

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**EM BIOLOGIA ANIMAL**

**TESE**

**Aspectos histológicos, histoquímicos e imuno-histoquímicos do  
intestino e pâncreas de morcegos da família Phyllostomidae  
(Mammalia, Chiroptera)**

**Nathália das Neves Cardoso**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**Aspectos histológicos, histoquímicos e imuno-histoquímicos do  
intestino e pâncreas de morcegos da família Phyllostomidae  
(Mammalia, Chiroptera)**

**NATHÁLIA DAS NEVES CARDOSO**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Dr. Armando Sales**

*Coorientação da Professora*  
**Dra. Aparecida Alves do Nascimento**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Área de Concentração em Zoologia.

Seropédica, RJ  
Agosto de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D268a Das Neves Cardoso, Nathália, 21/11/1987-  
Aspectos histológicos, histoquímicos e imuno  
histoquímicos do intestino e pâncreas de morcegos da  
família Phyllostomidae (Mammalia, Chiroptera) /  
Nathália Das Neves Cardoso. - 2017.  
68 f.

Orientador: Armando Sales.  
Coorientador: Aparecida Alves do Nascimento.  
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Animal, 2017.

1. Histologia. 2. Células endócrinas. 3. Intestino.  
4. Pâncreas. 5. Morcegos. I. Sales, Armando, 1945-  
orient. II. Alves do Nascimento, Aparecida, 1973-  
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.  
IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**NATHÁLIA DAS NEVES CARDOSO**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Área de concentração em Zoologia.

TESE APROVADA EM:     /     / 2017

---

Dr. Armando Sales (UFRRJ)  
(Orientador)

---

Dr. Adriano Lúcio Peracchi (UFRRJ)

---

Dr. Marcos Antonio José dos Santos (UFRRJ)

---

Dra. Clarice Machado dos Santos (UFF)

---

Dra. Daniela Dias (FIOCRUZ)

---

Dra. Nadja Lima Pinheiro (UFRRJ)

---

Dr. Marcelo Rodrigues Nogueira (UENF)

## RESUMO

CARDOSO, Nathália das Neves. **Aspectos histológicos, histoquímicos e imuno-histoquímicos do intestino e pâncreas de morcegos da família Phyllostomidae (Mammalia, Chiroptera)**. 2017. 76p. Tese (Doutorado em Biologia Animal) Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Estudos histológicos, histoquímicos e imuno-histoquímicos vêm buscando de forma comparativa obter dados sobre o tubo gastrointestinal (TGI) de morcegos, devido ao fato destes animais possuírem uma diversificada dieta. Assim, o presente estudo visou descrever as características histológicas e histoquímicas do intestino e pâncreas de quatro espécies de morcegos da família Phyllostomidae (*Dryadonycteris capixaba*, *Pygoderma bilabiatum*, *Chiroderma villosum* e *Phyllostomus discolor*), bem como analisar a presença de células endócrinas nesses órgãos das espécies estudadas, buscando relacionar interespecificamente as características encontradas. Os animais analisados foram cedidos da coleção zoológica do Laboratório de Mastozoologia do Departamento de Biologia Animal (DBA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Os órgãos foram fixados (formalina 10%) e acondicionados em álcool a 70%. Posteriormente foi encaminhado ao Laboratório de Histologia e Embriologia da UFRRJ, no qual foram submetidos aos processamentos histológicos de rotina e aos testes imuno-histoquímicos. Histologicamente o intestino e o pâncreas das espécies estudadas foram similares. Quanto aos testes imuno-histoquímico, dois tipos de células imunorreativas (IR) foram identificadas na mucosa intestinal das espécies estudadas, células produtoras de 5HT e CCK. Já no pâncreas foram observadas células imunorreativas (IR) à insulina, à glucagon à somatostatina e colecistocinina. Através deste estudo, notou-se que houve diferença na distribuição e na frequência relativa das células endócrinas no intestino delgado dos animais estudados. Enquanto no pâncreas foi observado similaridade entre as espécies quando comparado à histologia e a distribuição das células endócrinas estudadas.

**Palavras-chave:** Histologia, intestino, pâncreas, morcegos.

## ABSTRACT

CARDOSO, Nathália das Neves. **Histological, histochemical and immunohistochemical aspects of the intestine and pancreas of bats of the family Phyllostomidae (Mammalia, Chiroptera)**. 2017. 76p. Thesis (Doctor in Animal Biology). Institute of Biological Sciences and Health. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Histological, histochemical and immunohistochemical studies have sought to obtain data on the gastrointestinal tube (GIT) of bats, due to the fact that these animals have a diversified diet. The present study aimed to describe the histological and histochemical characteristics of the intestine and pancreas of four species of bat the family Phyllostomidae (*Dryadonycteris*, *Capixaba*, *Pygoderma*, *bilabiatum*, *Chiroderma*, *Villosum* and *Phyllostomus discolor*), as well as to analyze the presence of endocrine cells in these organs of the species studied, seeking to relate interspecifically the characteristics found. The animals were analyzed transferred from the zoological collection of the Microbiology Laboratory of the Department of Animal Biology (DBA) of the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). The organs were fixed (10% formalin) and conditioned in 70% alcohol. Subsequently, it was forwarded to the Laboratory of Histology and Embryology of UFRRJ, in which they were submitted to routine histological processing and immunohistochemical tests. Histologically the intestine and the pancreas of the species studied were similar. As for the immunohistochemical tests, two types of immunoreactive cells (IR) were identified in the intestinal mucosa of the studied species, 5HT and CCK producing cells. In the pancreas, immunoreactive cells (IR) were seen on insulin, glucagon on somatostatin and cholecystokinin. Through this study, there were differences in the distribution and relative frequency of endocrine cells in the small intestine of the animals studied. While in the pancreas species similarity was observed when compared to the histology and distribution of endocrine cells studied.

**Key words:** Histology, intestine, pancreas, bat.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO geral</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>1</b>
2.1 CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DOS ÓRGÃOS ESTUDADOS	1
2.2 PAPEL DOS QUIRÓPTEROS PARA O MEIO AMBIENTE	3
2.3 ESPÉCIES ANALISADAS	3
2.4 PEPTÍDEOS REGULADORES PRODUZIDOS PELAS CÉLULAS ENDÓCRINAS A SEREM INVESTIGADAS	5
2.5 TIPOS DE COMUNICAÇÕES CELULARES	6
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>8</b>
<b>RESUMO</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>10</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>12</b>
3.1 ANIMAIS ESTUDADOS	12
3.2 A RESERVA NATURAL VALE: O LOCAL DE CAPTURA DOS EXEMPLARES ESTUDADOS	12
3.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS	13
3.4 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	13
3.5 OBSERVAÇÕES E FOTOMICROGRAFIAS	14
3.6 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS CÉLULAS IMUNORREATIVAS E MENSURAÇÃO DAS VILOSIDADES	14
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>14</b>
4.1 DESCRIÇÕES HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS DO INTESTINO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS	15
4.1.1 Duodeno	15
4.1.2 Jejunum	19
4.1.3 Íleo	22
4.1.4 Intestino grosso	26
4.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CÉLULAS DO SISTEMA NEUROENDÓCRINO DIFUSO NO INTESTINO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS	29
4.2.1 Células imunorreativas à Serotonina (5-HT)	29
4.2.2 Células imunorreativas à Colecistocinina (CCK)	33
4.2.3 Células imunorreativas à Somatostatina (SOM)	34
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>40</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>41</b>
<b>RESUMO</b>	<b>42</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>43</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>44</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>44</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	44
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>45</b>
3.1 ANIMAIS ESTUDADOS	45
3.2 ANÁLISES DE LABORATÓRIO	45
3.3 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	45

3.4 OBSERVAÇÕES E FOTOMICROGRAFIAS	46
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>46</b>
4.1 DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA DO PÂNCREAS DAS ESPÉCIES ESTUDADAS	46
4.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CÉLULAS ENDÓCRINAS NO PÂNCREAS DE <i>DRYADONYCTERIS CAPIXABA</i> E <i>PYGODERMA BILABIATUM</i>	46
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>51</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>53</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>53</b>

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

A ordem Chiroptera inclui mais de 1300 espécies existentes, formando a segunda maior ordem de mamífero (VOIGT & KINGSTON, 2016). Esta é dividida por duas grandes Subordens: Yinpterochiroptera e Yangochiroptera (TEELING *et al.*, 2005). O sucesso da ordem Chiroptera pode ser explicado por vários fatores, entre eles, adaptações morfofisiológicas que permitem a exploração de vários nichos ecológicos (TADDEI, 1983).

Na região neotropical, a família Phyllostomidae é a mais diversa, em espécies e hábitos alimentares, interagindo com diferentes espécies de animais e vegetais, sendo apontada na literatura como crucial para a dinâmica de florestas tropicais, por conter os principais dispersores de sementes de muitas plantas pioneiras nesta região (TAVOLONI, 2005). No Brasil, o número de espécies conhecidas até o momento chega à 184, sendo a família mais abundante e a única a apresentar ornamentações nasais conhecida como folha nasal, estrutura importante para o processo de ecolocalização (REIS *et al.*, 2007; PERACCHI *et al.*, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2014; DÍAZ *et al.*, 2016).

Estudos histológicos, histoquímicos e ultra-estruturais vêm buscando de forma comparativa obter dados sobre o trato gastrointestinal (TGI) de morcegos. Isto se deve ao fato dos morcegos possuírem uma diversificada dieta, sendo possível a investigação da relação entre a distribuição e frequência das células endócrinas com os hábitos alimentares (FORMAN *et al.*, 1979; YAMADA *et al.*, 1984; SANTOS, 2007). Sendo assim, estes organismos servem como um modelo interessante para o entendimento da evolução, devido a sua história ser marcada por uma grande radiação adaptativa associada a hábitos alimentares.

A presença e distribuição relativa de diferentes células endócrinas, produtoras de hormônios que desempenham importantes papéis nas funções fisiológicas do sistema digestório, podem variar entre as espécies devido às distintas condições fisiológicas e hábitos alimentares, indicando importantes implicações funcionais das mesmas (FILHO *et al.*, 2001; KU *et al.*, 2004). Ademais, segundo D'este *et al.* (1994) o sistema endócrino difuso pode ser considerado um componente importante nos estudos filogenéticos em répteis. Portanto, acredita-se que essa correspondência também possa ser encontrada em mamíferos.

