estádios por ciclo em mamíferos.

## **2.6. Células de Leydig**

A célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais freqüente do compartimento intertubular. Esta célula apresenta marcante produção de andrógenos, os quais são sintetizados a partir de uma molécula lipídica base, o colesterol (Bardin, 1996). Dentre os andrógenos incluem-se a diidrotestosterona, que

é responsável pela diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa (uretra, próstata, pênis e escroto) (Gilbert, 2006) e a testosterona, responsável pela masculinização do feto, com o desenvolvimento da genitália interna (vesícula seminal, vaso deferente e epidídimo) e pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e manutenção da espermatogênese a partir da puberdade (Sharpe, 1994; Zirkin et al., 1994; Gilbert, 2006).

Sua população varia de acordo com a espécie e idade, podendo ainda passar por alterações quantitativas consideráveis em espécies cujo ciclo reprodutivo é sazonal, visto que fora do período reprodutivo os níveis de andrógenos encontram-se reduzidos a valores basais, aumentando gradativamente no período de recrudescência testicular, até entrar novamente no período reprodutivo. Vários autores citam alterações morfológicas e secretórias das células de Leydig em morcegos sazonais (Racey e Tam, 1974; Gustafson e Shemesh, 1976; Loh e Gemmell, 1980; Bernard, 1986; Gustafson, 1987).

Gustafson (1987) descreveu alterações na histologia das células de Leydig no morcego insetívoro *Myotis lucifugus lucifugus* no nordeste dos Estados Unidos, correlacionadas às variações sazonais nas concentrações plasmáticas de testosterona. Neste estudo, observou-se que durante o período de hibernação (outubro a abril) o epitélio germinativo dos túbulos seminíferos é reduzido a espermatogônias de reserva e células de Sertoli. Com a retomada da atividade espermatogênica, na primavera, as células de Leydig tornam-se hipertrofiadas e acumulam inclusões lipídicas, seguido pelo pico na concentração de testosterona plasmática.

Loh e Gemmell (1980) relatam alterações na ultra-estrutura destas células no morcego australiano *Myotis adversus*, notando que as células de Leydig tornaram-se hipertrofiadas durante a estação reprodutiva, enquanto que durante o período de regressão testicular o tamanho celular e o número de grânulos citoplasmáticos são significativamente reduzidos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar, à partir da morfometria testicular, a atividade espermatogênica e consequentemente a capacidade reprodutiva de morcegos da espécie *Molossus molossus*, coletados na região do município de Viçosa, sudeste do estado de Minas Gerais, ao longo das diferentes estações climáticas anuais, a fim de determinar a presença ou ausência de variação reprodutiva sazonal.

#### 3.2. Objetivos específicos

Realizar as seguintes análises morfométricas:

- Proporção entre túbulos seminíferos e intertúbulo;
- Proporção volumétrica e volume dos componentes do parênquima testicular;
- Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero;
- Comprimento dos túbulos seminíferos por testículo, por grama de testículo e comprimento total dos túbulos seminíferos;
- Índice Gonadossomático (IGS);
- Índice Tubulossomático (ITS);
- Índice Leydigossomático (ILS);
- Proporção nucleoplasmática de células de Leydig;
- Volume nuclear, citoplasmático e celular de Leydig;
- Número total de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altringham, J.D., 1998. **Bats: Biology and behavior**. University Press, Oxford, 262 p.

Bardin, C.W., 1996. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: Payne, A. H.; Hardy, M. P., Russell, L. D. (Eds.). **The Leydig cell**. Cache River Press, Vienna, pp. 31-42.

Barquez, R.M., 1988. Notas on identity, distribution and ecology of some Argentine bats. **Journal of Mammalogy**. 69(4): 873-876.

Bascom, K.F., Ostrud, H.L., 1925. Quantitative studies of testicle. II. Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. **Anatomical Record**. 31: 159-169.

Beasley, L.J., Zucker, I., 1984. Photoperiod influences the annual reproductive cycle of the male pallid bat (*Antrozous pallidus*). **Journal of Reproduction and Fertility**. 70: 567-573.

Bernard, E., 2005. Morcegos vampiros: sangue, raiva e preconceito. **Ciência Hoje**. 36(214): 44-49.

Bernard, R.T.F., 1986. Seasonal changes in plasma testosterone concentrations and Leydig cell and accessory gland activity in the Cape horsehoe bat (*Rhinolophus capensis*). **Journal of Reproduction and Fertility**. 78: 413-422.

Berndtson, W.E., 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **International Journal of Andrology**. 13(4): 315-326.

Bonaccorso, F.J., 1979. Foraging and reproductive ecology in a Panamanian bat community. **Bulletin of the Florida State Museum, Biological Sciences**. 24: 359-408.



Bradbury, J.W., Vehrencamp, S.L., 1977. Social organization and foraging in emballonurid bats. I. Field studies. **Behavioral, Ecology and Sociobiology**. 1: 337-81.

Bredt, A., Araújo, F.A.A., Caetano-Júnior, J., Rodrigues, M.G.R., Yoshizawa, M., Silva, M.M.S., Massunaga, P.N.T., Bürer, S.P., Potro, V.A.R., Uieda, W., 1996. **Morcegos em áreas urbanas e rurais: manuais de manejo e controle**. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, 117 p.

Carter, D.C., 1970. Chiropteran reproduction. In: Slaughter, B. H. & Walton, D. W. (Eds.). **About bats: A chiropteran biology symposium**. Dallas, Southern Methodist University Press, pp. 233-246.

Constantine, D.G., 1970. Bats in relation to the health, welfare and economy of man. In: Winsatt, W.A. (Ed.). **Biology of Bats**. Academic Press, New York, pp. 319-499.

Courot, M., Hochereau-De-Reviere, M.T., Ortavant, R., 1970. Spermatogenesis. In: Johnson, A.D., Gomer, W.R., Vandemark, N.L. (Eds.). **The testis**. Academic Press, New York, pp. 399-432.

Davis, D.E., Herreid, C.F., Short, H.L., 1962. Mexican free-tailed bat in Texas. **Ecological Monography**. 32: 311-346.

De Rooij, D.G., 1998. Stem cells in the testis. **International Journal of Experimental Pathology**. 70: 67-80.

De Rooij, D.G., Grootegoed, J.A., 1998. Spermatogonial stem cells. **Current Opinion in Cell Biology**. 10: 694-701.

Dweyr, P.D. 1970. Latitude and breeding season in a polyestrus species of *Myotis*. **Journal of Mammalogy**, 51(2): 405-410.

Fabián, M.E., Gregorin, R., 2007. Família Molossidae. In: Reis, N. R, Peracchi, A. L., Pedro, W. A., Lima, I. P. (Eds.). **Morcegos do Brasil**. Editora da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, pp. 149-165.

Fabián, M.E., Marques, R.V., 1989. Contribuição ao conhecimento da biologia reprodutiva de *Molossus molossus* (Pallas, 1766) (Chiroptera, Molossidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. 6(4): 603-610.

Fenton, M.B., 1992. **Bats**. Facts On File, New York, 207 p.

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

França, L.R., 1991. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 180p.

França, L.R., Godinho, C.L., 2003. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). **Biology of reproduction**. 68: 1554-1561.

França, L.R., Russell, L.D., 1998. The testis of domestic mammals. In: Regadera, J., Martinez-Garcia, F. (Eds.). **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. Churchill Livingstone, Madrid, pp.197-219.

Gier, H.T., Marion, G.B., 1970. Development of mammalian testis. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Van Der Mark, N.L. (Eds.). **The testis**. Academic Press, Londres, pp. 2-45.

Gilbert, F.S., 2006. **Developmental Biology**. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, 751 p.

González, J.C., 1989. Guia para la identificación de los murciélagos del Uruguay. **Museo Damaso Antonio Larrañaga**, 2: 1-50.

Greenhall, G.G., 1956. The food of some Trinidad fruit bats (*Artibeus* and *Carollia*). **Journal of Agricultural Society of Trinidad & Tobago**. 896: 1-25.

Greenhall, A.M., Schutt Jr., W.A., 1966. *Diaemus youngi*. **Mammalian species**. Facts on File, New York, pp. 1-7.

Guerra, M.O., 1983. Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados da literatura. **Revista Brasileira de Biologia**. 43(4): 385-394.

Gustafson, A.W., 1987. Changes in Leydig cell activity during the annual testicular cycle of the bat *Myotis lucifugus lucifugus*: histology and lipid histochemistry. **American Journal of Anatomy**. 178(4): 312-325.

Gustafson, A.W., Shemesh, M., 1976. Changes in plasma testosterone levels during the annual reproductive cycle of the hibernating bat *Myotis lucifugus lucifugus* with a survey of plasma testosterone levels in adult male vertebrates. **Biology of Reproduction**. 15: 9-24.

Happold, D.C.D., Happold, M., 1990. Reproductive strategies of bats in Africa. **Journal of Zoology**. 222: 557-583.

IBAMA, 2008. **Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção**. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm>. Acesso em junho de 2008.

IUCN - International Union for Conservation of Nature., 2008. **IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em junho de 2008.

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

Karl, J., Capel, B., 1998. Sertoli cells of mouse testis originate from the coelomic epithelium. **Developmental Biology**. 203: 323-333.

Koopman, K.F., 1993. Order Chiroptera. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.). **Mammalian species of the World, a taxonomic and geographic reference**. Smithsonian Institution Press, Washington, pp. 137-241.

Krutzsch, P.H., 1955. Observations on the Mexican free-tailed bat, *Tadarida mexicana*. **Journal of Mammalogy**. 36: 236-242.

Krutzsch, P.H., Crichton, E.G., 1987. Reproductive biology of the male little mastiff bat, *Mormopterus planiceps* (Chiroptera: Molossidae), in southeast Australia. **American Journal of Anatomy**. 178(4): 352-68.

Kunz, T.H., Racey, P.A., 1998. **Bat biology and conservation**. Washington: Smithsonian Institution Press, 362 p.

La Val, R.K., Fitch, H.S., 1977. Structure, movement and reproduction in three Costa Rica bat communities. **Occasional Paper Museum of Nature History University Kansas**. 69: 1-28.

Leblond, C.P., Clermont, Y., 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 55: 548-584.

Loh, H.S.F., Germmell, R.T., 1980. Changes in the fine structure of the testicular Leydic cells of the Seasonally-breeding bat, *Myotis adversus*. **Cell Tissue Research**. 210: 339-347.

Marinho-Filho, J.S., Sazima, I. 1998. Brazilian bats and conservation biology: a first survey. In: Kunz, T.H., Racey, P.A. (Eds.). **Bat biology and conservation**. Smithsonian Institution Press, Washington, 362 p.

Marshall, A.J., Corbet, P.S., 1959. The breeding biology of equatorial vertebrates: reproduction of the bat *Chaerephon hindei* Thomas at latitude 0°26'N. **Proceedings of the Zoological Society**. 132: 607-616.

Neuweiler, G., 2000. **The biology of bats**. Oxford University Press, Oxford, 310 p.

Nowak, R. M., 1994. **Walker's Bats of the world**. Johns Hopkins University Press, London, 287 p.

Ortavant, R., Courot, M., Hochereau-De-Reviers, M. T., 1977. Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole, H.H. & Cupps, P.T. (Eds.). **Reproduction in domestic animals**. Academic Press, New York, pp. 203-227.

Pacheco, S.M. 2001. *Biologia Reprodutiva, Desenvolvimento Pré e Pós-Natal e Maturidade Sexual de Morcegos da Região Sul, Brasil (Chiroptera, Phyllostomidae, Vespertilionidae, Molossidae)*. **Tese (Doutorado)**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 115 p.

Patterson, B., Pascual, R., 1972. The fossil mammal fauna of South America. In: Keast, A., Erik, F.C., Glass, B. (Eds.). **Evolution, mammals and southern continents**. State University New York Press, Albany, 543 p.

Pirlot, P., 1967. Periodicite de la reproduction chez les chiropteres neotropicaux. **Mammalia**. 31(3): 361-366.

Poccia, D., 1994. Molecules of the somatic cells. In: Poccia, D. (Ed.). **Molecular biology intelligence unit, molecular aspects of spermatogenesis**. R.G. Landes Company, Austin, pp.75-90.

Racey, P.A., 1978. The effect of photoperiod on the initiation of spermatogenesis in pipistrelle bats, *Pipistrellis pipistrellis*. In: **Proceedings of the 4th National Bat Research Conference**, Kenya National Academy of Arts and Sciences, Nairobi.

Racey, P.A., 1982. Ecology of bat reproduction, In: Kunz, T.H. (Ed.). **Ecology of bats**. Plenum Press, New York and London, pp. 57-104.

Racey, P.A., Tam, W.H., 1974. Reproduction in male *Pipistrellus pipistrellus* (Mammalia: Chiroptera). **Journal of Zoology**. 172: 101.

Reis, N.R., Peracchi, A.L., 1987. Quirópteros da região de Manaus, Amazonas, Brasil (Mammalia, Chiroptera). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Zoologia**. 3(2): 161-182 p.

Reis, N.R., Peracchi, A.L., Pedro, W.A., Lima, I.P., 2007. **Morcegos do Brasil**. Editora da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 256 p.

Roosen-Runge, E.C., 1977. **The process of spermatogenesis in animals**. Cambridge: Academic Press, 123 p.

Roosen-Runge, E.C., Giesel Jr.L.O., 1950. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. **American Journal of Anatomy** 87(1): 1-30.

Russell, L.D., Ettlín, R.A., Sinha Hikim, A.P., Clegg, E.D., 1990. Mammalian spermatogenesis. In: Russell, L.D., Ettlín, R. A., Sinha Hikim, A. P., Clegg, E. D. (Eds). **Histological and histopathological evaluation of the testis** Cache River Press, Clearwater, Florida, pp. 1-40.

Sarti, P., 2006. Avaliação morfométrica do testículo e da espermatogênese de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) adultas. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 56 p.

Setchell, B.P., 1991. Male reproductive organs and semen. In: Cupps, P.T. (Ed.). **Reproduction in Domestic Animals**. Academic Press, Inc., San Diego, pp. 221-250.

Sharpe, R.M., 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E.; Neill, J. D. (Eds.). **The physiology of reproduction**. Raven Press, New York, pp.1363-1434.

Simmons, N.B., 2005. Order Chiroptera. In: Wilson, D. E. & Reeder, D. M. (Eds.). **Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference**. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 312-529.

Taddei, V.A. 1976., The reproduction of some Phyllostomidae (Chiroptera) from the northwestern region of state of São Paulo. **Boletim de Zoologia da USP**. 1: 313-330.

Taddei, V.A., Dourado, D.M., Jardim, M.I.A., Souza, C.C., Buccini, D.F., Puchério, A., Meneguelli, M., Souza, H.A., 2001. Estudo histológico e histoquímico da glândula gular da espécie de morcego *Molossus molossus*. **Ensaio e Ciência**. 5(2): 141-149.

Tavarez, V.C., Gregorin, R., Peracchi, A.L. Sistemática: a diversidade de morcegos do Brasil. In: Pacheco, S. M., Marques, R. V., Esbérard, C. E. L. (Eds.). **Morcegos no Brasil: biologia, sistemática, ecologia e conservação**. (No prelo).

Timm, R.M., 1994. The mammal fauna. In: McDade, L.A., Bawa, K.S., Hespenheide, H.A., Hartshorn, G.S. (Eds.). **La Selva: Ecology and natural history of a neotropical rain forest**. University of Chicago Press, Chicago, pp. 229-237.

Vogel, S., 1969. Chiropterophilie in der neotropischen Flora. Neue Mitteilungen III,II. Spezieller Teil (Fortsetzung). **Flora, Abstract (Jena)**, 158: 289-323.

Wilson, D.E., 1979. Reproductive patterns. In: Baker, R. J., Jones, J. R., Carter, D. C. (Eds.). **Biology of bats of the New World family Phyllostomidae**. Part III. Special Publication of the Museum Texas Tech University. 16: 317-318.