O presente estudo teve como objetivo fazer a descrição histológica de órgãos do sistema digestório da espécie recém-descrita de morcego *Dryadonycteris capixaba* Nogueira, Lima, Peracchi & Simmons, 2012 e das espécies *Pygoderma bilabiatum* (Wagner, 1843), *Chiroderma villosum* Peters, 1860 e *Phyllostomus discolor* (Wagner, 1843) procurando relacionar as características histológicas com o hábito alimentar, além de contribuir como pesquisa base sobre os aspectos do sistema neuroendócrino difuso de cada espécie.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Características morfofisiológicas dos órgãos estudados

O sistema digestório consiste em: cavidade oral, faringe, esôfago, estômago, intestinos delgado e grosso, e suas glândulas associadas (glândulas salivares, fígado e pâncreas). Sua função é obter as moléculas necessárias para a manutenção, o crescimento e as demais necessidades energéticas do organismo a partir dos alimentos ingeridos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Em humanos, o intestino delgado é o que apresenta a maior extensão, podendo medir aproximadamente 5 metros. Sua forma básica é uma estrutura tubular especializada que se encontra no interior da cavidade abdominal. É no intestino delgado que acontece o final da digestão dos alimentos, absorção de nutrientes pelas células epiteliais de revestimento e secreção endócrina. Este órgão é dividido em três segmentos sequenciais, sendo eles o duodeno, jejuno e íleo, podendo apresentar diferenças histológicas nas camadas mucosa, submucosa e muscular (KIERSZENBAUM, 2004; TELSER *et al.*, 2007; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Segundo Junqueira & Carneiro (2013) o intestino grosso costuma ser classificado em diferentes porções: ceco, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, cólon sigmoide, reto e ânus. Sendo o mesmo caracterizado pela ausência de pregas (exceto na porção distal) e vilosidades na camada mucosa. Entretanto, quando comparado com o intestino anterior, esse órgão apresenta criptas intestinais longas, abundância de células caliciformes e um pequeno número de células enteroendócrinas. O intestino grosso apresenta como principal função absorção de água, fermentação, formação da massa fecal e produção de muco (GUYTON & HALL, 2002).

Em morcegos os intestinos são mais curtos quando comparados com outros mamíferos (FORMAN *et al.*, 1979), havendo diferença também dentro da própria ordem Chiroptera, onde animais de hábitos frugívoros apresentam intestinos mais longos (em relação com o comprimento do corpo) do que os insetívoros, os carnívoros, os nectarívoros, os onívoros e os hematófagos (ROBIN, 1881; EISENTRAUT, 1950). Na maioria das espécies desse mamífero voador, o intestino delgado é composto por um duodeno muito curto, porém de grande diâmetro. Já na junção intestino delgado com o intestino grosso é possível verificar uma moderada dilatação, resultante da presença das placas de Payer. Nesses animais o ceco é ausente e o intestino grosso é curto, não formando os segmentos ascendente e transversos (FORMAN *et al.*, 1979).

O pâncreas é um órgão que contém duas populações distintas de células, as células exócrinas que secretam enzimas no trato digestório e as células endócrinas que secretam hormônios na corrente sanguínea. Ele surge a partir do endoderma como um broto dorsal e um broto ventral que se fundem para formar o único órgão (SLACK, 1995).

Anatomicamente o pâncreas se divide em três regiões: duodenal (cabeça), ânulo (corpo) e esplênica (cauda). Este órgão apresenta dois principais tipos de tecidos os ácinos (porção exócrina), que secretam sucos digestivos no duodeno e as ilhotas de Langerhans ou pancreáticas (porção endócrina). As ilhotas são constituídas por três tipos principais de células, as células *alfa* que secretam glucagon, *beta* que secretam insulina e *delta* que secretam somatostatina (GUYTON & HALL, 2002).

De acordo com Slack (1995), mamíferos, aves, répteis e anfíbios têm um pâncreas com histologia e modo de desenvolvimento semelhante, enquanto que em alguns peixes, as células das ilhotas são segregadas como corpos de Brockmann. Apesar das semelhanças as células das ilhotas pancreáticas podem variar tanto entre espécies, quanto em diferentes condições e demanda de energia (KRAMER & BUFFENSTEIN, 2004).

## 2.2 Papel dos quirópteros para o meio ambiente

Os morcegos apresentam um papel altamente significativo nos ecossistemas florestais, atuando na polinização, na dispersão de sementes, no controle das populações de insetos (SAZIMA *et al.*, 1982; TADDEI, 1983; UIEDA & VASCONCELLOS-NETO, 1985; GARCIA *et al.*, 2000) e, por conseguinte, na formação e manutenção destes ecossistemas (WHITTAKER & JONES, 1994; SIPINSKI & REIS, 1995). Além disso, alguns grupos, especificamente os filostomídeos, têm sido descritos como potenciais espécies bioindicadoras, respondendo positiva ou negativamente às mudanças de áreas perturbadas (FENTON *et al.*, 1992; MEDELLÍN *et al.*, 2000).

Entre os mamíferos, os quirópteros se destacam por serem os dispersores mais importantes (GORCHOV *et al.*, 1993; FLEMING & SOSA, 1994), podendo carregar sementes por longas distâncias (MORRISON, 1978; FLEMING, 1993). Esses animais podem dispersar sementes de pelo menos 96 gêneros e 49 famílias de plantas na região Neotropical (GARDNER, 1977). Diferentes estudos confirmam a importância de morcegos frugívoros na recuperação de ecossistemas florestais (CHARLES-DOMINIQUE, 1986; WHITTAKER & JONES, 1994; MEDELLÍN & GAONA, 1999), por incluírem em sua dieta, frutos de espécies de plantas pioneiras. Essa diversidade alimentar em Chiroptera torna esses mamíferos importantes prestadores de serviços ecossistêmicos (KUNZ *et al.*, 2011).

## 2.3 Espécies analisadas

*Dryadonycteris capixaba* Nogueira, Lima, Peracchi & Simmons, 2012: Espécie descrita em 2012 (Figura 1), encontrada na reserva natural Vale, pertence à subfamília Glossophaginae na qual as espécies evoluíram para uma dieta essencialmente baseada em néctar, e tem seus aspectos morfológicos mais marcantes associados a essa especialização. As espécies da subfamília Glossophaginae são consideradas essenciais nos ecossistemas em que atuam, participando na polinização de centenas de espécies de plantas, algumas das quais, provavelmente, com total dependência deles para sua reprodução (REIS *et al.*, 2007).



Figura 1. Exemplar de *Dryadonycteris capixaba*. Fonte: Nogueira *et al.* 2012.

*Pygoderma bilabiatum* (Wagner, 1843): É uma espécie frugívora, pertence à subfamília Stenodermatinae sendo seus representantes considerados ótimos dispersores de sementes de várias espécies de plantas da região Neotropical, como *Maclura tinctoria*,

*Ficus enormis* e *Solanum granuloso-leprosum* (FARIA, 1997), É uma espécie exclusivamente neotropical com ocorrência no Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina (SIMMONS, 2005). No Brasil, ocorre em todos os estados das regiões sul e sudeste e presente ainda nos estados de Pernambuco, Alagoas, Paraíba e Bahia (REIS *et al.* 2007) (Figura 2).



**Figura 2.** Exemplar de *Pygoderma bilabiatum* (Foto: Isaac P. Lima).

*Chiroderma villosum* Peters, 1860: Espécie da subfamília Stenodermatinae, distribuída desde sul do México ao sul do Brasil no Paraná, com ocorrência também na Venezuela, Colômbia, Suriname, Bolívia, Peru, Guiana Francesa, Trinidad e Tobago (REIS *et al.*, 2007). São animais de hábito alimentar frugívoro, e assim como *Chiroderma doriae* Thomas, 1891, apresenta uma estratégia diferenciada de predação de sementes de *Ficus* (NOGUEIRA & PERACCHI, 2003) (Figura 3).



**Figura 3.** Exemplar de *Chiroderma villosum* (Foto: Isaac P. Lima).

*Phyllostomus discolor* (Wagner, 1843): Espécie da subfamily Phyllostominae, distribuída do México às Guianas, Brasil, Bolívia, Paraguai, norte da Argentina e Peru, Trinidad e ilha Margarida (Venezuela) (SIMMONS, 2005). Assim como as demais espécies do gênero, *P. discolor* tem sido classificada como espécie onívora. Ao longo de sua distribuição, entretanto, pode haver predominância de determinados itens em sua

dieta, e consequente inclusão em diferentes conjuntos funcionais tróficos (REIS *et al.*, 2007) (Figura 4).



**Figura 4.** Exemplar de *Phyllostomus discolor* (Foto: Isaac P. Lima).

#### **2.4 Peptídeos reguladores produzidos pelas células endócrinas a serem investigadas**

**Serotonina:** A 5-hidroxitriptamina ou 5-HT, é um neurotransmissor sintetizado por neurônios serotoninérgicos do sistema nervoso central e pelas células enterocromafins do tubo gastrointestinal, que constituem uma ampla população neste tubo e produzem mais de 90% da serotonina sintetizada no corpo (AHLMAN & NILSSON, 2001). Este hormônio tem uma ação moduladora geral da conduta afetiva associada a ações sobre a cognição e comportamentos homeostáticos. A serotonina é conhecida por estimular a contração da musculatura lisa do aparelho gastroentérico e provocar a secreção exócrina (CECCARELLI *et al.*, 1995), além de estimular os neurônios mioentéricos promovendo respostas vasodilatadoras na submucosa (VANNER, 2000). Esta também age aumentando a motilidade intestinal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

**Colecistocinina (CCK):** Assim como a gastrina, pertence à família CCK/G. Ambas atuam inibindo o esvaziamento gástrico, por meio da ligação em seus receptores ou por reflexos nervosos (MO & WANG, 1994). A CCK é um hormônio produzido por células enteroendócrinas (células I) do intestino delgado, presentes especialmente no duodeno e no jejuno, atuando, principalmente, por mecanismo telócrino (POLAK *et al.*, 1993). Esse hormônio atua estimulando a contração da vesícula biliar e a secreção pancreática, incitada por nutrientes no intestino delgado, particularmente por ácidos graxos da dieta. A colecistocinina também age inibindo a ingestão de alimentos, operando por mecanismo neurócrino no centro da fome e da saciedade no Sistema Nervoso Central (SNC) (RODRIGUES *et al.*, 2005).

**Somatostatina:** É um mensageiro químico secretado pelas células D, presentes no estômago (região do antro pilórico), intestino e pâncreas (RODRIGUES *et al.*, 2005). Recebeu esta denominação por sua capacidade de inibir a liberação do hormônio de crescimento (somatotrofina). Elevadas concentrações de somatostatina foram detectadas no pâncreas, estômago e duodeno (ARIMURA *et al.*, 1975) esta tem função inibidora em muitos órgãos como tireoide, pâncreas, estômago e vesícula biliar, inibindo também

a liberação de hormônios pelas células enteroendócrinas em sua vizinhança. A somatostatina atua nas células produtoras de gastrina e nas células semelhantes às enterocromafins inibindo a liberação de suas secreções (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

**Glucagon:** É um hormônio polipeptídico produzido nas células alfa das ilhotas pancreáticas e também em células espalhadas pelo TGI. A maior parte destas células está classicamente localizada no intestino distal, predominantemente do íleo ao cólon (SANTOS, 2007). Esse hormônio é secretado quando o nível de glicemia cai, exercendo diversas funções que são diretamente opostas às da insulina. A mais importante consiste em aumentar a concentração de glicose no sangue (GUYTON & HALL, 2002). Outra função importante consiste em agir em vários tecidos para tornar a energia estocada sob forma de glicogênio e gordura disponível pela glicogenólise e lipólise (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Além da baixa concentração de glicose sanguínea, a regulação desse hormônio pode ser feita também pelo sistema nervoso autônomo como por vários hormônios gastrointestinais (SMITH *et al.*, 1988).

**Insulina:** Exerce um papel central na regulação da homeostase da glicose e atua de maneira coordenada em eventos celulares que regulam os efeitos metabólicos e de crescimento (HABER *et al.*, 2001). Esse hormônio é secretado pelas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. A insulina regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também age estimulando a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduzindo a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação proteica (CARVALHEIRA *et al.*, 2002).

## 2.5 Tipos de Comunicações Celulares

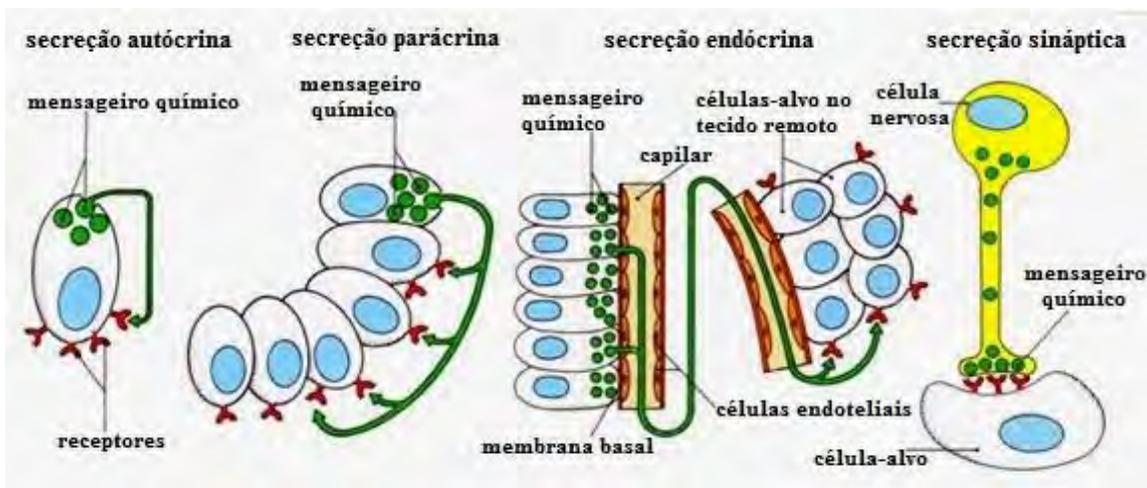
As ações dos sistemas nervoso e endócrino, assim como as interações entre eles, são realizadas por meio dos mecanismos telécrino, parácrino, autócrino e/ou neurócrino (GANONG, 1998; REHFELD, 1998) (Figura 5). Para que esses mecanismos ocorram, faz-se necessário a presença de moléculas sinalizadoras. Na maioria dos casos, as células de sinalização secretam moléculas de sinal no fluido extracelular. As moléculas segregadas podem ser levadas muito longe para atuar em células alvo distantes, ou podem atuar como mediadores locais (ALBERTS *et al.*, 2004). Além disso, cada célula tem um conjunto diferente de proteínas receptoras, o qual torna possível à célula responder às moléculas sinalizadoras de uma maneira específica e pré-programada (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

No mecanismo endócrino, os mensageiros químicos (hormônios) são liberados na corrente sanguínea, agindo sobre células em locais distantes de onde foram produzidos, a exemplo da secretina que, sendo liberada pelas células S presentes no duodeno e jejuno, atua sobre as células principais e parietais do estômago e sobre o pâncreas exócrino (RODRIGUES *et al.*, 2005).

Outro mecanismo é o parácrino, neste os mensageiros químicos são liberados nas proximidades do local onde foram produzidos, agindo sobre células vizinhas, a exemplo da serotonina, liberada pelas células enterocromafins presentes em todo TGI, com ações locais sobre a musculatura lisa (RODRIGUES *et al.*, 2005). Normalmente, as

células de sinalização e alvo na sinalização parácrina são de tipos celulares diferentes. Para que os sinais parácrinos atuem apenas localmente, as moléculas segregadas não devem ser difundidas demais; por esta razão, eles são frequentemente ocupados rapidamente por células alvo vizinhas, destruídas por enzimas extracelulares ou imobilizadas pela matriz extracelular (ALBERTS *et al.*, 2004). Entretanto as células também podem produzir sinais que eles próprios respondem: isto é referido como sinalização autócrina. Nesse mecanismo as células controlam a síntese e liberação dos seus mensageiros que, quando liberados, atuam sobre os próprios tipos celulares que os secretaram (RODRIGUES *et al.*, 2005).

Além destes mecanismos, existe também a sinalização sináptica (mecanismo neurócrino), exclusiva do tecido nervoso em que moléculas neurotransmissoras agem nos contatos celulares especializados denominados sinapses, a exemplo do peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).



**Figura 5.** Mecanismos de sinalização celular. Fonte: anatovet103.blogspot.com.br.

# **CAPÍTULO I**

## **ASPECTOS HISTOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO DO INTESTINO DE QUATRO ESPÉCIES DE MORCEGOS DA FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE (MAMMALIA, CHIROPTERA)**

## RESUMO

CARDOSO, Nathália das Neves. **Aspectos histológico, histoquímico e imuno-histoquímico do intestino de quatro espécies da família Phyllostomidae (Mammalia, Chiroptera)**. 2017. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

O presente estudo visou descrever as características histológicas e histoquímicas do intestino de quatro espécies da família Phyllostomidae (*Dryadonycteris capixaba*, *Pygoderma bilabiatum*, *Chiroderma villosum* e *Phyllostomus discolor*), bem como analisar a presença de células endócrinas, buscando comparar interespecificamente a distribuição regional e frequência das células secretoras de serotonina (5HT), colecistocinina (CCK) e somatostatina (SOM), no intestino das espécies estudadas. Os animais analisados foram cedidos da coleção zoológica do Laboratório de Mastozoologia do Departamento de Biologia Animal (DBA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Os órgãos foram fixados (formalina 10%) e acondicionados em álcool a 70%. Posteriormente foi encaminhado ao Laboratório de Histologia e Embriologia da UFRRJ, no qual foram submetidos aos processamentos histológicos de rotina e aos testes imuno-histoquímicos. Para a análise histológica, foi utilizada a técnica de coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Gomori (TG) e as técnicas histoquímicas do Ácido Periódico + Reativo de Schiff (PAS) e Alcian Blue pH 2.5 (AB). Histologicamente o intestino das quatro espécies apresentaram características similares. Morfometricamente as espécies frugívoras apresentaram vilosidades maiores na região do jejuno, quando comparadas com as espécies nectarívora e onívora. Dois tipos de células imunorreativas (IR) foram identificadas na mucosa intestinal das espécies estudadas, células produtoras de 5HT e CCK. As células IR à 5HT foi encontrada ao longo de todo o intestino, sendo o tipo celular predominante. Dentre as espécies estudadas, apenas *Dryadonycteris capixaba* não apresentou células IR à CCK no intestino. Entre os anticorpos analisados somente as células IR à SOM não foram identificadas no intestino das espécies estudadas. Através deste estudo, notou-se que houve diferença na distribuição e na frequência relativa das células endócrinas no intestino dos animais estudados.

**Palavras-Chave:** Histologia, intestino, células endócrinas, morcegos.

## ABSTRACT

CARDOSO, Nathália das Neves. **Histological, histochemical and immunohistochemical aspects of the intestine of four species of the family Phyllostomidae (Mammalia, Chiroptera)**. 2017. Thesis (Doctor in Animal Biology). Institute of Biological Sciences and Health. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

The present study aimed to describe the histological and histochemical characteristics of the intestine of four species of the family Phyllostomidae (*Dryadonycteris capixaba*, *Pygoderma bilabiatum*, *Chiroderma villosum* and *Phyllostomus discolor*), as well as to analyze the presence of endocrine cells, searching compare interspecific regional distribution and frequency of endocrine cells, and secretory cells of serotonin (5HT), cholecystinin (CCK) and somastostatin (SOM) in the intestine of the species studied. The animals were analyzed transferred from the zoological collection of the Microbiology Laboratory of the Department of Animal Biology (DBA) of the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). The organs were fixed (10% formalin) and conditioned in 70% alcohol. Subsequently, it was forwarded to the Laboratory of Histology and Embryology of UFRRJ, in which they were submitted to routine histological processing and immunohistochemical tests. For the histological analysis, the technique of staining by Hematoxylin and Eosin (HE) and Tricrômico de Gomori (TG) and histochemical techniques of Periodic + Reactive of Schiff (PAS) and Alcian Blue pH 2.5 (AB) were used. Histologically the intestine of the four species presented similar characteristics. Morphometrically the frugivorous species had larger villi in the jejunum region when compared to the nectarivorous and omnivorous species. Two types of immunoreactive cells (IR) were identified in the intestinal mucosa of the studied species, 5HT and CCK producing cells. IR cells at 5HT were found throughout the intestine, the predominant cell type being. Among the species studied, *Dryadonycteris capixaba* only showed no IR cells to CCK in the intestine. Among the analyzed antibodies only the IR cells to SOM were not identified in the intestine of the species studied. Through this study, there were differences in the distribution and relative frequency of the endocrine cells in the intestine of the animals studied.

Keywords: Histology, intestine, endocrine cells, bats.

# 1 INTRODUÇÃO

De maneira geral, a morfologia e histologia dos órgãos do aparelho digestório, tendem a serem semelhantes entre os mamíferos. Porém, sabe-se que, o trato gastrointestinal (TGI) dos vertebrados é bem variado, decorrente da diversidade de exigências funcionais causadas por mudanças e diferenças nos hábitos alimentares e nas condições ambientais. Além disso, variações podem ocorrer dependendo de filogenia (PÉREZ-BARBERÍA *et al.*, 2001; LANGER, 2003) e da energia necessária para a locomoção (LAVIN *et al.*, 2008).