Wilson, D.E., Reeder, D.M., 2005. **Mammal species of the world: taxonomic and geographic reference**. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2181 p.

Zirkin, B.R., Awoniyi, C., Griswold, M.D., Russell, L.D., Sharpe, R., 1994. Is FSH required for adult spermatogenesis? **Journal of Andrology**. 15: 273-276.

### **Morfologia e morfometria sazonal do compartimento tubular dos testículos de *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae)**

#### **Resumo**

Foram capturados 19 morcegos *Molossus molossus* machos adultos no município de Viçosa, Minas Gerais, ao longo das quatro estações climáticas anuais, e análises morfométricas testiculares foram aplicadas a fim de inferir sobre a dinâmica gonadal e capacidade reprodutiva da espécie. Após eutanásia, os tecidos foram coletados e secções histológicas incluídas em metacrilato foram avaliadas sob microscopia de luz, utilizando-se o software Image Pro Plus. Obteve-se o percentual representado pelos elementos que constituem o parênquima testicular, calculando-se então diversos parâmetros morfométricos tubulares. O menor índice gonadossomático foi atingido no verão, com 0,33%. O percentual do parênquima testicular ocupado por túbulos seminíferos foi significativamente maior no outono e inverno em relação ao verão, com 90,49%, 92,38% e 85,54%, respectivamente. O índice tubulossomático também foi menor no verão, com 0,25%, assim como os percentuais tubulares ocupados por lúmen e túnica própria, com 6,73% e 1,51%, respectivamente. O diâmetro tubular foi menor no verão, com 133,23 $\mu$ m, em relação ao outono e inverno, com 160,87 $\mu$ m e 155,44 $\mu$ m respectivamente, e maior no outono em relação à primavera, com 139,50 $\mu$ m. O comprimento médio dos túbulos seminíferos por grama de testículo, considerando-se todas as estações, foi de 48m. Análises de correlação realizadas entre a morfometria testicular e fatores abióticos ambientais confirmaram a influência de fatores climáticos sobre a reprodução de *M. molossus* machos. A redução nos percentuais de túnica própria no verão pode indicar menor movimento de fluidos através dos túbulos seminíferos nesta estação, e a diminuição no percentual de lúmen parece refletir uma menor atividade do epitélio como um todo. Conclui-se que *M. molossus* machos apresentam sazonalidade reprodutiva com alta capacidade espermatogênica no outono, comprimento tubular muito acima da média de todos os mamíferos já estudados, uma das maiores proporções de túbulos seminíferos, e padrão testicular característico da maioria dos mamíferos.

Palavras-chave: Sazonalidade reprodutiva, morcegos, túbulos seminíferos, espermatogênese, índice gonadossomático.



## **Morphology and seasonal morphometry of the tubular compartment of *Molossus molossus* testes (Chiroptera: Molossidae)**

### **Abstract**

Were captured 19 adult male bats *Molossus molossus* in Viçosa, Minas Gerais, along the four climatic seasons annually. Testicular morphometric analysis was applied to infer about the gonadal and reproductive capacity of the specie. After euthanasia, animal tissues were collected and included in methacrylate, and histological sections were evaluated in light microscope, using the software Image Pro Plus. It was obtained the percentage represented by the elements of the testicular parenchyma, and estimated various tubular morphometric parameters. The lower gonadosomatic index was found in the summer, with 0.33%. The percentage of testicular parenchyma occupied by seminiferous tubules was significantly higher in the fall and winter for the summer, with 90.49%, 92.38% and 85.54%, respectively. The tubulosomatic index was also lower in summer, with 0.25% as well as the percentage of the compartment occupied by tubular lumen and tunic propria, with 6.73% and 1.51% respectively. The tubular diameter was lower in summer, with 133.23 $\mu$ m, in relation to the fall and winter with 160.87 and 155.44 $\mu$ m, respectively, and higher in fall in relation to the spring, with 139.50 $\mu$ m. The average length of the seminiferous tubules per gram of testis, considering all seasons, was 48m. Analysis of correlation between the testicular morphometry and abiotic environmental factors confirmed the influence of climatic factors on the reproduction of *M. molossus* males. The reduction in the percentage of tunica propria in the summer may indicate a lower fluid movement through the seminiferous tubules in this season, and the reduction in the percentage of lumen seems to reflect a lower activity of the epithelium as a whole. We conclude that male *M. molossus* shows reproductive seasonality with high spermatogenic capacity in the fall, length tubular far above the average of all mammals already studied, one of the largest proportions of seminiferous tubules and testicular pattern characteristic of most mammals.

Key-words: Reproductive seasonality, bat, seminiferous tubule, spermatogenesis, gonadosomatic index.

## 1. INTRODUÇÃO

Morcegos (Mammalia, Chiroptera) são encontrados em todos os continentes, exceto nas regiões polares, sendo reconhecidamente importantes na regulação dos ecossistemas tropicais como a Mata Atlântica. No Brasil constituem o segundo maior grupo de mamíferos em riqueza de espécies (Reis et al., 2007), representando em algumas áreas 50% das espécies de mamíferos (Patterson e Pascual, 1972; Timm, 1994).

O morcego insetívoro *Molossus molossus* apresenta ampla distribuição pelo Brasil. Fabián e Marques (1989), estudando a biologia reprodutiva desta espécie no estado do Ceará, a definiram como poliestral sazonal. Pacheco (2001), estudando a mesma espécie no estado do Rio Grande do Sul, a definiu como monoestral sazonal. Em ambos os estudos os machos apresentaram espermatozóides no epidídimo durante todas as estações do ano.

O período reprodutivo é uma fase crítica para a maioria dos organismos, e condições ambientais e fatores endógenos estão fortemente associados com a reprodução em morcegos (Neuweiler, 2000). Em regiões tropicais, o ciclo reprodutivo está fortemente associado à estação chuvosa. Fatores climáticos combinados, como temperatura e precipitação pluviométrica, influenciam a disponibilidade de alimento, o que interfere diretamente no ciclo reprodutivo dos quirópteros (Fleming et al., 1972; Racey, 1982).

A habilidade reprodutiva dos machos sexualmente maduros depende da capacidade dos testículos em produzir grande número de espermatozóides viáveis e de concentrações adequadas de andrógenos para libido e maturação dos órgãos reprodutivos (Gier e Marion, 1970). O testículo é um órgão com funções exócrina e endócrina, geralmente localizado no escroto e envolvido por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, a albugínea testicular. Funcionalmente o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos principais: o compartimento dos túbulos seminíferos, ou tubular, e o compartimento intertubular ou intersticial (Russell et al., 1990).

A rede testicular, ou *rete testis*, é conectada ao epidídimo pelos ductos eferentes. Estes estão relacionados à absorção de fluidos, endocitose, secreção de glico-conjugados e enzimas, existindo ainda evidência de secreção apócrina (Robaire e Hermo, 1988; Ilio e Hess, 1994). É conhecido também o papel do epitélio

dos ductos eferentes na fagocitose de espermatozoides como resposta a condições patológicas e anormalidades espermáticas (Goyal, 1982; Hess, 2002).

Análises morfométricas testiculares são empregadas a fim de se conhecer a proporção dos elementos que constituem o parênquima testicular, bem como índices quantitativos de produção espermática e o desenvolvimento de células, de túbulos seminíferos e do epitélio seminífero. Apesar da estrutura geral do testículo seguir um padrão relativamente rígido para as diversas espécies de mamíferos, existem muitas variações no que concerne à proporção volumétrica entre túbulos seminíferos e o compartimento intertubular. Além disso, mensurações do diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero fornecem dados relevantes para a avaliação da eficiência espermatogênica. São relatadas variações no percentual e nas dimensões (diâmetro, comprimento e volume) dos túbulos seminíferos nas diferentes espécies de mamíferos, o que contribui para as diferenças observadas quanto à eficiência da produção espermática nas várias espécies (França e Russell, 1998).

Diversos trabalhos acerca da função testicular em morcegos avaliam ainda a presença ou ausência de espermatozoides no lúmen epididimal, a fim de detectar se o animal encontra-se ou não em fase reprodutiva (Beasley e Zucker, 1984; Van der Merwe e Rauntentbach, 1987; Jolly e Blackshaw, 1988; Fabián e Marques, 1989).

Não foram encontrados trabalhos que descrevessem os padrões de espermatogênese de *M. molossus* no Brasil, ou mesmo em outras áreas de sua ocorrência. Este estudo objetivou o conhecimento da função testicular por meio da aplicação de análises morfométricas, aliadas à morfologia das gônadas, a fim de inferir sobre a dinâmica gonadal e conseqüente capacidade reprodutiva do animal, fornecendo, desta forma, informações acerca de seu ciclo reprodutivo, bem como sobre sua variação reprodutiva sazonal.

## **2. MATERIAL & MÉTODOS**

### **2.1. Área de estudo**

Foram realizadas coletas no sudeste do estado de Minas Gerais, Brasil, na região do município de Viçosa (20°45'14"S e 42°52'53"W), o qual localiza-se a uma altitude média de 648,74 metros. Trata-se de uma região caracteristicamente montanhosa, inserida no bioma da Mata Atlântica cujo clima é do tipo Cwa

(mesotérmico, úmido com verões chuvosos e invernos secos, pela baixa precipitação pluviométrica).

Foram obtidas informações referentes às condições climáticas do município no período de coletas, que compreendeu de Janeiro de 2007 a Maio de 2008, a fim de correlacionar os fatores abióticos temperatura, precipitação pluviométrica, fotoperíodo e umidade relativa do ar às condições reprodutivas apresentadas pelos animais (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valores médios mensais da temperatura do ar (°C), precipitação pluviométrica (mm), fotoperíodo (hora/luz/dia) e umidade relativa do ar (%) na região de Viçosa, MG, nas quatro estações climáticas anuais, no período de Janeiro de 2007 a Maio de 2008. Fonte: Estação Meteorológica do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa.

Estação climática anual	Temperatura do ar (°C)	Precipitação pluviométrica (mm)	Fotoperíodo (hora/luz/dia)	Umidade relativa do ar (%)
Verão	22,63	8,14	12,87	81,89
Outono	20,43	3,32	11,20	85,36
Inverno	16,79	0,09	10,77	79,60
Primavera	21,12	1,51	12,30	71,82

As coletas foram autorizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA-MG-139/06-NUFAS-MG) e pelo Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais (IEF-MG-121/06).

## 2.2. Captura, coleta e manutenção dos animais

Dezenove *M. molossus* machos adultos foram capturados ao anoitecer, utilizando-se redes de neblina (*mist nets*) armadas próximo a seus abrigos. Os morcegos foram colocados em gaiolas, as quais foram mantidas em local sob abrigo de luz. Foi oferecida dieta composta de larvas do coleóptero *Tenebrio* sp. e água *ad libitum*, desde a captura em campo até a eutanásia em laboratório, no dia seguinte à noite da coleta. Para a eutanásia foi feito o deslocamento cervical dos animais, seguindo-se a decapitação, tendo sido os mesmos posteriormente pesados.

As coletas foram divididas entre as estações climáticas anuais, tendo sido estabelecidos 4 grupos amostrais, sendo grupo I: verão (n=5), grupo II: outono (n=5),

grupo III: inverno (n=4) e grupo IV: primavera (n=5). Os animais foram manipulados segundo as normas de ética para experimentação animal previstas pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (2002), bem como de segurança e higiene, incluindo vacinação anti-rábica e antitetânica prévia dos pesquisadores envolvidos.

As primeiras horas da noite caracterizaram o período de maior atividade de *Molossus molossus*, e o maior sucesso de captura foi obtido no verão. Os animais capturados aceitaram bem a dieta oferecida à base de larvas de *Tenebrio sp.*, sendo que alguns ingeriram aproximadamente 80 larvas em uma única refeição.

### 2.3. Análises Morfológicas e Morfométricas

Após a eutanásia o trato reprodutor foi retirado e fixado por imersão em solução de Karnovsky por 24 horas, depois transferidos para álcool 70%. Foi feita a pesagem dos testículos, seguindo-se a desidratação de fragmentos testiculares em série etanólica crescente, procedendo-se a inclusão em glicol-metacrilato (Historesin, Leica®). Foram obtidas secções a 3µm de espessura, sendo que a cada corte utilizado, 13 foram descartados, a fim de se evitar a análise do mesmo túbulo seminífero. As preparações foram coradas com azul de toluidina e borato de sódio 1%, montadas com Entellan-Merck®, e analisadas sob microscopia de luz.

Após passagem pelo álcool 70%, a albugínea de um dos testículos foi cuidadosamente removida e pesada, sendo seu peso descontado do peso testicular para cálculo do volume ocupado pelo parênquima testicular (peso líquido testicular), ou volume líquido testicular, o qual corresponde à parte funcional gametogênica e androgênica do órgão. Um dos epidídimos de cada animal foi também desidratado, incluído, seccionado a 3µm de espessura e corado com azul de toluidina e borato de sódio 1%, tendo sido as secções montadas e avaliados sob microscopia de luz quanto à presença ou ausência de espermatozóides no lúmen epididimário.

Visto que macrófagos estão presentes no tecido intertubular de diversas espécies, algumas secções foram submetidas à reação enzimática por meio da técnica histoquímica de fosfatase ácida a fim de detectar a presença de macrófagos no tecido conjuntivo. A técnica (Gomori, 1952) foi modificada a fim de adequar o protocolo original para utilização em tecidos fixados em Karnovsky e incluídos em resina. As secções foram incubadas em meio contendo tampão acetato, β-glicerofosfato e nitrato de chumbo a 37°C sendo que a incubação por 44h forneceu

os melhores resultados. A seguir foram lavadas em água destilada, imersas em sulfeto de amônia, lavadas novamente e contra-coradas com nuclear fast red.

Obteve-se o índice gonadossomático (IGS) inferindo-se ao peso corporal o peso de ambos os testículos à partir da fórmula:  $IGS = PG/PC \times 100$ , onde PG=peso total das gônadas e PC=peso corporal.

### **2.3.1. Proporção volumétrica (%) e volume dos componentes do parênquima testicular**

Uma vez que o testículo pode ser dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular, as proporções volumétricas entre estes elementos foram estimadas a partir da contagem de 2.660 pontos projetados sobre imagens obtidas em lâminas histológicas, em aumento de 100x. Para tal utilizou-se fotomicroscópio Olympus BX-40 e através do programa para análise de imagens Image Pro Plus<sup>®</sup>, com o uso de um retículo com 266 intersecções (pontos), realizou-se a contagem de 10 campos aleatoriamente distribuídos, nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal. Foram computados pontos coincidentes com a túnica própria, o epitélio seminífero e lúmen, e os pontos sobre o espaço intertubular.

O volume dos túbulos seminíferos, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume do parênquima testicular. O valor deste último foi obtido subtraindo-se do peso testicular total o peso da albugínea testicular multiplicado por 2. Como a densidade do testículo é em torno de 1 (Johnson et al., 1981; Tae et al., 2005), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

Baseado nos volumes de túbulos seminíferos e nos pesos corporais foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da fórmula  $ITS = VT/PC \times 100$ , onde VT=volume do túbulo seminífero e PC=peso corporal.

### **2.3.2. Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento dos túbulos seminíferos**

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos, que apresentaram contorno o mais circular possível. Estas medidas não levaram em consideração o

estádio do ciclo e foram realizadas utilizando-se o programa de análise de imagem Image-Pro Plus<sup>®</sup>, associado a microscópio Olympus AX-70, em objetiva de 20x.

Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular mensurou-se a altura do epitélio seminífero, tomada da túnica própria até o lúmen tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, representou a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas.

Estimou-se o comprimento dos túbulos seminíferos (CT), expresso em metros, por testículo e por grama de testículo. O CT por testículo foi calculado à partir da fórmula  $CT = VTS / \pi R^2$ , onde VTS=volume dos túbulos seminíferos;  $\pi R^2$ =área da secção transversal dos túbulos seminíferos e R=diâmetro tubular/2. Para cálculo deste comprimento por grama de testículo dividiu-se o valor anterior pelo peso testicular total. O comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo (CTT), também expresso em metros, foi obtido multiplicando-se o CT por testículo por 2.

#### **2.4. Análise estatística**

As variáveis foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochran). Após as devidas transformações, quando necessárias, as mesmas foram submetidas à análise de variância (ANOVA). Quando significativo, foi realizado o teste de comparação de médias de Duncan (SAEG,1999) a um nível de significância de 0,05% ( $p \leq 0,05$ ). Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. As análises morfométricas testiculares foram correlacionadas às variáveis ambientais, utilizando-se o teste de correlação de Pearson a nível de significância de 0,05% (SAEG,1999).

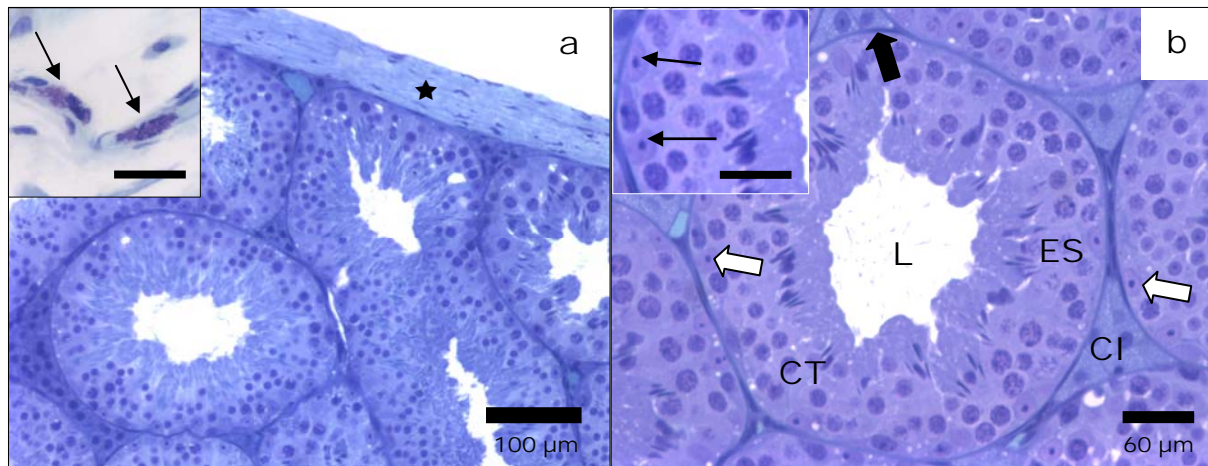
### **3. RESULTADOS**

Na Tabela 1 encontram-se as médias por estação, referentes à temperatura, precipitação pluviométrica, fotoperíodo e umidade relativa do ar, registrados para a região de Viçosa, MG nos períodos de coleta, ao longo das diferentes estações climáticas anuais em 2007, sendo que os dados do outono referem-se ao ano de 2008.

O fotoperíodo e a precipitação pluviométrica mostraram maior influência sobre as análises morfométricas de túbulos do que a temperatura e a umidade relativa do

ar. Observou-se uma correlação negativa entre as médias de temperatura e do fotoperíodo com o percentual de túbulos seminíferos. Registrou-se também uma correlação negativa entre a precipitação pluviométrica e o comprimento dos túbulos seminíferos por testículo e o comprimento tubular total. Correlação positiva foi encontrada entre precipitação pluviométrica média e o ITS. O fotoperíodo correlacionou-se negativamente com o percentual de lúmen, de diâmetro e com o volume dos túbulos seminíferos. Todas as correlações foram altamente significativas (Apêndice 1).

Os testículos de *M. molossus* são pares e semelhantes entre si no tamanho e no peso, apresentando-se envolvidos externamente por uma cápsula conjuntiva, a albugínea testicular, que confere ao órgão coloração esbranquiçada. Esta se mostra espessa, com predomínio de fibras colágenas, fibroblastos, fibrócitos e mastócitos esparsos (Figura 1a), contendo ainda células musculares lisas. O parênquima é constituído pelos compartimentos tubular e intertubular, semelhante à maioria dos mamíferos (Russell et al., 1990) (Figura 1b).



**Figura 1.** Secções transversais dos testículos de *Molossus molossus*. **a.** ★: Albugínea; Detalhe: mastócitos. Barra: 25 μm. **b.** CT: Compartimento tubular. CI: Compartimento intertubular. ➔: Túnica própria. ES: Epitélio seminífero. L: lúmen. ⇨: Células de Sertoli. Detalhe: células de Sertoli. Barra: 30 μm. Azul de toluidina - borato de sódio.

O compartimento tubular é constituído pelos túbulos seminíferos, formados por túnica própria, epitélio seminífero e lume. O epitélio seminífero apresenta-se



formado por células espermatogênicas em vários estágios de desenvolvimento e por células de Sertoli cujos núcleos, de padrão irregular, mostram nucléolo conspícuo. A túnica própria apresenta camada única de células mióides (Figura 1b).

Os valores médios das biometrias corporais, testiculares e o IGS encontram-se na Tabela 2. Observou-se peso corporal médio maior no verão em relação ao outono e à primavera ( $p \leq 0,05$ ). O peso testicular apresentou aumento no outono e inverno em relação ao verão ( $p \leq 0,05$ ) e o IGS médio foi menor no verão em relação a todas as outras estações ( $p < 0,05$ ). Os demais parâmetros não passaram por alteração significativa entre as diferentes estações climáticas anuais.

**Tabela 2.** Pesos corporais (g), testiculares (g) e índice gonadossomático (IGS) (%) de *Molossus molossus* adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais.

Estação climática anual	Peso corporal (g)	Peso testicular total (g)	IGS (%)
Verão	17,46±2,11 <sup>b</sup>	0,057±0,018 <sup>a</sup>	0,33±0,11 <sup>b</sup>
Outono	14,97±1,46 <sup>a</sup>	0,084±0,008 <sup>b</sup>	0,56±0,08 <sup>a</sup>
Inverno	15,31±1,64 <sup>a</sup>	0,077±0,013 <sup>b</sup>	0,50±0,04 <sup>a</sup>
Primavera	14,27±1,58 <sup>ab</sup>	0,068±0,023 <sup>ab</sup>	0,47±0,12 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

Os valores referentes à albugínea e ao parênquima testicular encontram-se na Tabela 3. Não houve variação significativa no peso da albugínea entre as estações, o mesmo ocorrendo quanto ao peso do parênquima testicular e ao percentual ocupado pela albugínea nos testículos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 3.** Pesos da albugínea (g), do parênquima testicular (g) e percentual de albugínea dos testículos de *Molossus molossus* adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais.

Estação climática anual	Peso albugínea (g)	Peso parênquima testicular total (g)	Albugínea (%)
Verão	0,0029±0,0009 <sup>a</sup>	0,052±0,016 <sup>a</sup>	10,21±1,94 <sup>a</sup>
Outono	0,0041±0,0003 <sup>a</sup>	0,076±0,008 <sup>a</sup>	9,84±0,49 <sup>a</sup>
Inverno	0,0032±0,0011 <sup>a</sup>	0,071±0,011 <sup>a</sup>	8,03±1,61 <sup>a</sup>
Primavera	0,0035±0,0008 <sup>a</sup>	0,061±0,024 <sup>a</sup>	11,56±4,81 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

As proporções volumétricas (%) e o volume (mL) dos componentes do parênquima testicular estão demonstrados na Tabela 4. O percentual ocupado pelos túbulos seminíferos foi maior no outono e inverno em relação ao verão ( $p < 0,05$ ), enquanto o percentual de intertúbulo no parênquima testicular foi menor no outono e inverno em relação ao verão ( $p < 0,05$ ). O aumento no volume dos túbulos seminíferos no outono e inverno em relação ao verão, e a diminuição no volume do intertúbulo no inverno em relação ao verão não foram significativos. Assim como o IGS, o ITS foi menor no verão em relação a todas as outras estações ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.** Proporções volumétricas (%) entre os componentes do parênquima testicular, volume (mL) dos túbulos seminíferos e do compartimento intertubular e índice tubulossomático (ITS) (%) dos testículos de *Molossus molossus* adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais.

Estação climática anual	Túbulos seminíferos (%)	Intertúbulo (%)	Volume dos túbulos seminíferos (mL)	Volume do intertúbulo (mL)	ITS (%)
Verão	85,54±3,36 <sup>a</sup>	14,46±3,36 <sup>a</sup>	0,044±0,012 <sup>a</sup>	0,0079±0,0042 <sup>a</sup>	0,25±0,08 <sup>b</sup>
Outono	90,49±2,80 <sup>b</sup>	9,51±2,80 <sup>b</sup>	0,069±0,008 <sup>a</sup>	0,0071±0,0019 <sup>a</sup>	0,46±0,07 <sup>a</sup>
Inverno	92,38±4,07 <sup>b</sup>	7,62±4,07 <sup>b</sup>	0,066±0,013 <sup>a</sup>	0,0050±0,0017 <sup>a</sup>	0,42±0,04 <sup>a</sup>
Primavera	88,84±3,67 <sup>ab</sup>	11,16±3,67 <sup>ab</sup>	0,054±0,021 <sup>a</sup>	0,0068±0,0035 <sup>a</sup>	0,37±0,11 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

Os percentuais ocupados pelos elementos do compartimento tubular encontram-se na Tabela 5. Verificou-se que o percentual representado pelo lúmen apresentou grande variação, tendo sido significativamente maior no outono e inverno em relação ao verão ( $p < 0,05$ ). O percentual dos túbulos seminíferos representado pelo epitélio seminífero não sofreu alterações significativas entre as estações ( $p > 0,05$ ), enquanto que o percentual de túnica própria foi menor no verão em relação às demais estações ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5.** Percentuais do compartimento tubular representados por lúmen, epitélio seminífero e túnica própria, nos testículos de *Molossus molossus* adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais.

Estação climática anual	Lúmen (%)	Epitélio seminífero (%)	Túnica própria (%)
Verão	6,73±1,86 <sup>b</sup>	77,30±4,48 <sup>a</sup>	1,51±1,06 <sup>b</sup>
Outono	11,89±2,94 <sup>a</sup>	75,25±3,77 <sup>a</sup>	3,35±0,32 <sup>a</sup>
Inverno	12,85±2,74 <sup>a</sup>	76,31±6,95 <sup>a</sup>	3,22±0,36 <sup>a</sup>
Primavera	9,49±2,16 <sup>ab</sup>	75,89±1,73 <sup>a</sup>	3,46±1,24 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p>0,05$ ).

Na Tabela 6 encontram-se as médias do diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero, comprimento dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo e o comprimento total dos túbulos seminíferos. O diâmetro tubular foi maior no outono e inverno em relação ao verão ( $p<0,05$ ). No inverno foi semelhante ao outono ( $p<0,05$ ), e na primavera foi semelhante ao inverno ( $p<0,05$ ).

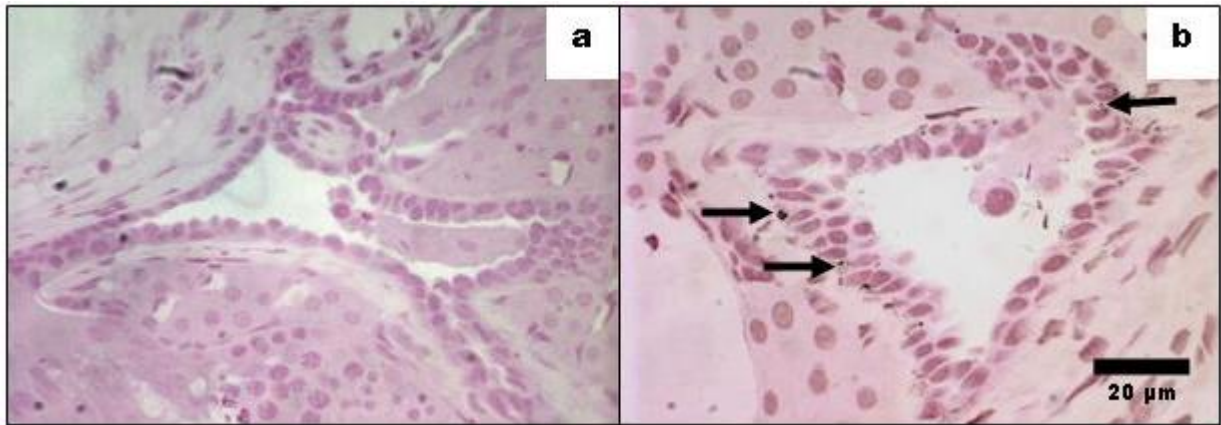
A altura do epitélio seminífero não variou significativamente entre as estações, assim como o comprimento dos túbulos seminíferos por testículo, por grama de testículo e comprimento total dos túbulos seminíferos não passaram por alterações significativas entre as estações ( $p>0,05$ ).

**Tabela 6.** Diâmetro tubular ( $\mu\text{m}$ ), altura do epitélio seminífero ( $\mu\text{m}$ ), comprimento dos túbulos seminíferos por testículo, por grama de testículo e comprimento total dos túbulos seminíferos (m) nos testículos de *Molossus molossus* adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais.

Estação climática anual	Diâmetro do túbulo seminífero ( $\mu\text{m}$ )	Altura do epitélio seminífero ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento dos túbulos seminíferos por testículo (m)	Comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo (m)	Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)
Verão	133,23±14,16 <sup>c</sup>	53,57±5,05 <sup>a</sup>	3,15±0,95 <sup>a</sup>	56,92±14,52 <sup>a</sup>	6,30±1,90 <sup>a</sup>
Outono	160,87±6,28 <sup>a</sup>	57,97±5,58 <sup>a</sup>	3,40±0,59 <sup>a</sup>	40,36±4,16 <sup>a</sup>	6,80±1,17 <sup>a</sup>
Inverno	155,44±8,74 <sup>ab</sup>	55,35±1,61 <sup>a</sup>	3,45±0,062 <sup>a</sup>	45,05±4,65 <sup>a</sup>	6,91±1,23 <sup>a</sup>
Primavera	139,50±19,88 <sup>bc</sup>	50,54±6,68 <sup>a</sup>	3,42±0,42 <sup>a</sup>	53,33±12,13 <sup>a</sup>	6,84±0,84 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p>0,05$ ).

Não foram identificados macrófagos no intertúbulo por meio da fosfatase ácida. No entanto, observou-se positividade para lisossomos no ducto eferente, sobretudo na base de seu epitélio (Figura 2b).



**Figura 2.** Secção transversal testicular de *Molossus molossus* evidenciando o ducto eferente no compartimento intertubular. **a.** Controle. **b.** Fosfatase ácida. ➔: Lisossomos no ducto eferente. Nuclear fast red. Barra: 30µm.

#### 4. DISCUSSÃO

Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que mostra a morfometria testicular associada à sazonalidade em morcegos, existindo, portanto, poucos dados disponíveis na literatura. Morcegos insetívoros apresentam importância crucial no ecossistema devido a seu papel no controle das populações naturais de insetos. Neste estudo observou-se maior atividade de *M. molossus* nas primeiras duas horas ao anoitecer e nas duas horas antes do amanhecer, assim como o descrito por Greenhall e Paradiso (1968), quanto ao período de atividade em microquirópteros. Entretanto os animais foram capturados ao anoitecer.

Com peso corporal médio de 15g, *M. molossus* pode ser considerada uma espécie de pequeno porte. Dentre os microquirópteros brasileiros, a menor espécie é o morcego frugívoro *Furipterus horrens*, com peso médio de 3g, e a maior é o onívoro *Vampyrum spectrum*, que pode pesar até 200g (Reis et al., 2007).

O entendimento dos ciclos reprodutivos e dos fatores que interferem na atividade reprodutiva dos mamíferos, e principalmente de morcegos, é complexo (Pacheco, 2001). Gittleman e Thompson (1988) explicaram que além da

sazonalidade e da abundância de alimentos, fatores comportamentais, hormonais e fisiológicos são co-responsáveis pelo sucesso reprodutivo das espécies.