Dentre os mamíferos, a matriz de hábitos alimentares dos morcegos é quase incomparável com outras ordens (GILLETE, 1975). Tendo a superfamília Phyllostomidae abrangendo o espectro completo de dietas entre os Quirópteros (GARDNER, 1977). Tornando-se assim, um grande modelo de estudo em diversas áreas relacionadas à sua biologia, dentre elas a pesquisa anátomo-histológica do aparelho digestório.

Segundo Rehfeld (1998) o aparelho gastrointestinal é o maior órgão endócrino do corpo, tanto em termos de número de células endócrinas como em número de tipos hormonais, superando qualquer outro órgão. Além disso, o TGI é responsável por secretar vários peptídeos que influenciam o balanço energético, a regulação da ingestão de alimentos, o gasto de energia e metabolismo, além de atuar nos efeitos locais controlando o esgotamento gástrico, a motilidade intestinal e utilização de nutrientes (BUDDINGTON & KROGDAHL, 2004).

Cabe ressaltar que no intestino dos vertebrados quase todas as atividades envolvidas no controle fisiológico durante o jejum ou alimentação são mediadas pelo sistema neuroendócrino difuso. As células epiteliais intestinais que pertencem ao sistema endócrino difuso interagem com componentes do sistema nervoso entérico na regulação das funções digestivas, tais como a secreção de enzimas, absorção de nutrientes e a progressão do alimento através do canal alimentar (ÇINAR *et al.*, 2006).

Portanto, estudos histológicos e imuno-histoquímico contribuem na caracterização dos órgãos do sistema digestório. De modo que possam auxiliar na melhor compreensão da fisiologia, bem como nas principais variações dependente da filogenia, dieta, e fatores exigentes de energia (STROBEL *et al.*, 2015).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Descrição histológica, histoquímica e imuno-histoquímica do intestino de *D. capixaba*, *P. bilabiatum*, *C. villosum* e *P. discolor* buscando relacionar interespecificamente as características encontradas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o padrão histológico dos órgãos estudados;
- Avaliar através da histoquímica a mucosa do intestino para detecção de glicosaminoglicanas (neutras e ácidas) e relacioná-las com as funções exercidas;

- Caracterizar a presença e distribuição relativa das células endócrinas secretoras de serotonina (5HT), colecistocinina (CCK) e somatostatina (SOM), no intestino das espécies estudadas;
- Relacionar o padrão de vilosidade de acordo com o hábito alimentar.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais estudados

Os animais foram coletados na Reserva Natural Vale e posteriormente foi retirado o intestino e o mesmo foi fixado em formalina 10% e acondicionado em álcool a 70%. Todos os exemplares sacrificados foram incorporados à coleção Adriano L. Peracchi (ALP), depositada no Laboratório de Mastozoologia do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). No presente trabalho foram analisados 12 exemplares adultos de quirópteros (Tabela 1). Os espécimes foram coletados através da licença 15809-1, fornecida pelo ICMBio / SISBIO.

**Tabela 1.** Dados sobre os animais estudados

Espécies	Hábito Alimentar	Número de Indivíduos	Números de Tombo
<i>Dryadonycteris capixaba</i>	Nectarívoro	3	ALP9667/ALP10115/ALP10329
<i>Pygoderma bilabiatum</i>	Frugívoro	2	ALP10044/ALP10116
<i>Chiroderma villosum</i>	Frugívoro	4	ALP10131/ALP10132/ALP10133/ALP10330
<i>Phyllostomus discolor</i>	Onívoro	3	ALP10751/ALP10754/ALP10880

#### 3.2 A Reserva Natural Vale: o local de captura dos exemplares estudados

A Reserva Natural da Vale do Rio Doce (Figura 6) é uma das maiores áreas protegidas de Mata Atlântica brasileira. Está localizada ao norte do estado do Espírito Santo, entre os municípios de Linhares e Jaguaré, com 22 mil hectares, altitude variando entre 28-65m, clima quente e úmido, com estação chuvosa no verão e seca no inverno e vegetação composta por florestas de tabuleiro, em seu estado original. Situa-se entre os paralelos 19°06'-19°18'S e os meridianos 39°45'-40°19' W, e junto com a Reserva Biológica de Soretama representa 60% dos remanescentes contíguos deste ecossistema no estado, que conta, com 30,3% das suas florestas naturais (Fundação SOS Mata Atlântica, 2002).

A Reserva é um centro de referência nacional na fabricação de mudas de espécies da Mata Atlântica, que ajudam na recuperação de áreas degradadas e restauração de ecossistemas florestais nas mais diferentes regiões do país. A Reserva Natural Vale é um dos 14 centros de alta diversidade e endemismo do Brasil e uma das áreas de conservação mais bem protegidas da América do Sul, tendo adquirido o título de Patrimônio Natural da Humanidade pela UNESCO em 1999. Além disso, a Reserva possui diretrizes voltadas à proteção e conservação da biodiversidade, com atividades que abrangem a proteção ecossistêmica, disseminação de germoplasma, implantação e condução do programa de pesquisa envolvendo ecossistemas tropicais,

capacitação e treinamento de mão de obra, além do desenvolvimento tecnológico para a recuperação de ecossistemas degradados (Fonte: www.vale.com).

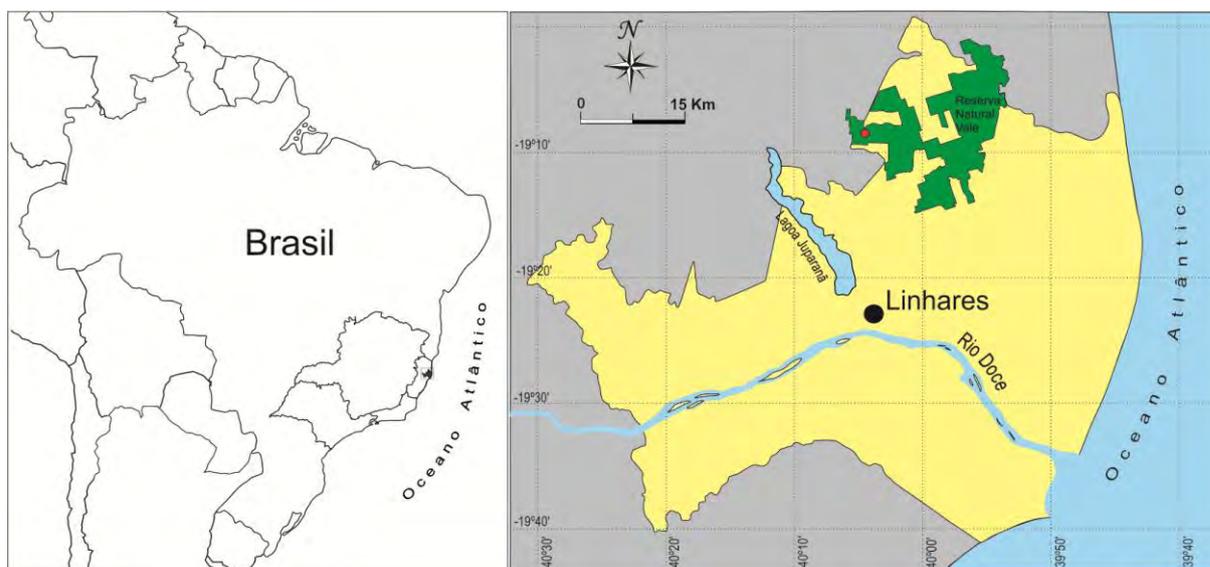


Figura 6. Mapa com a localização da Reserva Natural Vale.

### 3.3 Análises Histológicas e Histoquímicas

O material fixado foi encaminhado ao Laboratório de Histologia e Embriologia da UFRRJ. Fragmentos do intestino foram clivados em seções transversais e longitudinais e submetidos aos processamentos histológicos de rotina que incluem: desidratação (em uma série crescente de etanol - 70° GL a 100° GL), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em Histosec-parafina (Merck, Darmstadt, Germany) para obtenção de cortes com 5 µm espessura. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para o exame do órgão, e por Tricrômico de Gomori (TG) para observação de tecido colágeno. Os cortes também foram submetidos aos métodos histoquímicos do ácido periódico de Schiff (PAS) e do Alcian Blue (AB) pH 2.5, para detecção de glicosaminoglicanas (GAG's) neutras e ácidas, respectivamente.

### 3.4 Estudo imuno-histoquímico

Para o método Imuno-histoquímico foi utilizado o kit Starr Trek Universal HRP Detection System (Código: 901-STUHRP700-090314). Neste estudo os cortes histológicos foram submetidos às etapas de procedimento de rotina da técnica de imuno-histoquímica, incluindo a incubação com os anticorpos específicos para: **serotonina** (5-HT) (Código: S 5545 - Sigma-Aldrich, inc.), **colecistocinina** (CCK) (Código: C 2581 Sigma-Aldrich, inc) e **somatostatina** (SOM) (Código: A 0566 - Dakocytomation). Após o processamento imuno-histoquímico, os cortes foram contracorados pela hematoxilina de Harris, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e as lâminas foram montadas com lamínula e Entellan (Merck). Para garantir a especificidade das reações, controles positivos e negativos foram utilizados. Os controles negativos foram definidos por substituição dos anticorpos primários por soro não imune, e para os controles positivos foram utilizados cortes dos tipos de tecidos indicados no datasheet de cada anticorpo.

### 3.5 Observações e fotomicrografias

Todas as lâminas foram observadas e fotomicrografias foram feitas com câmera digital Sony Cybershot DSCW 230 acoplada ao microscópio Olympus BX41.

Na mensuração das vilosidades do intestino delgado, foram empregadas quatro lâminas para cada um dos segmentos e realizadas dez medidas aleatórias, em  $\mu\text{m}$ , da túnica mucosa, em aumento de 100X, perfazendo o total de 40 repetições por segmento para cada espécie.