Sabe-se que o verão é normalmente a estação eleita pela maioria das espécies para a ocorrência dos nascimentos, visto ser este o período de maior oferta de alimentos e condições mais favoráveis ao desenvolvimento dos filhotes (Oxberry, 1979). Nesta estação foram encontradas as temperaturas mais elevadas, maior precipitação pluviométrica, maior fotoperíodo e maior percentual de umidade relativa do ar. Segundo Cerqueira (2005), o fotoperíodo é o fator desencadeante do início da estação reprodutiva na cuíca *Monodelphis domestica*, o que também foi demonstrado em outros estudos (Cerqueira, 1984; Cerqueira e Bergallo, 1993). O maior peso corporal observado em *M. molossus* no verão pode estar relacionado ao fato de ser esta uma estação de maior oferta de alimentos. Fato semelhante foi observado por Parreira e Cardoso (1993) no roedor silvestre *Bolomys lasiurus*, que associaram o aumento de peso corporal ao aumento na disponibilidade de água e alimentos nessa época, que corresponde à estação chuvosa nos locais de coleta.

O aumento do peso gonadal de *M. molossus* observado no outono coincide com o encontrado por Carvalho (2007) no roedor silvestre *Akodon cursor*, contrastando com a redução do peso testicular no inverno, constatada por Parreira e Cardoso (1993) para *Bolomys lasiurus* e por Muteka et al. (2006) para *Aethomys namaquensis*. Uma correlação negativa, altamente significativa, observada entre o fotoperíodo e o peso gonadal de *M. molossus* confirmam estes achados, de modo que quanto maior o fotoperíodo, como acontece no verão, menor foi o peso gonadal.

Segundo Kenagy e Trombulak (1986), mamíferos de menor peso corporal alocam maiores proporções de massa corporal e desprendimento energético para o tecido testicular quando comparados a mamíferos de maior porte, não sendo este investimento espécie-específico. Ainda segundo estes autores, o tamanho testicular está intimamente relacionado ao comportamento reprodutivo, uma vez que animais com comportamentos monogâmicos e poligínicos apresentam menor peso testicular em relação a espécies com comportamentos reprodutivos promíscuos ou poliândricos. Nestes últimos, maior produção espermática é necessária devido à competição entre espermatozoides de diferentes machos para a fertilização da mesma fêmea. Em *M. molossus* encontrou-se um baixo IGS, o qual teve média de 0,47%, o que é coerente com o sistema de acasalamento poligínico observado na espécie, que obedece a um sistema de haréns composto por um macho dominante.

Ao passo que foi encontrado IGS médio no rato e no camundongo de 0,70% e 0,64%, respectivamente (Gomes, 2007; Melo, 2007).

Como *M. molossus* apresenta período gestacional de aproximadamente 90 dias, é coerente que ocorra maior investimento em massa testicular e reservas energéticas durante o outono, de modo que ocorrendo uma maior produção espermática, cópula e fertilização durante e principalmente ao final deste período e início do inverno, a fêmea ficará gestante durante os 3 meses do inverno. Os nascimentos ocorrem então no início da primavera, época de maior disponibilidade de alimentos e de temperaturas mais favoráveis ao desenvolvimento dos filhotes. Estas inferências são suportadas neste estudo por vários parâmetros investigados, como o aumento do IGS e do peso testicular observados no outono. O menor percentual do IGS, assim como do ITS observados no verão também podem ser explicados da mesma forma, já que o verão seria também época de nascimentos e, portanto, de menor investimento em produção espermática, caracterizando ainda estação de redução nos acasalamentos. De fato, fêmeas gestantes também foram capturadas neste período. Carvalho (2007) também encontrou peso testicular maior no outono no roedor silvestre *Akodon cursor*.

A albugínea compõe a morfofisiologia do testículo, embora não participe diretamente da função espermatogênica ou androgênica (Johnson et al., 1981). O percentual dos testículos de *M. molossus* ocupados pela albugínea esteve dentro da média encontrada para a maioria dos mamíferos até hoje estudados, onde esta representa de 5 a 13% dos testículos, estando na maioria dos animais em torno de 10% (França e Russell, 1998).

O parênquima testicular é a porção produtiva, gametogênica e androgênica do testículo. Na maioria dos estudos até hoje conduzidos, este é constituído por 70 a 90% de túbulos seminíferos, sendo o restante do parênquima ocupado pelo intertúbulo. *M. molossus* esteve dentro desta faixa, atingindo um dos mais elevados percentuais de parênquima testicular ocupado por túbulos seminíferos, em relação às demais espécies estudadas (França e Russell, 1998; Guião-Leite, 2002; Bittencourt, 2003; Almeida et al., 2006; Costa et al., 2006a; Costa et al., 2006b; Menezes, 2006; Sarti, 2006; Carvalho, 2007; Carreta Júnior, 2008). Os maiores percentuais destes túbulos, bem como seu volume foram observados no outono e inverno, o que parece ser reflexo do maior investimento em produção espermática nestas estações. Estas informações foram também comprovadas pela análise de

correlação, onde observou-se que quanto maior a temperatura e o fotoperíodo, menor o percentual e o volume de túbulos. Em *A. cursor* a proporção túbulo/interstício não apresentou diferença significativa entre os grupos, nas diferentes estações climáticas anuais, no entanto, observou-se aumento no volume dos túbulos seminíferos no outono (Carvalho, 2007).

O índice tubulossomático (ITS) é um parâmetro que visa quantificar o investimento em túbulos seminíferos em relação à massa corporal. Em *M. molossus* este parâmetro, que teve média de 0,37% considerando todas as estações, foi maior que o observado na onça parda (Guião-Leite, 2002) com 0,02%; no lobo-guará (Bittencourt, 2003) com 0,03%; gato doméstico (França e Godinho, 2003) e capivara (Romano et al., 2002) com 0,06% e paca (Carreta Júnior, 2008) com 0,24%, e menor que o observado no rato com 0,61% e no camundongo com 1,12% (Romano et al., 2002). Um elevado ITS sugere grande investimento em túbulos seminíferos, o que pode estar diretamente relacionado a um grande investimento em produção espermática.

Os valores aqui encontrados demonstram grande investimento corporal em produção espermática em *M. molossus*, sobretudo no outono. Reafirma-se ainda a tendência existente entre os mamíferos, de investimento inverso em produção espermática com relação à massa corporal, sendo os mamíferos de menor porte aqueles que apresentam maior investimento corporal na produção espermática (Kenagy e Trombulak, 1986).

O compartimento tubular é limitado por células mióides e elementos acelulares, como fibras colágenas e membrana basal, que juntos formam a túnica própria. Sobre a túnica própria repousam as células de Sertoli e espermatogônias (Russell et al., 1990). Enquanto múltiplas camadas de células mióides podem estar presentes em algumas espécies (Herms et al., 1977), em *M. molossus* observou-se camada única. Estas células são contráteis e provêm a maior força para o movimento de fluidos e propulsão do esperma através dos túbulos seminíferos (Russell et al., 1989). Deste modo, a redução no percentual de túnica própria observado no verão em relação às outras estações pode indicar menor fluxo de fluidos através dos túbulos seminíferos nesta estação.

A redução do lúmen tubular em *M. molossus*, também observada no verão, foi confirmada por uma correlação negativa com o fotoperíodo, de modo que quanto maior o fotoperíodo, menor o percentual de lúmen. Tal fato pode estar relacionada a

uma menor atividade do epitélio como um todo e redução na atividade secretora no verão, e pelo tamanho e população de células germinativas, assim como o citado por França e Godinho (2003). A pressão exercida por estes fluidos nos túbulos seminíferos mantém o lúmen tubular. Além disto, o fluido luminal é o meio através do qual os espermatozóides são transportados dentro do sistema de ductos do trato reprodutor masculino (Russell et al., 1989). Por outro lado, o aumento do lúmen observado no outono e inverno nos animais deste trabalho pode indicar aumento na atividade de síntese e deslocamento de fluido tubular nestas estações, incrementando desta forma a proporção luminal. Segundo França e Russell (1998), o aumento no lúmen é diretamente responsável pelo aumento do diâmetro tubular. E o aumento do diâmetro tubular, por sua vez, é diretamente implicado com maior atividade espermatogênica.

Assim como em *A. cursor* (Carvalho, 2007), o ligeiro aumento na altura do epitélio seminífero observado em *M. molossus* no outono, pode indicar aumento das camadas das células germinativas e conseqüente aumento na produção de espermatozóides nesta estação. Segundo Wing e Christensen (1982), a altura epitelial é mais fidedigna na detecção de aumento de produção espermática que o diâmetro tubular, por acompanhar diretamente as variações do ciclo do epitélio seminífero.

O aumento no diâmetro tubular observado no outono foi reflexo do aumento do lúmen, nesta mesma estação, assim como da proporção de túbulos seminíferos, sendo coerente também com o aumento do ITS e IGS no outono. Todas estas variações observadas no compartimento tubular acompanham as alterações do ciclo do epitélio seminífero. Observou-se que quanto maior o fotoperíodo, menor o diâmetro tubular. E o maior fotoperíodo foi observado no verão, o que, portanto também confirma as inferências acima. Sabe-se que existe uma relação positiva entre o diâmetro tubular e a atividade espermatogênica testicular (França, 1987; Sinha-Hikim et al., 1988). Este diâmetro sofre variações de acordo com a espécie e mesmo entre diferentes raças, numa mesma espécie. Este valor em *M. molossus*, considerando todas as estações, teve média de 147,26 $\mu$ m. A maioria dos amniotas apresenta diâmetro tubular dentro de uma ampla faixa, variando de 180 $\mu$ m a 300 $\mu$ m (Roosen-Runge, 1977).

Wing e Christensen (1982) descreveram variações cíclicas no diâmetro dos túbulos seminíferos em espécies laboratoriais, e Verma et al. (1965) demonstraram



variações do diâmetro tubular no garanhão durante a estação de acasalamento. Carvalho (2007) observou redução significativa no diâmetro tubular do roedor silvestre *Akodon cursor* no inverno em relação às demais estações, atribuindo esta redução ao fato de ser este um período de pouco alimento, baixa reprodução e baixa precipitação pluviométrica. Couto e Talamoni (2005), em estudos feitos com *Akodon montensis*, observaram espermatogênese e atividade reprodutiva cíclica na primavera e no verão, período de alta precipitação pluviométrica.

O comprimento dos túbulos seminíferos está relacionado ao peso testicular, sendo reflexo do volume do parênquima testicular, da proporção volumétrica dos túbulos seminíferos e do diâmetro tubular. Diante da grande variação encontrada para o tamanho testicular nas diferentes espécies, a comparação do comprimento de túbulos seminíferos entre espécies deve ser feita por grama de testículo. Enquanto demonstrou-se que o diâmetro dos túbulos seminíferos não se altera significativamente após a maturidade sexual numa dada espécie, os túbulos seminíferos continuam aumentando em comprimento, o que está relacionado com o crescimento do tamanho testicular (Attal e Courot, 1963; França, 1987).

*M. molossus* apresentou média de 48m de túbulos por grama testicular considerando todas as estações, enquanto todas as espécies animais até hoje estudadas apresentam de 9 a 20m de túbulos seminíferos por grama de testículo (França e Russell, 1998; Guião-Leite, 2002; Bittencourt, 2003; Azevedo, 2004; Barros, 2005; Sarti, 2006; Menezes, 2006; Carvalho, 2007; Gomes, 2007; Melo, 2007; Caldeira, 2007), o que denota grande investimento em produção espermática neste morcego, apesar de Kenagy e Trombulak (1986) afirmarem que em animais de comportamento reprodutivo poligínico, como *M. molossus*, não seja necessária uma produção espermática tão alta. Até então o maior valor havia sido registrado na paca, com 29,7m de túbulos seminíferos por grama de testículo (Carreta Jr, 2008). Tais achados reafirmam as diferenças existentes quanto às estratégias reprodutivas em diferentes espécies.

Espermatozóides foram observados no lúmen dos epidídimos durante todo o ano, assim como o observado por Pacheco (2001) nos morcegos *M. Molossus*, *Sturnira lilium* e *Desmodus rotundus*, o que indica produção espermática contínua.

A presença de marcação de enzimas lisossômicas nos ductos eferentes em *M. molossus* pode ser correlacionada com alguns papéis histofisiológicos, tais como a ocorrência de fagocitose ou reabsorção de fluidos, espermatozóides ou corpos

residuais, assim como o observado nos ductos eferentes do rato *Thryonomys swinderianus* por Aire e Van der Merwe (2003), no lagarto *Sitana ponticeriana* por Akbarsha et al. (2006) e Akbarsha et al. (2007) e em diversas espécies de mamíferos por Ilio e Hess (1994) e Hess (2000). Reatividade à fosfatase ácida foi também verificada no ducto epididimário do gerbil (*Meriones unguiculatus*) por Domeniconi et al. (2006), o que estes autores associaram com a atividade lisossômica (Bainton, 1981; Orsi, 1998), sendo esta uma observação que implica em ocorrência de processos ativos de absorção e endocitose de fluido proveniente do lúmen (Hermo e Morales, 1984; Hermo et al., 1994).

Segundo Pacheco (2001), em espécies de morcegos onde não existe sincronização entre produção espermática e ovulação pode ocorrer o armazenamento de espermatozóides, seja no epidídimo, seja no aparelho genital da fêmea. Como espermátides alongadas foram observadas nos túbulos seminíferos de *M. molossus* em todas as estações do ano, assim como espermatozóides no lúmen epididimário, e ainda as análises morfométricas testiculares indicaram sazonalidade reprodutiva, pode-se sugerir armazenamento de espermatozóides no epidídimo de *M. molossus* fora da época de acasalamento. Este fato também foi relatado por Fabián e Marques (1989) nesta mesma espécie. Segundo Pacheco (2001), os machos estão ativos nas quatro estações do ano e com índices menores no verão, ocorrendo ainda sincronização do ciclo reprodutivo entre machos e fêmeas de *M. molossus*, o que coincide com os resultados obtidos para machos neste trabalho.

Segundo Bronson (1989) os machos de mamíferos podem permanecer ativos reprodutivamente fora das épocas em que as fêmeas se encontram receptivas. Mesmo em situações de forte sazonalidade, em que é energeticamente impossível para as fêmeas se reproduzirem durante uma parte do ano, os machos podem entrar em atividade reprodutiva antes da fêmea e sair desta fase após elas.

Foi demonstrado um padrão de sazonalidade reprodutiva em *M. molossus*, embora esta não seja tão pronunciada como o que ocorre no morcego *Myotis lucifugus lucifugus* no nordeste dos Estados Unidos. Nesta espécie, durante o período de hibernação o epitélio seminífero é reduzido a espermatogônias de reserva e células de Sertoli (Gustafson, 1987).

## 5. CONCLUSÕES

Conclui-se deste modo que *M. molossus* machos apresentam sazonalidade reprodutiva apresentando maior atividade espermatogênica no outono, onde se observou aumento de diversos parâmetros morfométricos tubulares. A espécie apresenta ainda comprimento tubular muito acima da média dos mamíferos já estudados, grande investimento no compartimento tubular possuindo uma das maiores proporções de túbulos seminíferos entre os mamíferos, e padrão testicular característico da maioria dos mamíferos.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aire, T.A., Van der Merwe, M., 2003. The ductuli efferentes testis of the greater cane rat (*Thryonomys swinderianus*). **Anatomy and Embryology**. 206: 409-417.

Akbarsha, M.A., Kadalmani, B., Tamilarasan, V., 2006. Histological variation along and ultrastructural organization of the epithelium of the ductus epididymidis of the fan-throated lizard *Sitana ponticeriana* Cuvier. **Acta Zoologica**. 87: 181-196.

Akbarsha, M. A., Kadalmani, B., Tamilarasan, V., 2007. Efferent ductules of the fan-throated lizard *Sitana ponticeriana* Cuvier: light and transmission electron microscopy study. **Acta Zoologica**. 88: 265-274.

Almeida, F.F.L., Leal, M.C., França, L.R., 2006. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). **Biology of Reproduction**. 75: 792-799.

Attal, J., Courrot, M., 1963. Développement testiculaire et établissement de la spermatogenèse chez le taureau. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**. 3: 219-241.

Azevedo, M.H.F., 2004. **Análise morfofuncional do testículo da onça-pintada (*Panthera onca*) adulta**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 63 pp.

Bainton, D.F., 1981. The discovery of lisossomes. **The Journal of Cell Biology**. 91: 66-76.

Barros, J.B.G., 2005. **Análise morfofuncional do testículo e da espermatogênese de leões africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 77 pp.

Beasley, L.J., Zucker, I., 1984. Photoperiod influences the annual reproductive cycle of the male pallid bat (*Antrozous pallidus*). **Journal of Reproduction and Fertility**. 70: 567-573.

Bittencourt, V.L., 2003. **Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) adulto**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 57 pp.

Bronson, F.H., 1989. **Mammalian reproductive biology**. University of Chicago, Chicago and London, 325 p.

Caldeira, B.C., 2007. **Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766) adulto**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 61 pp.

Carreta Junior, M., 2008. **Avaliação morfofuncional do processo espermatogênico de pacas (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1766) adultas**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 78 pp.

Carvalho, F.A.R., 2007. **Morfologia e morfometria testicular do roedor silvestre *Akodon cursor* (Winge,1887) (Rodentia, Muridae)**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 46 p.

Cerqueira, R., 1984. Reproduction de *Didelphis albiventris* dans le nord-est du Brésil (Polyprotodontia, Didelphidae). **Mammalia**. 48: 95-104.

Cerqueira, R., Bergallo, H.G., 1993. A possible case of photoperiod controlling the reproduction of a south american marsupial. **Ciência e Cultura**. 45: 140-141.

Cerqueira, R., 2005. Fatores ambientais e a reprodução de marsupiais e roedores no leste do Brasil. **Arquivos do Museu Nacional**. 63(1): 29-39.

CFMV - **Conselho Federal de Medicina Veterinária**, 2002. Resolução nº 714, de 20 de Junho de 2002. Disponível em [www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao\\_714.pdf](http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_714.pdf).

Costa, D.S., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., 2006a. Cat, cougar, and jaguar spermatogenesis: a comparative analysis. **Brazilian Archives of Biology and Technoogy**. 49(5): 725-731.

Costa, D.S., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., 2006b. The intertubular morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. **Animal Reproduction Science**. 91: 173-179.

Couto, D., Talamoni, S.A., 2005. Reproductive condition of *Akodon montensis* (Thomas) and *Bolomys lasiurus* (Lund) (Rodentia, Muridae) based on histological and histometric analyses of testes and external characteristics of gonads. **Acta Zoologica**. 86: 111-118.

Domeniconi, R.F., Orsi, A.M., Silva, M.D.P., Beu, C.C.L., Viegas, K.S.A., 2006. Localização histoquímica de algumas hidrolases no epidídimo do gerbilo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 43(1): 107-116.

Fabián, M.E., Marques, R.V., 1989. Contribuição ao conhecimento da biologia reprodutiva de *Molossus molossus* (Pallas, 1766) (Chiroptera, Molossidae). **Revista Brasileira de Biologia**. 6(4): 603-610.

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

França, L.R., 1987. **Desenvolvimento testicular de suínos da raça Piau, do nascimento aos 12 meses de idade**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 97 pp.

França, L.R., Russell, L.D., 1998. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia, F., Regadera, J. (Eds.). **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. Churchill Livingstone, Madrid, pp.197-219.

França, L.R., Godinho, C.L., 2003. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). **Biology of Reproduction**. 68:1554-1561.

Gier, H.T., Marion, G.B., 1970. Development of mammalian testis. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Van Der Mark, N.L. (Eds.). **The testis**. Academic Press, Londres pp. 2-45.

Gittleman, J.L., Thompson, S.D., 1988. Energy allocation in mammalian reproduction. **American Journal of Zoology**. 28: 863-875.

Gomes, M.L.M., 2007. **Morfometria testicular de ratos wistar adultos tratados com infusão aquosa de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss. Meliaceae)**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 49 pp.

Gomori, G., 1952. Histochemistry of esterases. **International Review of Cytology**. 1: 323.

Goyal, H.O., 1982. Light microscopic and ultrastructural evidence of epithelial phagocytosis of sperm in the rete testis and ductuli efferentes in the bull. **American Journal of Veterinary Research**. 43: 785-790.

Gustafson, A.W., 1987. Changes in Leydig cell activity during the annual testicular cycle of the bat *Myotis lucifugus lucifugus*: histology and lipid histochemistry. **American Journal of Anatomy**. 178(4): 312-325.

Greenhall, A.M., Paradiso, J.L., 1968. **Bats and bat banding**. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife Resource Publication.

Guião-Leite, F.L., 2002. **Análise morfológica do testículo e do processo espermatogênico da onça parda (*Puma concolor*, Wozencraft, 1993) adulta**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 76 pp.

Hermo, I., Morales, C., 1984. Endocytosis in nonciliated cells of the ductuli efferents em the rat. **American Journal of Anatomy**. 171: 59-74.

Hermo, L., Lalli, M.F., Clermont, Y., 1977. Arrangement of connective tissue components in the walls of seminiferous tubules of man and monkeys. **American Journal of Anatomy**. 148: 433-446.

Hermo, L., Oko, R., Morales, C., 1994. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. **International Review of Cytology**. 154: 105-119.

Hess, R.A., 2000. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. **Journal of Reproduction and Fertility**. 5: 84–92.

Hess, R.A., 2002. The efferent ductules: structure and functions. In: Robaire, B., Hinton, B.T. (Eds.). **The Epididymis: from Molecules to Clinical Practice**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. pp. 49–80.

Ilio, K.Y., Hess, R.A., 1994. Structure and function of the ductuli efferentes: a review. **Microscopy Research and Technique**. 29: 432-467.

Johnson, L., Petty, C.S., Neaves, W.B., 1981. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. **Biology of Reproduction**. 25: 217-226.

Kenagy, G.J., Trombulak, S.C., 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. **Journal of Mammalogy**. 67(1): 1-22.

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

Melo, F.C.S.A., 2007. **Efeito da infusão do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers, Bignoniaceae) sobre as características morfométricas de componentes testiculares de ratos wistar adultos**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 102 pp.

Menezes, C.M.C., 2006. **Análise morfofuncional da espermatogênese de queixadas (*Tayassu pecari* Link, 1795)**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. 65 pp.

Muteka, S.P., Chimimba, C.T., Bennett, N.C., 2006. Reproductive seasonality in *Aethomys namaquensis* (Rodentia: Muridae) from Southern Africa. **Journal of Mammalogy**. 87(1): 67-74.

Neuweiler, G., 2000. **The biology of bats**. Oxford University Press, New York.

Orsi, A.M., 1998. Morphological investigations of the surface epithelium of ductuli efferentes of black isogenic mice (*Mus musculus*). **Anatomia, Histologia, Embryologia**. 27: 215-218.

Oxberry, B.A., 1979. Female reproductive patterns in hibernating bat. **Journal of Reproduction and Fertility**. 56: 359-367.

Pacheco, S.M., 2001. **Biologia reprodutiva, desenvolvimento pré e pós-natal e maturidade sexual de morcegos da região sul, Brasil (Chiroptera, Phyllostomidae, Vespertilionidae, Molossidae)**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 115 pp.

Parreira, G.G., Cardoso, F.M., 1993. Seasonal variation of the spermatogenic activity in *Bolomys lasiurus* (Lund, 1841) (Rodentia, Cricetidae), from Southeastern Brazil. **Mammalia**. 57: 27-34.



Patterson, B., Pascual, R., 1972. The fossil mammal fauna of South America. In: Keast, A., Erk, F.C., Glass, B. (Eds.). **Evolution, mammals and southern continents**. State University New York Press, Albany, 543 p.

Racey, P.A., 1982. Ecology of bat reproduction. In: Kunz, T.H. (Ed.). **Ecology of bats**. Plenum Press, New York and London, pp. 57-104.

Reis N. R., Peracchi, A.L., Pedro, W.A., Lima, I.P., 2007. **Morcegos do Brasil**. Editora da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 256 p.

Robaire, B., Hermo, L., 1988. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, function and their regulation. In: Knobil, E., Neill, J. (Eds.). **The Physiology of Reproduction**. Raven Press, New York, pp. 999-1080.

Romano, H.S., Pereira, T., Fonseca, C.C., Paula, T.A.R., Neves, M.T.D., Mata, S.L.P., 2002. **Avaliação do testículo e do processo espermatogênico em 5 diferentes espécies de roedores**. In: Anais do 11º Simpósio de Iniciação Científica da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Roosen-Runge, E.C., 1977. **The process of spermatogenesis in animals**. Academic Press, Cambridge.

Russell, L.D., Saxena, N.K., Turner, T.T., 1989. Cytoskeletal involvement in spermiation and sperm transport. **Tissue and Cell**. 21: 361-379.

Russell, L.D., Ettlín, R.A., Sinha-Hikim, A.P., Clegg, E.D., 1990. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Cache River Press, Clearwater, Florida, 268 p.

SAEG - **Sistema para análises estatísticas**, 1999. Eduardo Paulino da Costa, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa.

Sarti, P., 2006. **Avaliação morfométrica do testículo e da espermatogênese de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) adultas**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 56 pp.

Sinha-Hikim, A.P., Bartke, A., Russell, L.D., 1988. Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive state: light microscope findings. **Biology of Reproduction**. 39: 1225-1237.

Tae, H.J., Jang, B.G., Ahn, D.C., Chol, E.Y., Kang, H.S., Kim, N.S., Lee, J.H., Park, S.Y., Yang, H.H., Kim, I.S., 2005. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karkpovi*) during the breeding and non-breeding seasons. **Veterinary Research Communication**. 29(7): 629-643.

Timm, R.M., 1994. The mammal fauna. In: McDade, L.A., Bawa, K.S., Hespdenheide, H.A., Hartshorn, G.S. (Eds.). **La Selva: Ecology and natural history of a neotropical rain forest**. University of Chicago Press, Chicago, pp. 229-237.

Van der Merwe, M., Rauntenbach, I.L., 1987. Reproduction in Schlieffen's bat, *Nycticeius schlieffenii*, in the eastern Transvaal lowveld, South Africa. **Journal of Reproduction and Fertility**. 81: 41-50.

Verma, M.C., Singh, G., Sharma, U.D., 1965. Studies on sperm production. II. Testicular and epididymal sperm reserves in buffalo-bulls as determined by direct counts. **Indian Journal of Veterinary Science**. 35: 331.

Wing, T.Y., Christensen, A.K., 1982. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. **American Journal of Anatomy**. 165: 13-25.

## Artigo II

---

### Organização e quantificação sazonal dos elementos do compartimento intertubular dos testículos do morcego insetívoro *Molossus molossus* (Pallas, 1776)

#### Resumo

Objetivou-se comparar a organização e quantificação dos elementos do compartimento intertubular testicular de *Molossus molossus* coletados em diferentes estações climáticas. Secções histológicas testiculares incluídas em metacrilato foram avaliadas sob microscopia de luz, utilizando-se o software Image Pro Plus. Obteve-se o percentual representado pelos elementos do parênquima testicular, calculando-se então diversos parâmetros morfométricos intertubulares. Análises de correlação entre a morfometria testicular e fatores abióticos ambientais confirmaram a influência de fatores climáticos sobre a reprodução de *M. molossus*. O intertúbulo ocupou em média 11% dos testículos, considerando-se todas as estações, sendo constituído predominantemente por células de Leydig (CL), além de vasos sanguíneos e escassos espaços linfáticos e tecido conjuntivo. Os percentuais dos testículos ocupados pelo intertúbulo e por CL foram significativamente maiores no verão. Já os demais elementos intertubulares não sofreram alterações significativas entre as estações. O percentual das CL ocupado pelo núcleo foi maior no inverno, contribuindo diretamente para o menor percentual desta célula ocupado pelo citoplasma, nesta mesma estação. Assim como quanto ao volume citoplasmático e total de CL, os quais também foram menores no inverno. O maior percentual do intertúbulo ocupado por estas células no verão em relação ao outono e inverno pode indicar aumento na capacidade esteroidogênica do animal no verão. O aumento no percentual e volume citoplasmáticos e de CL observados à partir da primavera também sugerem aumento da capacidade sintética desta célula, com produção pronunciada no outono. Conclui-se que *M. molossus* podem apresentar dois picos de produção androgênica, com maiores investimentos em tecido intertubular e em CL no verão, e o aumento da proporção volumétrica e volume citoplasmático de CL no outono indica a preparação para a estação reprodutiva dessa espécie.

Palavras-chave: Células de Leydig, Vasos sanguíneos, Espaço linfático, Tecido conjuntivo.

## **Organization and seasonal quantification of the intertubular compartment in the testes of the insectivorous bat *Molossus molossus* (Pallas, 1776)**

### **Abstract**

Different species have different patterns of testicular organization. The present study aimed to compare the organization and quantification of the elements of intertubular compartment of the testes of *Molossus molossus* collected at different annual climatic seasons. Testicular histological sections included in methacrylate were evaluated in light microscope, using the software Image Pro Plus. It was obtained the percentage represented by the elements of the testicular parenchyma, and estimated various intertubular morphometric parameters. Analysis of correlation between the testicular morphometry and abiotic environmental factors confirmed the influence of climatic factors on the reproduction of *M. molossus* males. The intertubular tissue occupied on average 11% of the testes in *M. molossus* considering all seasons, consisting predominantly of Leydig cells (LC), blood vessels and reduced lymphatic spaces and connective tissue. The percentage of the testes occupied by intertubular compartment and LC were significantly higher in the summer for the fall and winter. The other intertubular elements had no significant changes between seasons. The percentage of LC occupied by the nucleus was greater in winter, contributing directly to the lowest percentage of cell occupied by cytoplasm in the same season, as well the cytoplasmatic and total volume of LC, which were also lower in winter. The greater percentage of intertubular compartment of *M. molossus* occupied by these cells in the summer in relation to the fall and winter may indicate an increase in steroidogenic capacity of the animal in the summer. The increase in the percentage of LC as well in your cytoplasmatic volume and total observed from the spring also suggest increasing in the synthetic capacity of the cell, which pronounced production in the fall. We conclude that *M. molossus* may have two peaks of androgen production, with greater investments in intertubular tissue and LC in the summer, and the increasing of the LC proportion and volume cytoplasmatic and total of LC in the fall indicates the preparation for the reproductive season of this species.

Key-words: Leydig cell, Blood vessel, Lymphatic space, Connective tissue.

## 1. INTRODUÇÃO

Os quirópteros atuam de diversas maneiras no ambiente, seja como dispersores de sementes, agentes polinizadores, vetores de zoonoses ou agentes controladores de populações de insetos, como é o caso da espécie insetívora *Molossus molossus*, a qual se encontra amplamente distribuída pelo território brasileiro.

A biologia reprodutiva de morcegos pode ser tão variável quanto os hábitos que eles apresentam pois, dependendo de seu tipo de habitat, da localização deste, das condições climáticas e da disponibilidade de alimentos, diferentes espécies apresentam diferentes estratégias reprodutivas (Pirlot, 1967; Dweyr, 1970). Morcegos insetívoros apresentam padrão reprodutivo tipicamente monoestral. No entanto, em espécies onde a disponibilidade de alimento não está sujeita a variações sazonais, pode-se observar poliestria, com picos de nascimento duas vezes ao ano (Fleming et al., 1972; La Val e Fitch, 1977). *M. molossus* teve seu ciclo reprodutivo definido como poliestral sazonal por Fabián e Marques (1989) no estado do Ceará, região nordeste do Brasil, e como monoestral sazonal por Pacheco (2001), no estado do Rio Grande do Sul, região sul do Brasil.