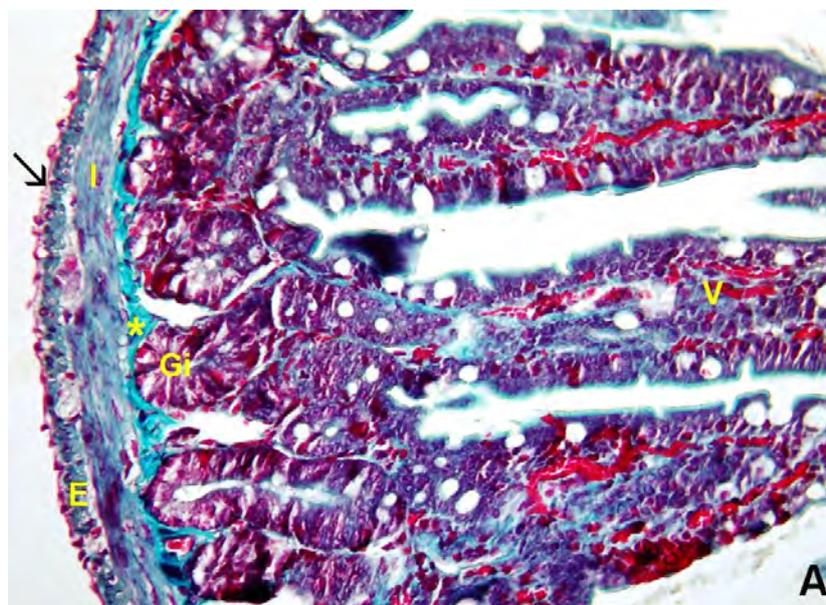
Na quantificação das células endócrinas imunorreativas localizadas na mucosa dos segmentos intestinais, foram utilizadas quatro lâminas correspondentes a cada um dos segmentos, com dez repetições por lâmina, sendo demarcada uma área correspondente à túnica mucosa, em  $\text{mm}^2$ , visualizada em aumento de 100X.

### 3.6 Análise quantitativa das células imunorreativas e mensuração das vilosidades

As fotomicrografias foram analisadas e a frequência relativa das células endócrinas imunorreativas (IR) e a mensuração das vilosidades aferidas, através de um analisador de imagem computadorizado (Image-J software) com o cálculo da média  $\pm$  SD (desvio padrão) por unidade de área ( $\text{mm}^2$ ) da mucosa.

## 4 RESULTADOS

Em todas as espécies o intestino foi dividido em dois segmentos: delgado (subdividido em: duodeno, jejuno e íleo) e grosso, sendo este último segmento de difícil diferenciação macroscópica. Histologicamente o intestino é formado por quatro distintas camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (Figura 7).



**Figura 7A.** Fotomicrografia do intestino delgado de *D. capixaba*. Destaque para as camadas histológicas: Mucosa, com vilosidades (V) e glândula intestinais (Gi), Submucosa (\*), Muscular interna (I) e externa (E) e Serosa (seta). (630X) (TG).

## 4.1 Descrições histológicas e histoquímicas do intestino das espécies estudadas

### 4.1.1 Duodeno

A túnica mucosa é revestida por epitélio cilíndrico simples com células caliciformes e planura estriada. Logo abaixo é localizada a lâmina própria constituída de tecido conjuntivo frouxo contendo glândulas intestinais simples (Figura 8B) e a presença moderada de vasos sanguíneos. A muscular da mucosa só foi visualizada na espécie *P. discolor* (Figura 9C).

A túnica submucosa é delgada na maioria das espécies, exceto em *P. discolor*, na qual se encontra um pouco mais desenvolvida (Figura 9C). Esta é constituída de tecido conjuntivo frouxo, com vasos sanguíneos e plexo submucoso, e desprovida de glândulas na maior parte do duodeno (Figuras 8B e 8F). Sendo visualizada apenas na região de transição (estômago/intestino) nas espécies *P. discolor* e *P. bilabiatum* (Figuras 8C e 8D). A túnica muscular encontra-se nitidamente dividida em duas camadas, uma circular interna; e outra mais delgada longitudinal externa, entre as túnicas observou-se a presença de plexo mioentérico (Figura 8F). Externamente foi visualizada a túnica serosa composta por uma pequena faixa de tecido conjuntivo, revestido externamente por epitélio simples pavimentoso (mesotélio).

A altura das vilosidades na região duodenal foi diferente entre as espécies estudadas (Tabela 2).

Quanto a marcação histoquímica, as células mucossecretoras apresentaram grânulos de secreção positivos ao PAS (marcando célula, planura estriada e glândula duodenal) e AB (marcando células), indicando GAG's neutras e ácidas, respectivamente (Figuras 9 e 10). Essa marcação foi diferente entre as espécies estudadas (Tabela 3). Exceto na espécie *C. villosum* a marcação para PAS não foi visualizada nessa região.

Nódulos linfóides foram encontrados no duodeno da espécie *P. discolor* (Figura 8E).

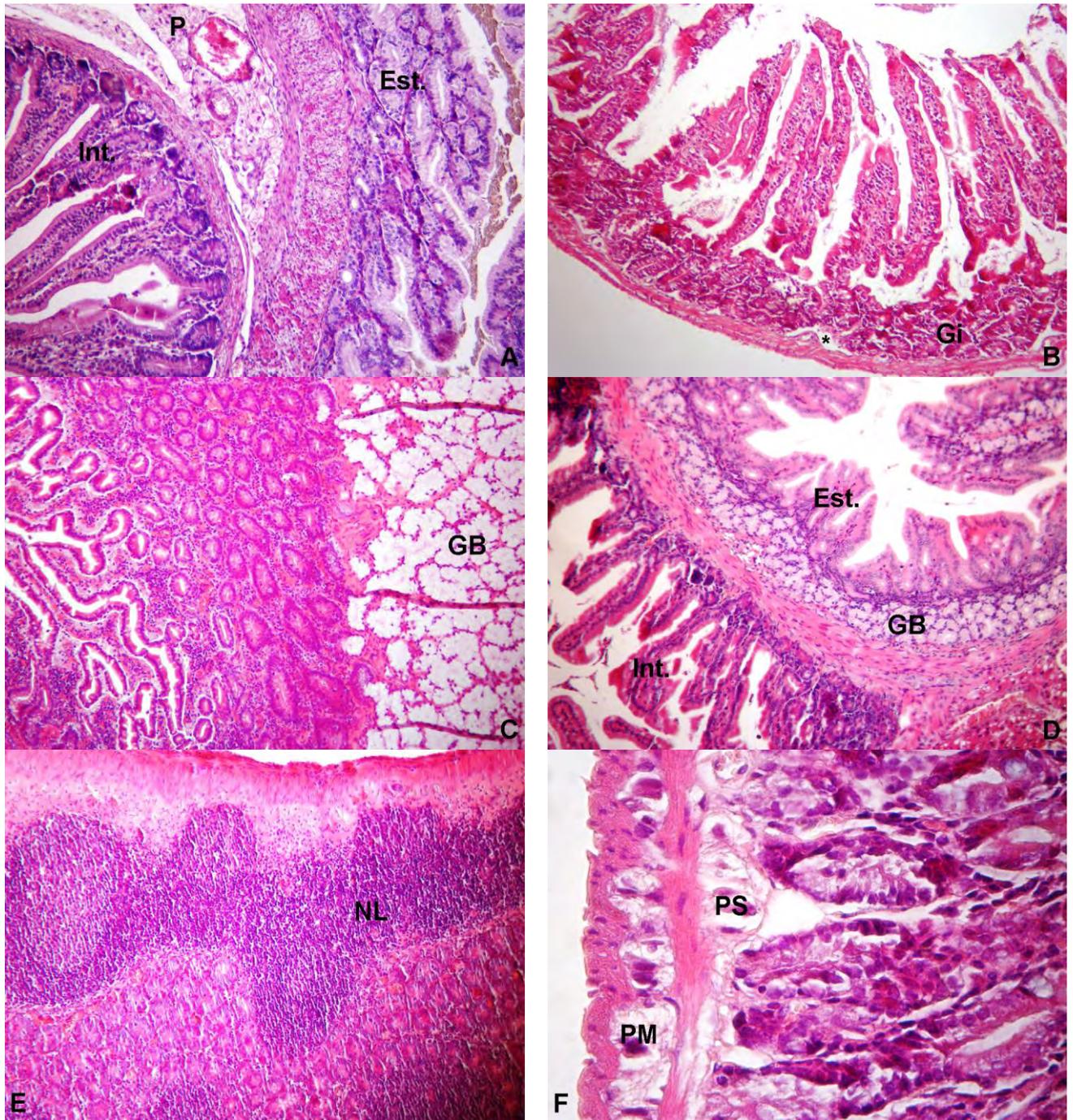
**Tabela 2.** Altura das vilosidades intestinais das espécies estudadas (média  $\pm$  SD).

Segmentos do intestino delgado	Altura das vilosidades ( $\mu\text{m}$ )			
	<i>D. capixaba</i>	<i>P. discolor</i>	<i>P. bilabiatum</i>	<i>C. villosum</i>
Duodeno	59,98 $\pm$ 5,17	51,49 $\pm$ 13,88	39,02 $\pm$ 4,32	53,13 $\pm$ 5,90
Jejuno	45,52 $\pm$ 9,73	47,85 $\pm$ 7,73	76,82 $\pm$ 12,41	88,19 $\pm$ 12,81
Íleo	45,74 $\pm$ 3,64	38,19 $\pm$ 5,68	58,74 $\pm$ 12,98	41,86 $\pm$ 5,68