O testículo dos mamíferos pode ser morfo-funcionalmente dividido em dois compartimentos: o tubular ou espermatogênico e o intertubular ou androgênico. O compartimento tubular ocupa de 61 a 88% dos testículos da maioria das espécies de mamíferos até hoje estudadas, e o intertúbulo, por sua vez, de 11 a 38% (França e Russel, 1998). O compartimento intertubular é constituído por células de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático e uma população variável de células que compõem o tecido conjuntivo. Grande variação é observada entre a porcentagem destes componentes em diferentes espécies (Fawcett et al., 1973; França e Russel, 1998).

São classicamente descritos 3 padrões de organização do compartimento intertubular (Fawcett et al., 1973). Na primeira categoria encontram-se as espécies que apresentam relativamente pouco volume de células de Leydig e escasso tecido conjuntivo, com espaço linfático ocupando a maior parte do intertúbulo. Espécies com agrupamentos de células de Leydig em abundância espalhados pelo intertúbulo e em abundância e tecido conjuntivo edemaciado, drenado por vasos linfáticos central ou excentricamente arranjados no intertúbulo estão na segunda categoria. Já

espécies com abundância de células de Leydig, ocupando quase todo o compartimento intertubular, mas com tecido conjuntivo e espaços linfáticos escassos e de pequeno tamanho pertencem à terceira categoria. Estes diferentes padrões de organização do tecido intertubular resultam em diferentes implicações fisiológicas.

As células de Leydig usualmente constituem os componentes mais abundantes do intertúbulo, e sua população varia de acordo com a espécie e idade. Tais células são responsáveis pela síntese de testosterona, manutenção da libido, do processo espermatogênico, funcionamento das glândulas acessórias e características sexuais secundárias (Payne et al., 1996). Foram descritas alterações na histologia das células de Leydig no morcego insetívoro *Myotis lucifugus lucifugus* no nordeste dos Estados Unidos, correlacionadas à variações sazonais nas concentrações plasmáticas de testosterona (Gustafson, 1987). Já os demais componentes usualmente não apresentam variação evidente (Fawcett et al., 1973).

Pouco se conhece acerca da função testicular e padrões de espermatogênese e androgênese em morcegos brasileiros, e *M. molossus* não é exceção. Tais conhecimentos podem ser obtidos por meio da aplicação de análises morfométricas testiculares, e permitem inferir sobre a dinâmica gonadal e conseqüente capacidade reprodutiva do animal, fornecendo desta forma informações relativas ao seu ciclo reprodutivo, bem como sobre sua variação reprodutiva sazonal, o que constituiu o objetivo deste estudo.

## **2. MATERIAL & MÉTODOS**

### **2.1. Área de estudo**

Foram realizadas coletas na região sudeste do estado de Minas Gerais, Brasil, na região do município de Viçosa (20°45'14"S e 42°52'53"W), o qual localiza-se a uma altitude média de 648,74 metros. Trata-se de uma região caracteristicamente montanhosa, inserida no bioma da Mata Atlântica cujo clima é do tipo Cwa (mesotérmico, úmido com verões chuvosos e invernos secos, pela baixa precipitação pluviométrica).

Foram obtidas informações referentes às condições climáticas do município no período de coletas, que compreendeu de Janeiro de 2007 a Maio de 2008, a fim de correlacionar os fatores abióticos temperatura, precipitação pluviométrica,

fotoperíodo e umidade relativa do ar às condições reprodutivas apresentadas pelos animais (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valores médios mensais da temperatura do ar (°C), precipitação pluviométrica (mm), fotoperíodo (hora/luz/dia) e umidade relativa do ar (%) na região de Viçosa, MG, nas quatro estações climáticas anuais, no período de Janeiro de 2007 a Maio de 2008. Fonte: Estação Meteorológica do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa.

Estação climática anual	Temperatura do ar (°C)	Precipitação pluviométrica (mm)	Fotoperíodo (hora/luz/dia)	Umidade relativa do ar (%)
Verão	22,63	8,14	12,87	81,89
Outono	20,43	3,32	11,20	85,36
Inverno	16,79	0,09	10,77	79,60
Primavera	21,12	1,51	12,30	71,82

As coletas foram autorizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA-MG-139/06-NUFAS-MG) e pelo Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais (IEF-MG-121/06).

## 2.2. Captura, coleta e manutenção dos animais

Dezenove *M. molossus* machos adultos foram capturados ao anoitecer, utilizando-se redes de neblina (*mist nets*) armadas próximo aos abrigos dos animais. Os morcegos foram colocados em gaiolas, as quais foram mantidas em local sob abrigo de luz. Foi oferecida dieta composta de larvas do coleóptero *Tenebrio* sp. e água *ad libitum*, desde a captura em campo até a eutanásia em laboratório, no dia seguinte à noite da coleta. Para a eutanásia foi feito o deslocamento cervical dos animais, seguindo-se a decapitação, tendo sido os mesmos posteriormente pesados.

As coletas foram divididas entre as estações climáticas anuais, tendo sido estabelecidos 4 grupos amostrais, sendo grupo I: verão (n=5), grupo II: outono (n=5), grupo III: inverno (n=4) e grupo IV: primavera (n=5). A manipulação dos animais foi feita de acordo com as normas de ética para experimentação animal previstas pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (2002), bem como de segurança e

higiene, incluindo vacinação anti-rábica e antitetânica prévia dos pesquisadores envolvidos.

### **2.3. Processamento histológico**

Após a eutanásia, o trato reprodutor foi retirado e fixado por imersão em solução de Karnovsky por 24 horas, depois transferidos para álcool 70%. Foi feita a pesagem dos testículos, seguindo-se a desidratação de fragmentos testiculares em série etanólica crescente, procedendo-se a inclusão em glicol-metacrilato (Historesin, Leica®). Foram obtidas secções a 3µm de espessura, sendo que a cada corte capturado, 13 foram descartados, a fim de se evitar o mesmo túbulo seminífero. As preparações foram coradas com azul de toluidina e borato de sódio 1%, montadas com Entellan-Merck®, e analisadas sob microscopia de luz.

A fim de detectar a presença de macrófagos no tecido conjuntivo, algumas secções foram submetidas à reação enzimática por meio da técnica histoquímica de fosfatase ácida. A técnica (Gomori, 1952) foi modificada a fim de adequar o protocolo original para utilização em tecidos fixados em Karnovsky e incluídos em resina. As secções foram incubadas em meio contendo tampão acetato, β-glicerofosfato e nitrato de chumbo a 37°C, sendo que a incubação por 44h forneceu os melhores resultados. A seguir foram lavadas em água destilada, imersas em sulfeto de amônia, lavadas novamente e contra-coradas com Nuclear Fast Red.

Após passagem pelo álcool 70%, a albugínea de um dos testículos foi cuidadosamente removida e pesada, sendo seu peso descontado do peso total dos testículos, para cálculo do volume ocupado pelo parênquima testicular, o qual corresponde à parte funcional do órgão.

### **2.4. Análises morfométricas**

#### **2.4.1. Proporção volumétrica (%) e volume dos elementos do intertúbulo**

Registrou-se a proporção volumétrica dos compartimentos tubular e intertubular sob microscopia de luz, contando-se aleatoriamente 2.660 pontos por animal, utilizando-se retículo com 266 intersecções (pontos), em aumento de 100x, realizando-se a contagem de 10 campos aleatoriamente distribuídos, nos diferentes



cortes histológicos do testículo de cada animal. Avaliou-se então o intertúbulo, registrando-se 1.000 pontos sobre núcleo e citoplasma de células de Leydig (NL e CL), vasos sanguíneos (VS), espaço linfático (EL) e tecido conjuntivo (TC). Estas contagens foram feitas utilizando-se o programa para análise de imagens Image Pro Plus<sup>®</sup>, associado a microscópio Olympus BX-40.

O percentual de cada elemento no intertúbulo foi obtido multiplicando por 100 o número de pontos contados sobre este elemento, e dividindo o valor obtido por 1.000. O volume que o elemento ocupa no parênquima testicular, expresso em mL, foi obtido multiplicando-se a porcentagem deste elemento no intertúbulo pelo peso líquido testicular, dividindo-se este valor por 100. Para o cálculo do peso do parênquima testicular (peso líquido testicular), subtraiu-se do peso bruto de um testículo o peso da albugínea. Como a densidade do testículo é em torno de 1, o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume (Johnson et al., 1981; Tae et al., 2005).

#### **2.4.2. Morfometria de células de Leydig**

Mediu-se o diâmetro nuclear médio das células de Leydig em imagens capturadas com objetiva de 40x. Trinta núcleos de células de Leydig foram medidos para cada animal utilizando-se o programa para análise de imagens Image Pro Plus<sup>®</sup>, escolhendo-se os núcleos que apresentaram contorno circular, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. A proporção núcleo-plasmática foi obtida através da proporção volumétrica dos elementos do intertúbulo.

Foram calculados os volumes nuclear, citoplasmático e conseqüentemente, o volume de cada célula de Leydig por animal. O volume nuclear foi obtido à partir da fórmula:  $VN = 4/3 \pi R^3$ , onde R = raio nuclear. Para cálculo do volume citoplasmático utilizou-se a fórmula:  $VC = \% \text{ citoplasma} * VN / \% \text{ núcleo}$ . Finalmente o volume celular foi obtido somando-se o VN e o VC. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos ( $\mu\text{m}^3$ ).

Para cálculo do número total de células de Leydig e do número de células de Leydig por grama de testículo, os volumes nucleares e o volume de células de Leydig foram convertidos para  $\text{cm}^3$ . Dividiu-se então o volume total de célula de Leydig por parênquima testicular pelo volume de células de Leydig ( $\text{cm}^3$ ), obtendo-se desta forma o número total de células de Leydig. E para a estimativa do número

destas células por grama de testículo dividiu-se o valor anterior pelo peso gonadal total.

A fim de se quantificar o investimento em células de Leydig, em relação à massa corporal, foi calculado o índice Leydigossomático (ILS), utilizando-se a fórmula:  $ILS = \text{volume total de célula de Leydig por parênquima testicular} / PC * 100$ , onde PC=peso corporal.

## 2.5. Análise estatística

As variáveis foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochran). Após as devidas transformações, quando necessárias, as mesmas foram submetidas à análise de variância (ANOVA). Quando significativo, foi realizado o teste de comparação de médias de Duncan (SAEG,1999) a um nível de significância de 0,05% ( $p < 0,05$ ). Os resultados encontram-se expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. As análises morfométricas testiculares foram correlacionadas às variáveis ambientais, utilizando-se o teste de correlação de Pearson a nível de significância de 0,05% (SAEG,1999).

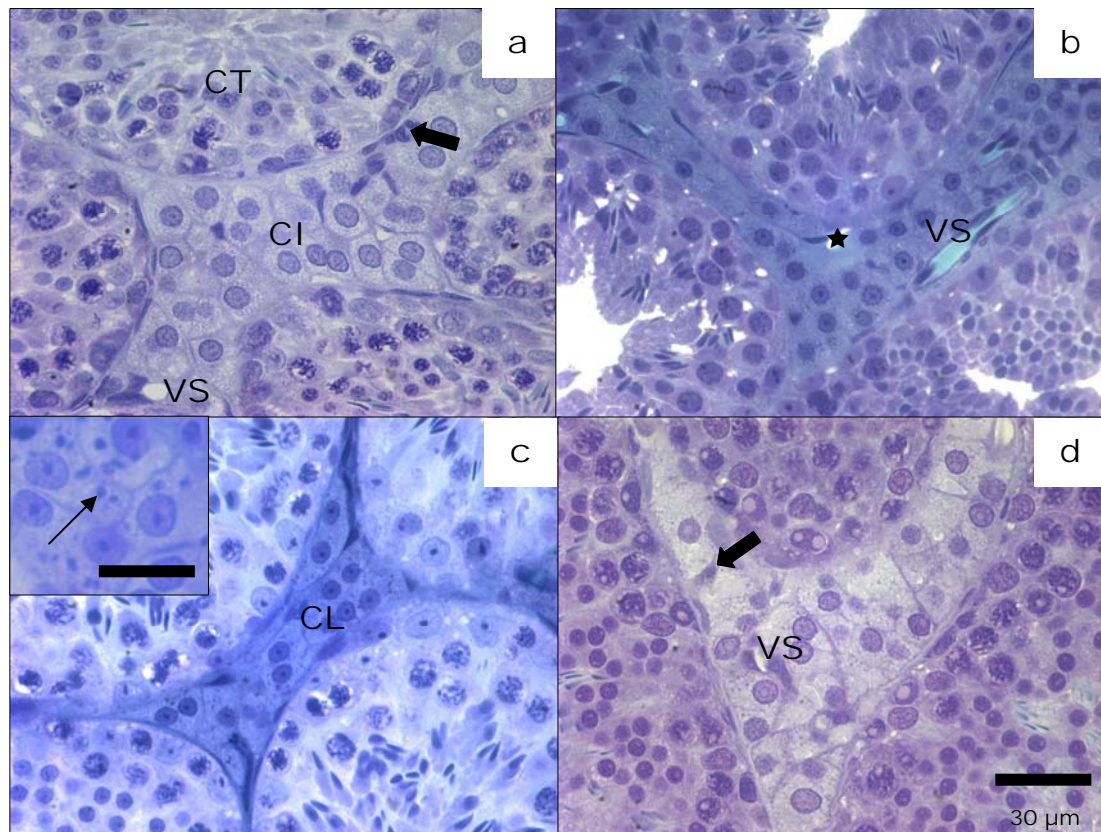
## 3. RESULTADOS

Na Tabela 1 encontram-se as médias por estação, referentes à temperatura, precipitação pluviométrica, fotoperíodo e umidade relativa do ar, registrados para a região de Viçosa, MG nos períodos de coleta, ao longo das diferentes estações climáticas anuais em 2007, sendo que os dados do outono referem-se ao ano de 2008.

Observou-se correlação positiva entre temperatura e o percentual e volume de intertúbulo e entre a proporção volumétrica de célula de Leydig no intertúbulo. O percentual de intertúbulo e de célula de Leydig e de tecido conjuntivo no intertúbulo, apresentaram correlação positiva com o fotoperíodo. Do mesmo modo, a precipitação pluviométrica correlacionou-se positivamente com o percentual e volume de espaço linfático no intertúbulo. Todas estas correlações foram altamente significativas (Apêndice 2).

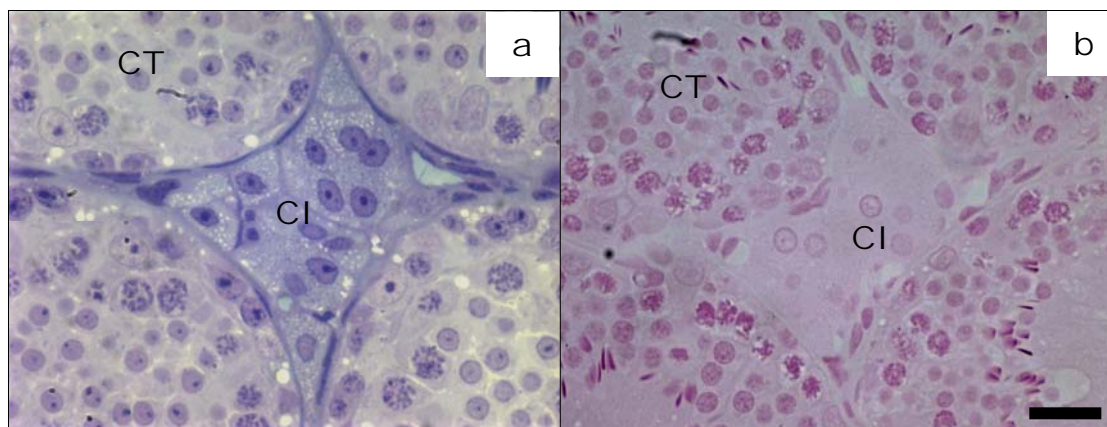
O compartimento intertubular ocupou em média 11% dos testículos de *M. molossus*, considerando-se todas as estações do ano. Este se apresenta constituído

predominantemente por células de Leydig, encontrando-se ainda vasos sanguíneos e escasso espaço linfático, assim como o tecido conjuntivo. Gotículas lipídicas e numerosos grânulos de lipofucsina foram observados dispersos pelo citoplasma das células de Leydig (Figura 1).



**Figura 1.** Secções transversais dos testículos de *Molossus molossus* coletados nas diferentes estações climáticas anuais. **a:** Verão, **b:** Outono, **c:** Inverno, **d:** Primavera. **CT:** compartimento tubular. **CI:** compartimento intertubular. **CL:** células de Leydig. **VS:** vasos sanguíneos. **★:** Espaço linfático. **➔:** Tecido conjuntivo. Azul de toluidina - borato de sódio. Detalhe: células de Leydig com grânulos de lipofucsina. Barra: 30µm.

Não foram identificados macrófagos nas secções coradas com azul de toluidina, ou mesmo por meio da reação para fosfatase ácida. Deste modo estes não puderam ser analisados separadamente, tendo sido considerados junto com o tecido conjuntivo (Figura 2).



**Figura 2.** Secções transversais dos testículos de *Molossus molossus*. **CT:** compartimento tubular. **CI:** compartimento intertubular. **a:** Azul de toluidina - borato de sódio. **b:** Fosfatase ácida. Barra: 30µm.

As proporções volumétricas (%) e o volume (ml) dos componentes do parênquima testicular estão registrados na Tabela 2. O percentual ocupado pelo compartimento intertubular no parênquima testicular foi maior no verão em relação ao outono e inverno ( $p < 0,05$ ) e igual à primavera, enquanto o percentual de túbulos seminíferos foi maior no outono e inverno em relação ao verão ( $p < 0,05$ ). Os volumes do intertúbulo e dos túbulos seminíferos não variaram significativamente entre as diferentes estações climáticas anuais ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 2.** Proporções volumétricas (%) entre túbulos seminíferos e intertúbulo e volume (mL) dos túbulos seminíferos e do intertúbulo nos testículos de *Molossus molossus* adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais.

Estação climática anual	Túbulos seminíferos (%)	Intertúbulo (%)	Volume dos túbulos seminíferos (mL)	Volume do intertúbulo (mL)
Verão	85,54±3,36 <sup>a</sup>	14,46±3,36 <sup>a</sup>	0,044±0,012 <sup>a</sup>	0,0079±0,0042 <sup>a</sup>
Outono	90,49±2,80 <sup>b</sup>	9,51±2,80 <sup>b</sup>	0,069±0,008 <sup>a</sup>	0,0071±0,0019 <sup>a</sup>
Inverno	92,38±4,07 <sup>b</sup>	7,62±4,07 <sup>b</sup>	0,066±0,013 <sup>a</sup>	0,0050±0,0017 <sup>a</sup>
Primavera	88,84±3,67 <sup>ab</sup>	11,16±3,67 <sup>ab</sup>	0,054±0,021 <sup>a</sup>	0,0068±0,0035 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

O percentual ocupado por cada um dos elementos que formam o compartimento intertubular encontra-se na Tabela 3, não tendo ocorrido diferença significativa entre tais variáveis ( $p>0,05$ ).

**Tabela 3.** Percentual de célula de Leydig, vaso sanguíneo, espaço linfático e tecido conjuntivo no compartimento intertubular dos testículos de *Molossus molossus* adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais.

Estação climática anual	Célula de Leydig (%)	Vaso sanguíneo (%)	Espaço linfático (%)	Tecido conjuntivo (%)
Verão	87,26±5,27 <sup>a</sup>	6,52±4,04 <sup>a</sup>	2,44±2,13 <sup>a</sup>	3,78±1,25 <sup>a</sup>
Outono	86,10±4,02 <sup>a</sup>	7,88±2,00 <sup>a</sup>	2,92±3,04 <sup>a</sup>	3,10±1,19 <sup>a</sup>
Inverno	86,70±2,36 <sup>a</sup>	8,50±1,50 <sup>a</sup>	0,85±0,90 <sup>a</sup>	3,95±1,74 <sup>a</sup>
Primavera	87,94±3,22 <sup>a</sup>	6,16±2,11 <sup>a</sup>	1,04±1,44 <sup>a</sup>	4,86±1,68 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p>0,05$ ).

Na Tabela 4 são demonstrados os percentuais representados pelos elementos do intertúbulo nos testículos de *M. molossus*. O percentual dos testículos representado pelas células de Leydig foi maior no verão em relação ao outono e ao inverno ( $p<0,05$ ). Já os percentuais dos testículos ocupados por vasos sanguíneos, espaços linfáticos e tecido conjuntivo não apresentaram variações evidentes entre as estações ( $p>0,05$ ). O percentual dos testículos ocupado pelo compartimento intertubular como um todo foi significativamente maior no verão em relação ao outono e inverno ( $p<0,05$ ).

**Tabela 4.** Percentual de célula de Leydig, vaso sanguíneo, espaço linfático, tecido conjuntivo e de intertúbulo no testículo de *Molossus molossus* adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais.

Estação climática anual	Célula de Leydig (%)	Vaso sanguíneo (%)	Espaço linfático (%)	Tecido conjuntivo (%)	Intertúbulo (%)
Verão	12,55±2,68 <sup>a</sup>	0,93±0,65 <sup>a</sup>	0,40±0,38 <sup>a</sup>	0,57±0,31 <sup>a</sup>	14,46±3,36 <sup>a</sup>
Outono	8,24±2,63 <sup>b</sup>	0,73±0,21 <sup>a</sup>	0,23±0,18 <sup>a</sup>	0,31±0,18 <sup>a</sup>	9,51±2,80 <sup>b</sup>
Inverno	6,63±3,55 <sup>b</sup>	0,62±0,29 <sup>a</sup>	0,05±0,04 <sup>a</sup>	0,33±0,28 <sup>a</sup>	7,62±4,07 <sup>b</sup>
Primavera	9,85±3,44 <sup>ab</sup>	0,67±0,29 <sup>a</sup>	0,08±0,08 <sup>a</sup>	0,55±0,27 <sup>a</sup>	11,16±3,67 <sup>b</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p>0,05$ ).

Não foi observada variação no volume médio dos elementos do intertúbulo por parênquima testicular entre as estações. Estes valores estão demonstrados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Valor médio do volume total (mL) dos elementos do compartimento intertubular por parênquima testicular de *Molossus molossus* adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais.

Estação climática anual	Célula de Leydig (mL)	Vaso sanguíneo (mL)	Espaço linfático (mL)	Tecido conjuntivo (mL)
Verão	0,00679±0,00349 <sup>a</sup>	0,00051±0,00044 <sup>a</sup>	0,00025±0,00031 <sup>a</sup>	0,00032±0,00027 <sup>a</sup>
Outono	0,00617±0,00180 <sup>a</sup>	0,00055±0,00016 <sup>a</sup>	0,00018±0,00016 <sup>a</sup>	0,00023±0,00012 <sup>a</sup>
Inverno	0,00438±0,00148 <sup>a</sup>	0,00042±0,00010 <sup>a</sup>	0,00003±0,00003 <sup>a</sup>	0,00021±0,00014 <sup>a</sup>
Primavera	0,00597±0,00289 <sup>a</sup>	0,00045±0,00034 <sup>a</sup>	0,00005±0,00004 <sup>a</sup>	0,00037±0,00030 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p>0,05$ ).

A morfometria das células de Leydig está registrada na Tabela 6, e seu número total e por grama de testículo e o índice Leydigossomático (ILS) encontram-se na Tabela 7. Não houve alteração significativa no diâmetro do núcleo das células de Leydig entre as estações ( $p>0,05$ ). No entanto, o percentual nuclear destas células foi maior no inverno ( $p<0,05$ ). Deste modo, o percentual representado pelo citoplasma foi menor nesta mesma estação ( $p<0,05$ ). Os volumes nucleares permaneceram sem alterações significativas entre as estações ( $p>0,05$ ). Porém, os volumes citoplasmático e celular apresentaram diminuição no inverno em relação ao verão ( $p<0,05$ ).

Tanto o número total de células de Leydig por testículo ou por grama de testículo, quanto o ILS não apresentaram diferenças significativas entre as estações ( $p>0,05$ ).

**Tabela 6.** Diâmetro nuclear de células de Leydig (CL), percentuais (%) de núcleo e citoplasma de CL, volumes (mL) de núcleo e citoplasma de CL e volume (mL) de CL nos testículo de *Molossus molossus* adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais.

Estação climática anual	Diâmetro nuclear de CL ( $\mu\text{m}$ )	Núcleo de CL (%)	Citoplasma de CL (%)	Volume nuclear de CL ( $\mu\text{m}^3$ )	Volume citoplasmático de CL ( $\mu\text{m}^3$ )	Volume de CL ( $\mu\text{m}^3$ )
Verão	8,21±0,50 <sup>a</sup>	16,01±5,04 <sup>b</sup>	83,99±5,04 <sup>a</sup>	292,56±52,19 <sup>a</sup>	1607,80±399,08 <sup>a</sup>	1900,36±394,94 <sup>a</sup>
Outono	8,09±0,26 <sup>a</sup>	14,94±1,59 <sup>b</sup>	85,06±1,59 <sup>a</sup>	278,39±27,19 <sup>a</sup>	1934,09±593,28 <sup>a</sup>	2212,48±595,71 <sup>a</sup>
Inverno	7,99±0,57 <sup>a</sup>	21,22±2,66 <sup>a</sup>	78,78±2,66 <sup>b</sup>	269,84±57,57 <sup>a</sup>	998,18±154,43 <sup>b</sup>	1268,02±195,73 <sup>b</sup>
Primavera	8,15±0,55 <sup>a</sup>	13,26±2,87 <sup>b</sup>	86,74±2,87 <sup>a</sup>	286,96±61,12 <sup>a</sup>	1645,74±389,34 <sup>a</sup>	1986,91±408,35 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p>0,05$ ).

**Tabela 7.** Número total de células de Leydig (CL) e número de CL por grama de testículo em *Molossus molossus* adultos coletados nas diferentes estações climáticas anuais.

Estação climática anual	Número total de células de Leydig ( $10^5$ )	Número de células de Leydig por grama de testículo ( $10^6$ )	ILS (%)
Verão	35,82±17,27 <sup>a</sup>	60,74±13,98 <sup>a</sup>	0,040±0,024 <sup>a</sup>
Outono	29,34±11,04 <sup>a</sup>	32,88±11,46 <sup>a</sup>	0,051±0,011 <sup>a</sup>
Inverno	35,10±11,82 <sup>a</sup>	48,58±24,76 <sup>a</sup>	0,030±0,013 <sup>a</sup>
Primavera	28,80±94,01 <sup>a</sup>	44,92±19,89 <sup>a</sup>	0,041±0,012 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem significativamente entre si ( $p>0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

O compartimento intertubular ou intersticial dos testículos é constituído por células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos e nervos, além de uma população variável de outras células, como fibroblastos, macrófagos e mastócitos que podem também estar presentes em algumas espécies (Setchell, 1991; França e Russell, 1998). A organização dos vasos ou espaços linfáticos e das células de Leydig nos testículos é bem variável entre os mamíferos (Fawcett et al., 1973; Russell, 1996).

Este compartimento também apresenta grande variação quanto ao seu volume e proporção em diferentes espécies, com relação a todos os seus componentes, incluindo o tecido conjuntivo (Russell et al., 1990). Seu volume pode

atingir de 11,7% no cão (França e Russell, 1998) a 45,2% na capivara (Costa et al., 2006).

Em *M. molossus* há predomínio de células de Leydig no intertúbulo e escasso tecido conjuntivo, assim como espaços linfáticos e vasos sanguíneos. O padrão intertubular apresentado por *M. molossus* permite classificá-lo como pertencente à categoria III, descrita por Fawcett et al. (1973). Estes autores colocam nesta categoria o porco doméstico, o javali, a zebra e o gambá, citando que nestes animais as células de Leydig podem ocupar de 20 a 60% do volume dos testículos. No morcego *M. molossus* encontrou-se 87% do intertúbulo ocupado por estas células.

As células de Leydig representam a porção endócrina testicular, fornecendo o suporte androgênico necessário à manutenção da espermatogênese, bem como o desenvolvimento e manutenção das características sexuais secundárias (O'Donnell et al., 2001; Gilbert, 2006). A testosterona, seu principal produto de secreção, está ainda relacionada ao comportamento reprodutivo dos animais, como o status de um macho dentro de uma colônia, libido e demarcação de território (Hadley, 1988).

A presença de gotículas lipídicas dispersas pelo citoplasma das células de Leydig em *M. molossus* foram previamente reportadas no morcego (*Myotis schreibersi*) (Ohata, 1979), camundongo, macaco, leão (Russell, 1996) e onça pintada (Azevedo et al., 2008). Russell (1996) cita que estas constituem fonte de precursores para a biosíntese de andrógenos. Grânulos de lipofucsina foram também encontrados em quantidades variáveis, assim como na onça pintada (Azevedo et al., 2008), cobaio, tatu e humanos, sendo estes considerados uma forma semi-degradada de lipídeos (Russell, 1996).

Observaram-se temperaturas mais elevadas, maior precipitação pluviométrica, e maior fotoperíodo durante o verão, coincidindo com o maior percentual de tecido intertubular e de células de Leydig, também nesta estação.

Correlacionando-se os fatores ambientais às análises morfométricas do intertúbulo, observou-se que quanto maior a temperatura do ar, maiores os percentuais e volumes de intertúbulo e de células de Leydig no intertúbulo. Do mesmo modo, quanto maior a precipitação pluviométrica, maior foi também o percentual de espaço linfático e seu volume no intertúbulo. Verificou-se também correlação positiva entre o aumento do fotoperíodo com o percentual de intertúbulo e a proporção volumétrica de célula de Leydig e tecido conjuntivo no espaço



intertubular. O maior percentual do intertúbulo de *M. molossus* ocupado por estas células no verão em relação ao outono e inverno, pode indicar aumento na capacidade esteroidogênica do animal no verão, podendo ainda estar relacionado a recuperação do epitélio seminífero e preparação para a próxima estação de acasalamento, a partir do outono. A regulação hormonal é fundamental para a manutenção do comportamento reprodutivo do animal, para a manutenção do harém e realização da cópula, e ainda como fator parácrino, influenciando o desenvolvimento do epitélio germinativo.

Uma estratégia reprodutiva comum entre os morcegos é o sistema de acasalamento poligínico, onde um macho defende um harém composto por várias fêmeas (Bradbury e Vehrencamp, 1977; Altringham, 1998). A poliginia é provavelmente o sistema de acasalamento que prevalece entre morcegos (Nowak, 1994), embora possam também ser observados os sistemas de acasalamento dos tipos monogâmico e promíscuo, dependendo da região e da espécie (Nowak, 1994; Altringham, 1998). O tamanho do harém é variável, dependendo da espécie e do grupo. Segundo Bradbury e Vehrencamp (1977), o neo-quiróptero *Saccopteryx bilineata* pode formar haréns compostos por um macho para oito fêmeas, em um grupo de cerca de 40 morcegos. Uma alta concentração plasmática de testosterona será requisitada neste caso, para que o macho mantenha sua dominância.

Observou-se evidente acúmulo de gotículas lipídicas nas células de Leydig de *M. molossus*, em todas as estações do ano, sendo que no inverno puderam ser encontradas células multinucleadas. Embora, na maioria das espécies as células de Leydig se apresentem uninucleadas, células binucleadas e multinucleadas foram relatadas também em humanos, marmotas e leões (Sinha e Seal, 1969; Russell, 1996).