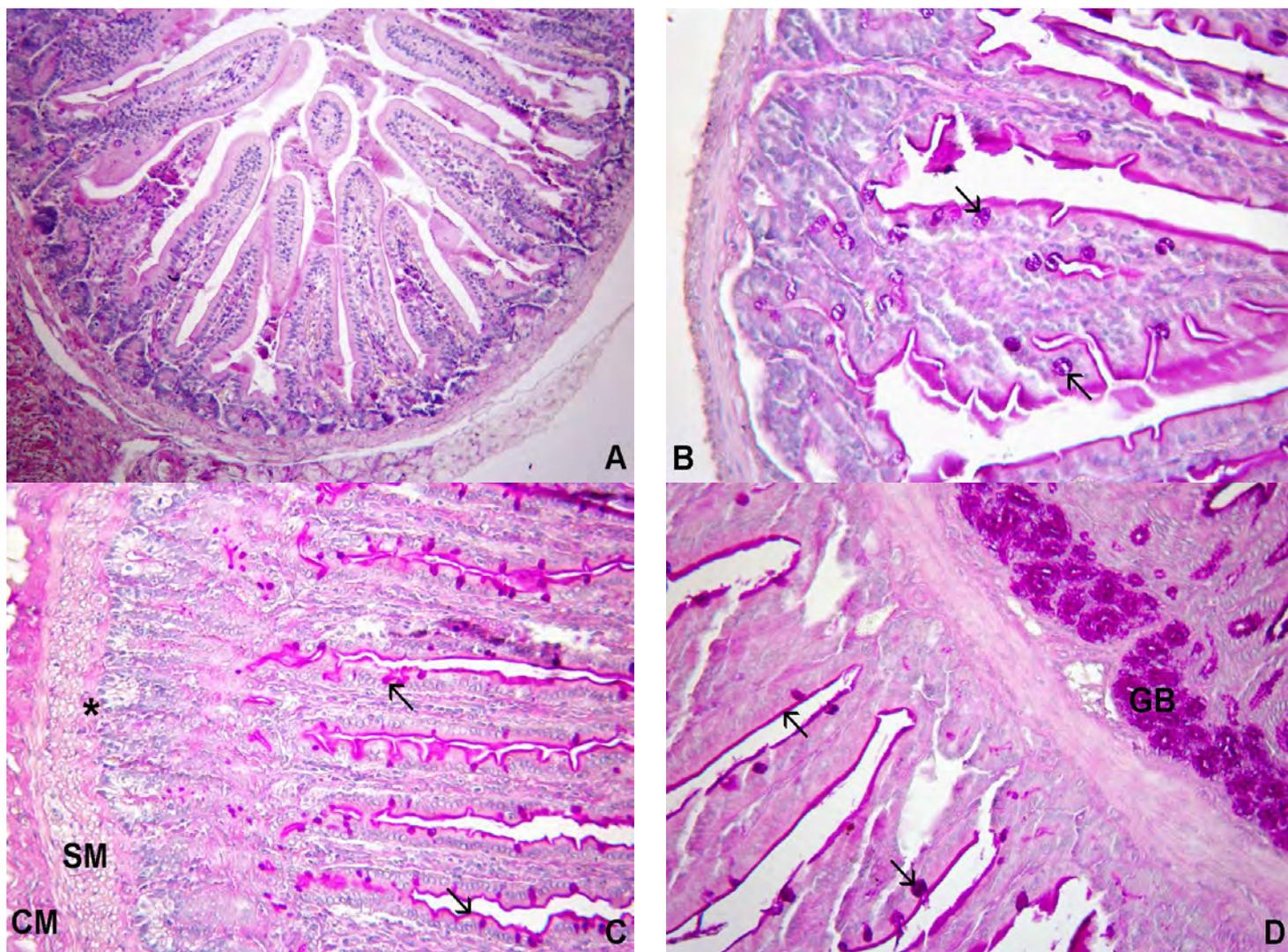
**Tabela 3.** Análise histoquímica dos intestinos das espécies estudadas.

Espécies analisadas	Segmentos dos intestinos							
	Duodeno		Jejuno		Íleo		Intestino Grosso	
	AB	pH 2,5 PAS	AB	pH 2,5 PAS	AB	pH 2,5 PAS	AB	pH 2,5 PAS
<i>D. capixaba</i>	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
<i>P. bilabiatum</i>	+	++	++	++	+++	+++	*	*
<i>C. villosum</i>	+	-	$\pm$	+	+	+	++	+
<i>P. discolor</i>	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++

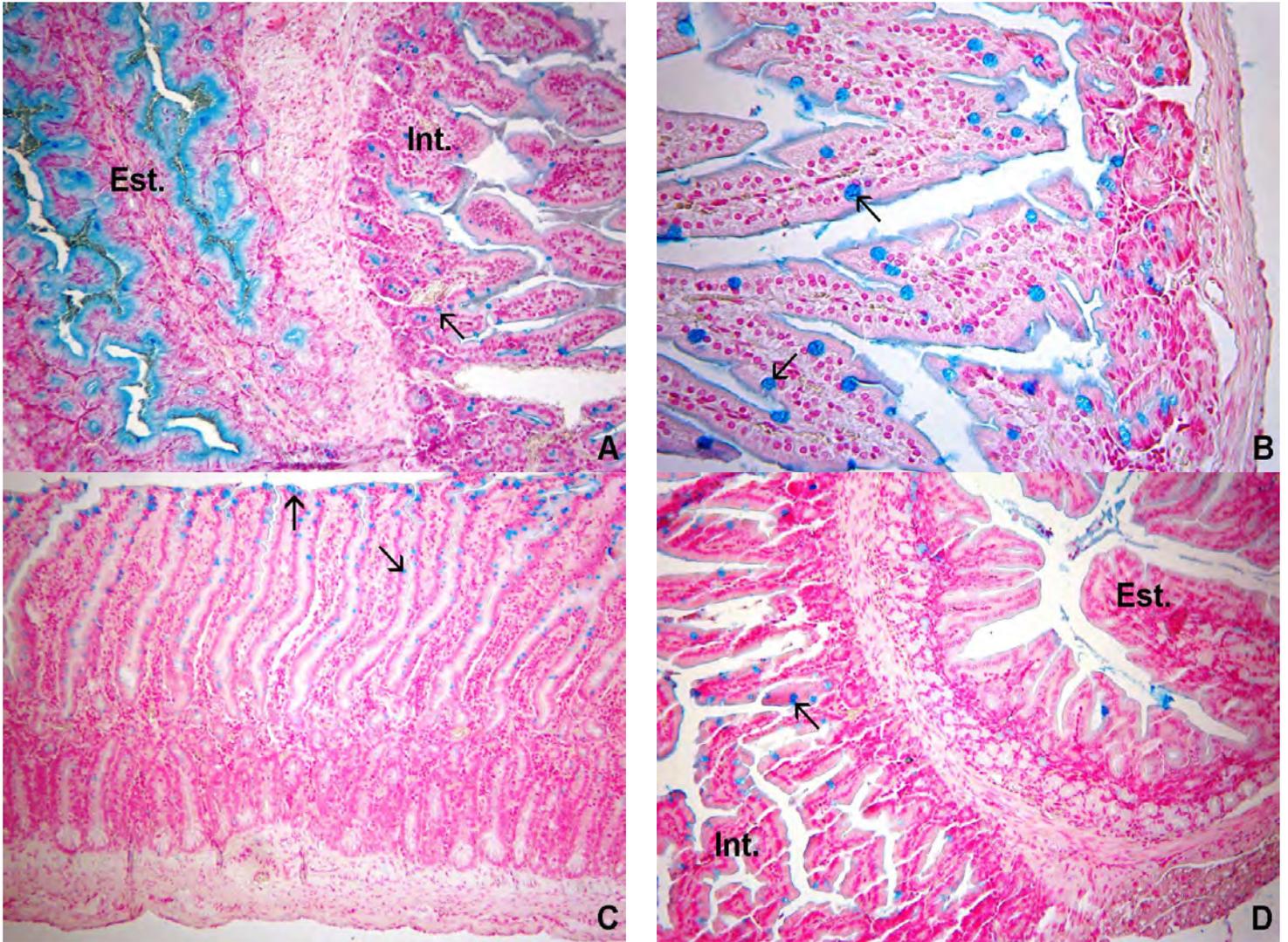
AB, Alcian blue; PAS, Ácido periódico + Reagente de Schiff. Intensidade: (-) coloração não observada, ( $\pm$ ) fracamente corados, (+) baixo, (++) médio e (+++) alto. Órgão Não Visualizado (\*).



**Figura 8 (A-F).** Fotomicrografias em HE do intestino delgado das quatro espécies estudadas: (A) Região de transição gastrointestinal da espécie *C. villosum*, evidenciando o estômago (Est.), pâncreas (P) e o intestino (Int.) (300x). (B) Visão geral do duodeno de *D. capixaba*, destaque para a presença de vaso sanguíneo na submucosa (\*) e glândulas intestinais simples (Gi) na mucosa (300x). (C) Região duodenal da espécie *P. discolor* com destaque para as glândulas de Brünner (GB) na submucosa (300x). (D) Região de transição gastrointestinal da espécie *P. bilabiatum* evidenciando o estômago (Est.) e o intestino (Int.), com destaque para a presença de glândulas de Brünner (GB) na submucosa (300x). (E) Destaque para a presença de nódulo linfoide no duodeno de *P. discolor* (300x). (F) Presença do Plexo submucoso (PS) e Plexo mioentérico (PM) (1150x).



**Figura 9 (A-D).** Fotomicrografias em PAS do duodeno das quatro espécies estudadas: (A) Visão geral do duodeno da espécie *C. villosum*, sem marcação para GAG's neutras (300x). (B) Região duodenal de *D. capixaba*, com marcação positiva para GAG's neutras nas células caliciformes (seta) e planura estriada (630x). (C) Visualização da Muscular da Mucosa (\*) e das Camadas Submucosa (SM) e Muscular, além da marcação positiva para GAG's neutras nas células caliciformes (seta) e planura estriada (seta) da espécie *P. discolor* (630x). (D) Marcação positiva para GAG's neutras nas células caliciformes (seta), planura estriada (seta) e glândulas de Brunner da espécie *P. bilabiatum* (630x).



**Figura 10 (A-D).** Fotomicrografias do duodeno das quatro espécies estudadas com marcação positiva das células caliciformes (seta) para GAG's ácidas: **(A)** Região de transição do estômago (Est.) para o intestino (Int.) da espécie *C. villosum* (300x). **(B)** Espécies *D. capixaba* (630x). **(C)** Espécie *P. discolor* (300x). **(D)** Região de transição do estômago (Est.) para o intestino (Int.) da espécie *P. bilabiatum* (300x). (AB).

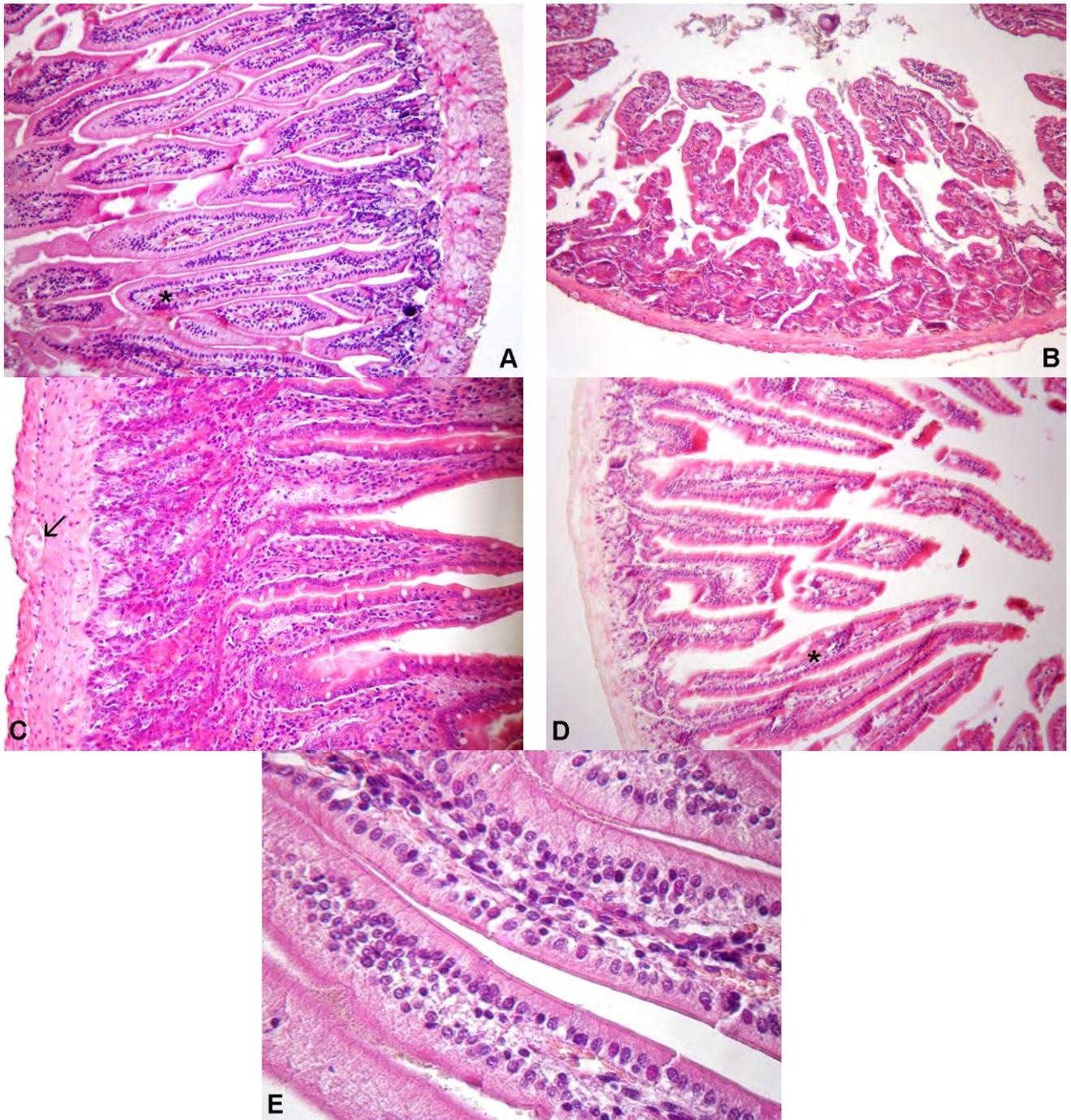
#### 4.1.2 Jejunio

O jejuno apresentou característica histológica similar à região anterior.

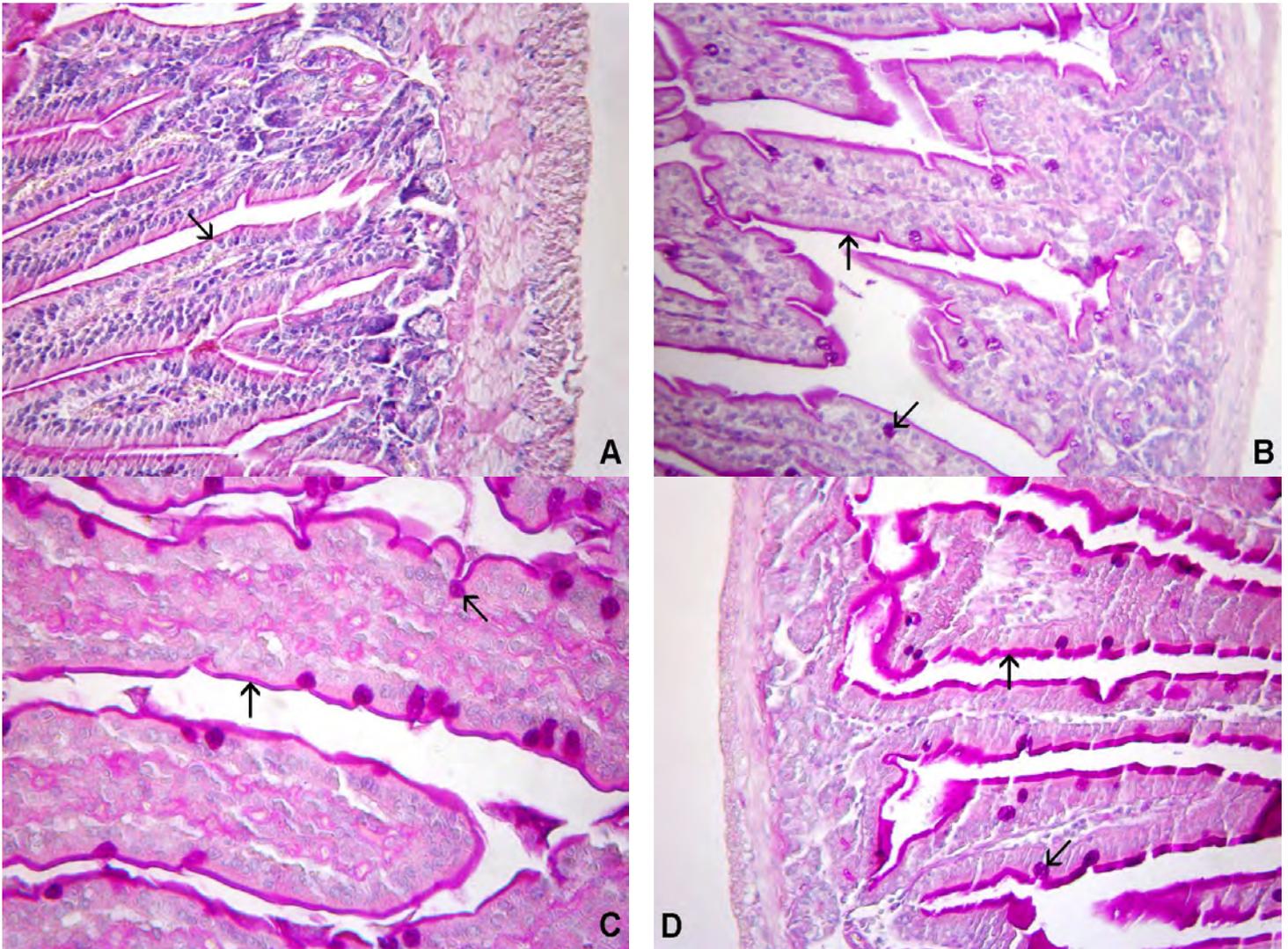
A túnica mucosa é formada por um epitélio cilíndrico simples com células caliciformes e planura estriada (Figuras 11C e 11E). Logo abaixo é localizada a lâmina própria constituída de tecido conjuntivo frouxo contendo glândulas intestinais simples. A muscular da mucosa é ausente. Nessa região as espécies frugívoras apresentaram o comprimento das vilosidades maior que as demais espécies (Tabela 2) (Figuras 11A e 11D).

A túnica submucosa é extremamente delgada, formada de tecido conjuntivo frouxo e poucos vasos sanguíneos. A túnica muscular é formada por músculo liso, com a camada interna circular e a externa longitudinal, e por plexos mionéricos (Figura 11C). A túnica serosa é composta por tecido conjuntivo frouxo, revestido externamente por epitélio simples pavimentoso.

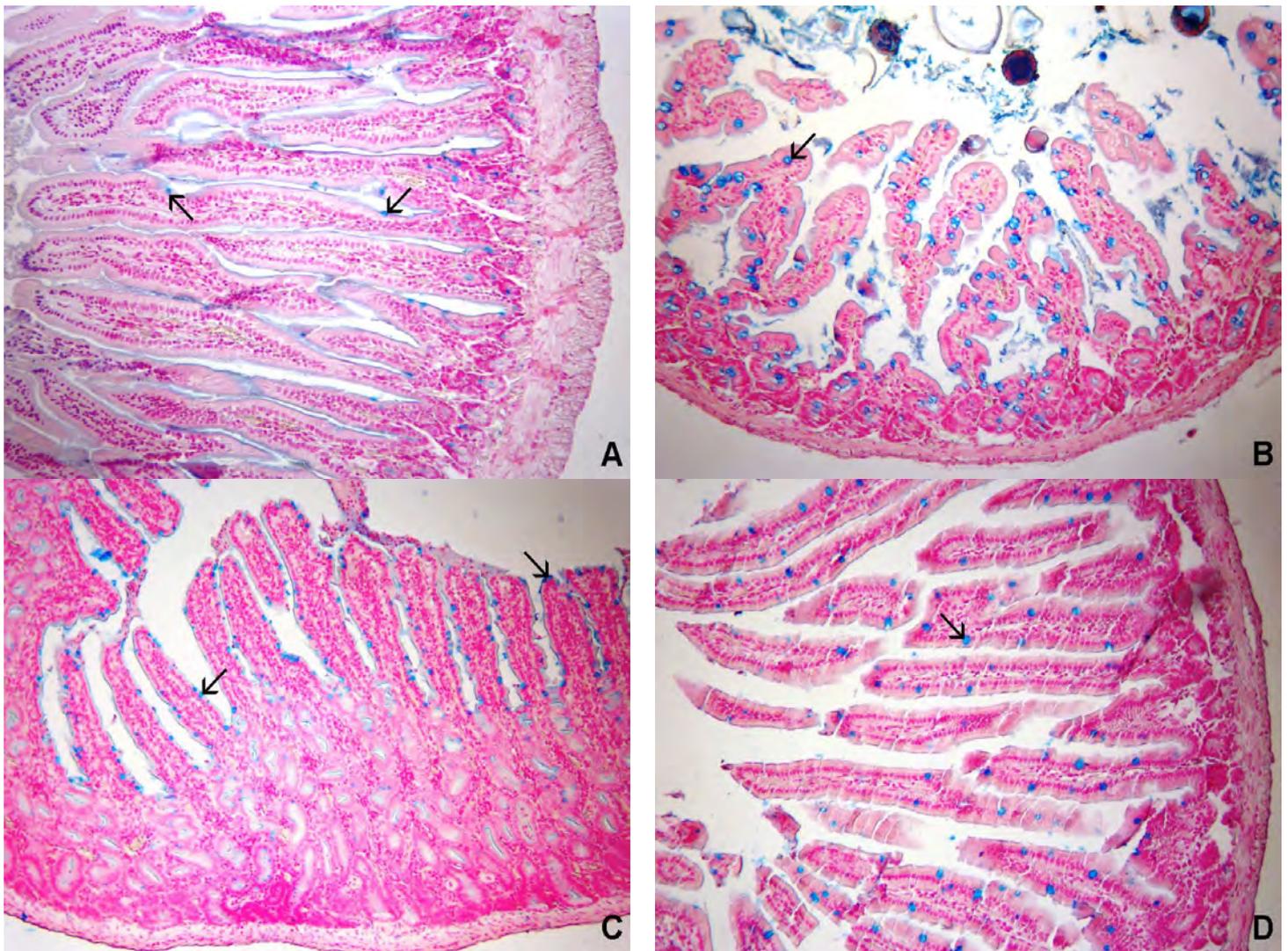
Quanto à marcação histoquímica, houve diferença interespecífica (Tabela 3). As células mucossecretoras apresentaram grânulos de secreção positiva ao PAS (marcando células e planura estriada) e AB (marcando células), indicando GAG's neutras e ácidas, respectivamente (Figuras 12 e 13).