Vários autores citam alterações morfológicas e secretórias das células de Leydig em morcegos sazonais (Racey e Tam, 1974; Gustafson e Shemesh, 1976; Loh e Gemmell, 1980; Bernard, 1986 e Gustafson, 1987). Gustafson (1987) descreveu alterações na histologia das células de Leydig no insetívoro *Myotis lucifugus lucifugus* no nordeste dos Estados Unidos, correlacionadas à variações sazonais nas concentrações plasmáticas de testosterona. Neste estudo observou-se que com a retomada da atividade espermatogênica na primavera, após o período de hibernação, as células de Leydig tornam-se hipertrofiadas e acumulam inclusões lipídicas, seguido pelo pico na concentração de testosterona plasmática. Loh e

Gemmell (1980) relatam alterações na ultra-estrutura destas células no morcego australiano *Myotis adversus*, notando que as células de Leydig tornaram-se hipertrofiadas durante a estação reprodutiva, enquanto que durante o período de regressão testicular o tamanho celular e o número de grânulos citoplasmáticos são significativamente reduzidos.

Enquanto Carvalho (2007) observou diminuição do intertúbulo no roedor silvestre *Akodon cursor* no verão devido à redução das proporções de tecido conjuntivo, em *M. molossus* houve aumento do percentual deste parâmetro no verão, o que parece reflexo do aumento percentual de células de Leydig nos testículos, também no verão, visto que se trata do elemento predominante no tecido intertubular desta espécie.

O aumento no percentual das células de Leydig ocupado pelo núcleo no inverno parece ter refletido na diminuição do percentual e volume citoplasmáticos nesta mesma estação, o que pode indicar a redução da síntese de testosterona nesta estação. O aumento no percentual citoplasmático observado a partir da primavera parece reflexo de um sinal decorrente do aumento nuclear no inverno. Sabe-se que a capacidade produtiva das células de Leydig está intimamente relacionada à quantidade de retículo endoplasmático liso presente em seu citoplasma (Zirkin et al., 1980). Este fato corrobora os maiores percentuais e volumes citoplasmáticos registrado para estas células, a partir da primavera, encontrando maior valor no outono.

O número de células de Leydig por grama de testículo, com média de  $47 \times 10^6$ , esteve dentro da faixa observada nas espécies domésticas, que varia de  $20 \times 10^6$  a  $87 \times 10^6$  (França e Russell, 1998; Gomes, 2007). Castro et al. (2002) propõem uma correlação altamente significativa do percentual do núcleo e do número de células de Leydig por grama de testículo, com os níveis plasmáticos e testiculares de testosterona em coelhos, o que não foi observado para *M. molossus*. Costa e Paula (2006) observaram uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de testosterona e o volume individual de células de Leydig. Estudos correlacionando a estrutura e funções destas células em várias espécies de mamíferos mostraram que variações na síntese e secreção de testosterona dependem mais da capacidade individual desta célula do que do volume total destas no testículo (Ewing et al., 1979). Verificou-se em *M. molossus*, que o principal componente da célula de Leydig que mostra sazonalidade é o citoplasma, que apresenta seu percentual e volume

menores no inverno sendo responsável pela diminuição do volume global desta célula na mesma estação.

Uma grande variação é observada em diversas espécies domésticas, silvestres ou laboratoriais, quanto ao volume de células de Leydig, de modo que este valor situa-se entre  $350\mu\text{m}^3$  a  $2.580\mu\text{m}^3$  (França e Russell, 1998; França e Godinho, 2003; Barros, 2005; Costa e Paula, 2006; Gomes, 2007; Caldeira, 2007; Azevedo et al., 2008). Em *M. molossus* o menor valor foi observado no inverno, com  $1.268,02\mu\text{m}^3$  e o maior no outono, com  $2.212,48\mu\text{m}^3$ , encontrando-se dentro da faixa registrada para espécies silvestres, como a onça pintada, com  $2.386\mu\text{m}^3$  (Azevedo et al., 2008) e o leão africano, com  $2.578\mu\text{m}^3$  (Barros, 2005).

O aumento no volume celular observado no verão pode indicar maior capacidade androgênica nesta estação. Carvalho (2007) observou aumento significativo do volume de células de Leydig nos testículos de *A. cursor* no outono quando comparado ao verão, atribuindo tal fato a ser o outono um período de recuperação hormonal do testículo para manter as características reprodutivas ao longo do inverno.

## **5. CONCLUSÕES**

Pode-se concluir que *M. molossus* apresenta claramente maior investimento em tecido intertubular e maior proporção de células de Leydig no verão, num indicativo de aumento da capacidade androgênica nesta estação sinalizando o início da recuperação do epitélio germinativo. Além disso, o aumento da proporção volumétrica e do volume citoplasmático das células de Leydig no outono indica a preparação para a estação reprodutiva dessa espécie.

## **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altringham, J. D., 1998. **Bats: Biology and behavior**. University Press, Oxford, 262 p.

Azevedo, M.H.F., Paula, T.A.R., Balarini, M.K., Matta, S.L.P., Peixoto, J.V., Guião-Leite, F.L., Rossi Jr, J., Costa, E.P., 2008. Organization and quantification of the elements in the intertubular space in the adult jaguar testis (*Panthera onca*, Linnaeus, 1758). **Micron** (In press).

Barros, J.B.G., 2005. **Análise morfofuncional do testículo e da espermatogênese de leões africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 77 pp.

Bernard, R.T.F., 1986. Seasonal changes in plasma testosterone concentrations and Leydig cell and accessory gland activity in the Cape horseshoe bat (*Rhinolophus capensis*). **Journal of Reproduction and Fertility**. 78: 413-422.

Bradbury, J.W., Vehrencamp, S.L., 1977. Social organization and foraging in emballonurid bats. I. Field studies. **Behavioral, Ecology and Sociobiology**. 1: 337-81.

Caldeira, B.C., 2007. **Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766) adulto**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 61 pp.

Carvalho, F.A.R., 2007. **Morfologia e morfometria testicular do roedor silvestre *Akodon cursor* (Winge,1887) (Rodentia, Muridae)**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 46 p.

Castro, A.C.S., Berndtson, W.E., Cardoso, F.M., 2002. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency in rabbits. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 35: 493-498.

CFMV - **Conselho Federal de Medicina Veterinária**, 2002. Resolução nº 714, de 20 de Junho de 2002. Disponível em [www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao\\_714.pdf](http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_714.pdf).

Costa, D.S., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., 2006. The intertubular morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. **Animal Reproduction Science**. 91: 173-179.

Costa, D.S., Paula, T.A.R., 2006. Testosterone level, nasal gland volume and Leydig cell morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 58(6): 1086-1091.

Dweyr, P.D., 1970. Latitude and breeding season in a polyestrus species of *Myotis*. **Journal of Mammalogy**. 51(2): 405-410.

Ewing, L.L., Zirkin, B.R., Cochran R.C., 1979. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. **Endocrinology**. 105: 1135-1142.

Fabián, M.E., Marques, R.V., 1989. Contribuição ao conhecimento da biologia reprodutiva de *Molossus molossus* (Pallas, 1766) (Chiroptera, Molossidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. 6(4): 603-610.

Fawcett, D.W., Neaves, W.B., Flores, M.N., 1973. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biology of Reproduction**. 9: 500-532.

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

França, L.R., Russell, L.D., 1998. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia, F., Regadera, J. (Eds.). **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. Churchill Livingstone, Madrid, pp.197-219.

França, L.R., Godinho, C.L., 2003. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). **Biology of Reproduction**. 68:1554-1561.

Gilbert, F.S., 2006. **Developmental Biology**. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. 817 p.

Gomes, M.L.M., 2007. **Morfometria testicular de ratos wistar adultos tratados com infusão aquosa de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss. Meliaceae)**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 49 pp.

Gomori, G., 1952. Histochemistry of esterases. In: Bancroft, J. D., Stevens, A. (Eds.). **Theory and practice of histological techniques**. Churchill Livingstone, New York, pp. 397-398.

Gustafson, A.W., 1987. Changes in Leydig cell activity during the annual testicular cycle of the bat *Myotis lucifugus lucifugus*: histology and lipid histochemistry. **American Journal of Anatomy**. 178(4): 312-325.

Gustafson, A.W., Shemesh, M., 1976. Changes in plasma testosterone levels during the annual reproductive cycle of the hibernating bat *Myotis lucifugus lucifugus* with a survey of plasma testosterone levels in adult male vertebrates. **Biology of Reproduction**. 15: 9-24.

Hadley, M.E., 1988. **Endocrinology**. Prentice Hall, New Jersey USA.

Johnson, L., Petty, C.S., Neaves W.B., 1981. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. **Biology of Reproduction**. 25: 217-226.

La Val, R.K., Fitch, H.S., 1977. Structure, movement and reproduction in three Costa Rica bat communities. **Occasional Paper Museum of Nature History University Kansas**. 69: 1-28.

Loh, H.S.F., Germmell, R.T., 1980. Changes in the fine structure of the testicular Leydic cells of the Seasonally-breeding bat, *Myotis adversus*. **Cell and Tissue Research**. 210: 339-347.

Nowak, R. M., 1994. **Walker's Bats of the world**. Johns Hopkins University Press, London.

O'Donnel, L., Robertson, K.M., Jones M.E., 2001. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrinology**. 22: 280-318.

Ohata, M., 1979. Electron microscope study on the bat testicular interstitial cell with special reference to the cytoplasmic crystalloid. **Archivum Histologicum Japonicum**. 42(2): 103-18.

Pacheco, S.M., 2001. **Biologia reprodutiva, desenvolvimento pré e pós-natal e maturidade sexual de morcegos da região sul, Brasil (Chiroptera, Phyllostomidae, Vespertilionidae, Molossidae)**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 115 pp.

Payne, A.H., Hardy, M. P., Russell L.D., 1996. **The Leydig cell**. Cache River Press, Vienna, 734 p.

Pirlot, P., 1967. Periodicite de la reproduction chez les chiropteres neotropicaux. **Mammalia**. 31(3): 361-366.

Racey, P.A., Tam, W.H., 1974. Reproduction in male *Pipistrellus pipistrellus* (Mammalia: Chiroptera). **Journal of Zoology**. 172: 101.

Russell, L.D., 1996. Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A.H., Hardy, M.P., Russell, L.D. (Eds.). **The Leydig Cell**. Cache River Press, Vienna. pp. 43-96

Russell, L.D., Ettlín, R.A., Sinha-Hikim, A.P., Clegg, E.D., 1990. Mammalian spermatogenesis. In: Russell, L.D., Ettlín, R.A., Sinha-Hikim, A.P., Clegg, E.D. (Eds.). **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Cache River Press, Clearwater, Florida. pp. 1-40

SAEG - **Sistema para análises estatísticas**, 1999. Eduardo Paulino da Costa, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa.

Setchell, B.P., 1991. Male reproductive organs and semen. In: Cupps, P. T. (Ed.). **Reproduction in domestic animals**. Academic Press, New York. pp. 221-249

Sinha, A.A., Seal, U.S., 1969. The testicular interstitial cells of a lion a three-toed sloth. **Anatomical Record**.164: 35-46.

Tae, H.J., Jang, B.G., Ahn, D.C., Chol, E.Y., Kang, H.S., Kim, N.S., Lee, J.H., Park, S.Y., Yang, H.H., Kim I.S., 2005. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karkpovi*) during the breeding and non-breeding seasons. **Veterinary Research Communication**. 29(7): 629-643.

Zirkin, B.R., Ewing,L.L., Kromann, N., 1980. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. **Endocrinology**. 107: 1867-1874.



## CONCLUSÕES GERAIS

- O padrão testicular do morcego *Molossus molossus* é característico da maioria dos mamíferos.
- Os machos apresentaram sazonalidade reprodutiva mostrando maior atividade espermatogênica no outono, onde observou-se o aumento dos parâmetros morfométricos: peso testicular, índice gonadossomático, percentual de túbulos seminíferos, índice tubulossomático, percentuais de lúmen e de túnica própria e diâmetro dos túbulos seminíferos.
- O comprimento tubular mostrou-se acima da média dos mamíferos já estudados, havendo grande investimento no compartimento tubular.
- Foi encontrada uma das maiores proporções de túbulos seminíferos entre os mamíferos.
- Houve maior investimento em tecido intertubular e maior proporção de células de Leydig no verão, e maior proporção volumétrica e volume do citoplasma destas células no outono, indicando maior capacidade androgênica nestas estações.

## APÊNDICE 1

Matriz de correlação entre o percentual de túbulos seminíferos, lúmen, epitélio seminífero e túnica própria, diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero, volume tubular, comprimento dos túbulos seminíferos por testículo, por grama de testículo e comprimento tubular total e índice tubulossomático e fatores abióticos médios nas diferentes estações climáticas anuais em *M. molossus*.

	% Tub	% Lum	% Epi	% Tun	DT	AE	VT	CTT	CT/g/T	CTT0	ITS
<b>Temp</b>	-0,9170*	-0,8718	0,2824	-0,5628	-0,6806	-0,3431	0,7289	-0,7774	0,6170	-0,7328	0,7579
<b>Prec</b>	-0,8923	-0,8337	0,6090	-0,9035*	-0,5838	0,0026	-0,7252	-0,9716*	0,5419	-0,9716*	0,9372*
<b>Foto</b>	-0,9653*	-0,9830*	0,5942	-0,6759	-0,9372*	-0,6545	-0,9483*	-0,7774	0,9048*	-0,7774	0,8540
<b>Umid</b>	0,0360	0,1557	-0,0391	-0,3125	0,4751	0,9060*	0,2913	-0,2998	-0,5006	-0,2998	0,1434

**Temp:** temperatura média do ar, **Prec:** precipitação pluviométrica média, **Foto:** fotoperíodo médio, **Umid:** umidade relativa do ar média, **% Tub:** percentual de túbulo, **% Lum:** percentual de lúmen, **% Epi:** percentual de epitélio, **% Tun:** percentual de túnica, **DT:** diâmetro tubular, **AE:** altura epitelial, **VT:** volume tubular, **CTT:** comprimento de túbulos seminíferos por testículo, **CT/g/T:** comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo, **CTT0:** comprimento tubular total, **ITS:** índice tubulossomático.

\* $p < 0,05$ .

## APÊNDICE 2

Matriz de correlação entre o percentual de intertúbulo, volume de intertúbulo por parênquima testicular, percentual de células de Leydig no testículo, volume de células de Leydig por parênquima testicular, percentual de espaços linfáticos no testículo, volume de espaços linfáticos por parênquima testicular, percentual de vasos sanguíneos no intertúbulo, volume de vasos sanguíneos por parênquima testicular, percentual de tecido conjuntivo no testículo e volume de tecido conjuntivo por parênquima testicular e fatores abióticos médios nas diferentes estações climáticas anuais em *M. molossus*.

	% Int	VI	% Ley	V Ley	% Lin	V Lin	% VS	V VS	% TC	V TC
<b>Temp</b>	0,9170*	0,9771*	0,9196*	0,9809*	0,7581	0,7189	-0,8375	0,6333	0,7445	0,7336
<b>Prec</b>	0,8923	0,8494	0,08770	0,8383	0,9866*	0,9402*	-0,4790	0,6314	0,5317	0,3292
<b>Foto</b>	0,9653*	0,7933	0,9733*	0,7996	0,6342	0,5157	-0,9293*	0,2391	0,9550*	0,8683
<b>Umid</b>	-0,0360	0,1974	-0,0678	0,1744	0,5523	0,6640	0,5469	0,6644	-0,5495	-0,6823

**Temp:** temperatura média do ar, **Prec:** precipitação pluviométrica média, **Foto:** fotoperíodo médio, **Umid:** umidade relativa do ar média, **% Int:** percentual de intertúbulo, **VI:** volume de intertúbulo, **% Ley:** percentual de célula de Leydig, **V Ley:** volume de célula de Leydig, **% Lin:** percentual de espaço linfático, **V Lin:** volume de espaço linfático, **% VS:** percentual de vaso sanguíneo, **V VS:** volume de vaso sanguíneo, **% TC:** percentual de tecido conjuntivo, **V TC:** volume de tecido conjuntivo.

\* $p < 0,05$ .