**Figura 11 (A-E).** Fotomicrografias em HE do intestino delgado das quatro espécies estudadas: **(A)** Visão geral do jejuno de *C. villosum*, com destaque para as vilosidades (\*) (300x). **(B)** Visão geral do jejuno de *D. capixaba* (300x). **(C)** Visão geral do jejuno da espécie *P. discolor* com evidência para o plexo mioentérico (seta) (630x) **(D)** Visão geral do jejuno de *P. bilabiatum*, com destaque para as vilosidades (\*) (300x). **(E)** Destaque em maior aumento para o epitélio intestinal (Jejuno) (1150x).



**Figura 12 (A-D).** Fotomicrografias em PAS do jejuno das quatro espécies estudadas: **(A)** Visão geral do jejuno da espécie *C. villosum*, com destaque para marcação positiva (seta) das GAG's neutras (630x). **(B)** Região do jejuno de *D. capixaba*, com marcação positiva para GAG's neutras nas células caliciformes (seta) e planura estriada (seta) (630x). **(C)** Marcação positiva para GAG's neutras nas células caliciformes (seta) e planura estriada (seta) da espécie *P. discolor* (1150x). **(D)** Marcação positiva para GAG's neutras nas células caliciformes (seta) e planura estriada (seta) da espécie *P. bilabiatum* (630x).



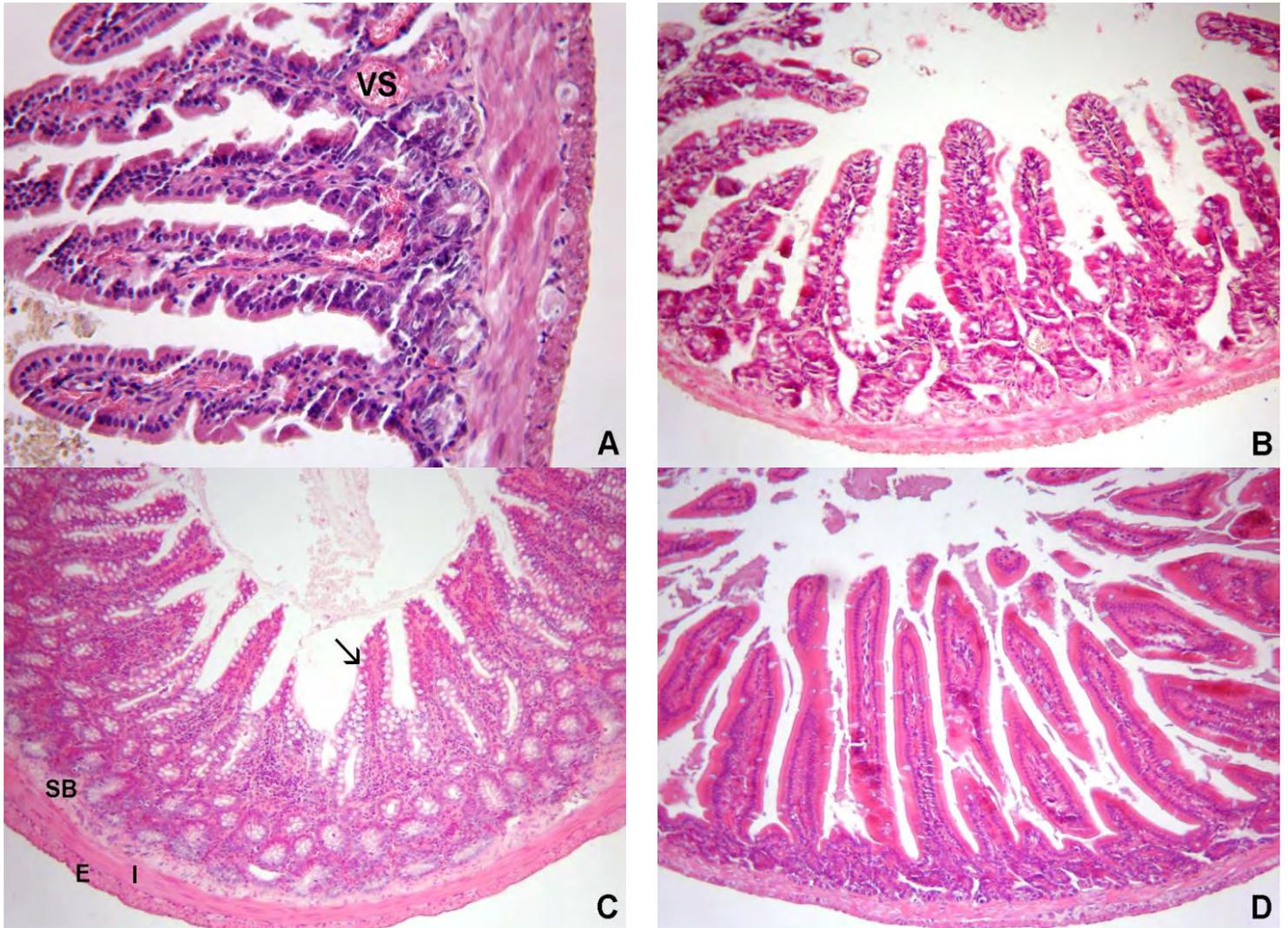
**Figura 13 (A-D).** Fotomicrografias do intestino delgado das quatro espécies estudadas com marcação positiva das células caliciformes (seta) para GAG's ácidas: **(A)** Visão geral do jejuno da espécie *C. villosum* (300x). **(B)** Visão geral do jejuno da espécie *D. capixaba* (300x). **(C)** Visão geral do jejuno de *P. discolor* (300x). **(D)** Visão geral do jejuno da espécie *P. bilabiatum* (300x). (AB).

#### 4.1.3 Íleo

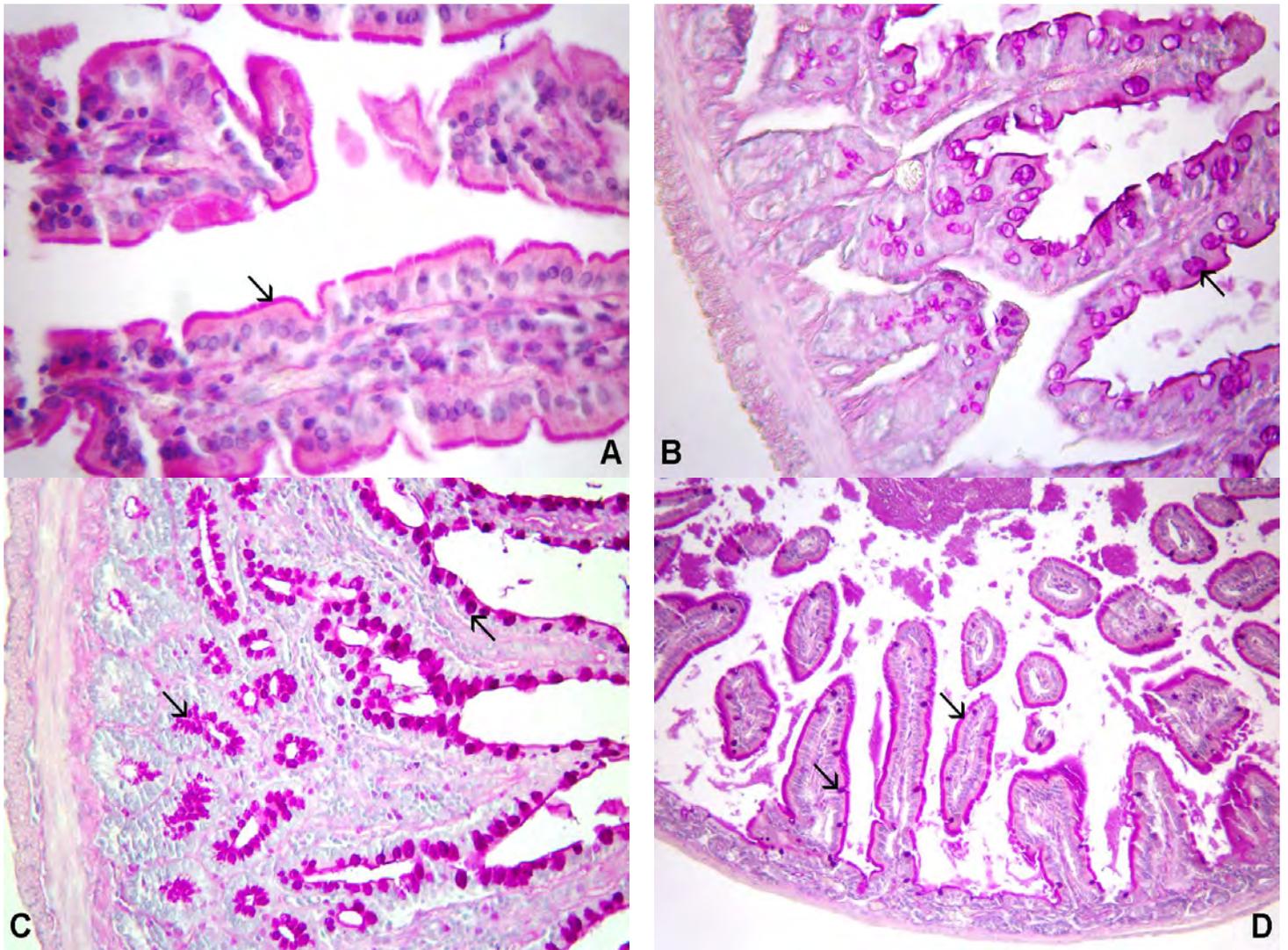
Essa região foi caracterizada por apresentar um epitélio cilíndrico simples com células caliciformes e planura estriada (Figura 15A e 15C). Pode-se observar um decréscimo no número e na altura das vilosidades (Tabela 2), e um aumento das células caliciformes, principalmente na espécie *P. discolor* (Figura 14C). Assim como nas regiões anteriores, logo abaixo é localizada a lâmina própria constituída de tecido conjuntivo frouxo contendo glândulas intestinais simples, sendo mais evidente em *P. discolor* (Figura 14C). A muscular da mucosa é ausente.

A túnica submucosa é formada de tecido conjuntivo frouxo e poucos vasos sanguíneos. Nessa camada foram observados nódulos linfóides (Figuras 16D e 16E). A túnica muscular é formada por músculo liso, com a camada interna circular e a externa longitudinal, e por plexos miontéricos. A túnica serosa é composta por tecido conjuntivo frouxo, revestido externamente por epitélio simples pavimentoso.

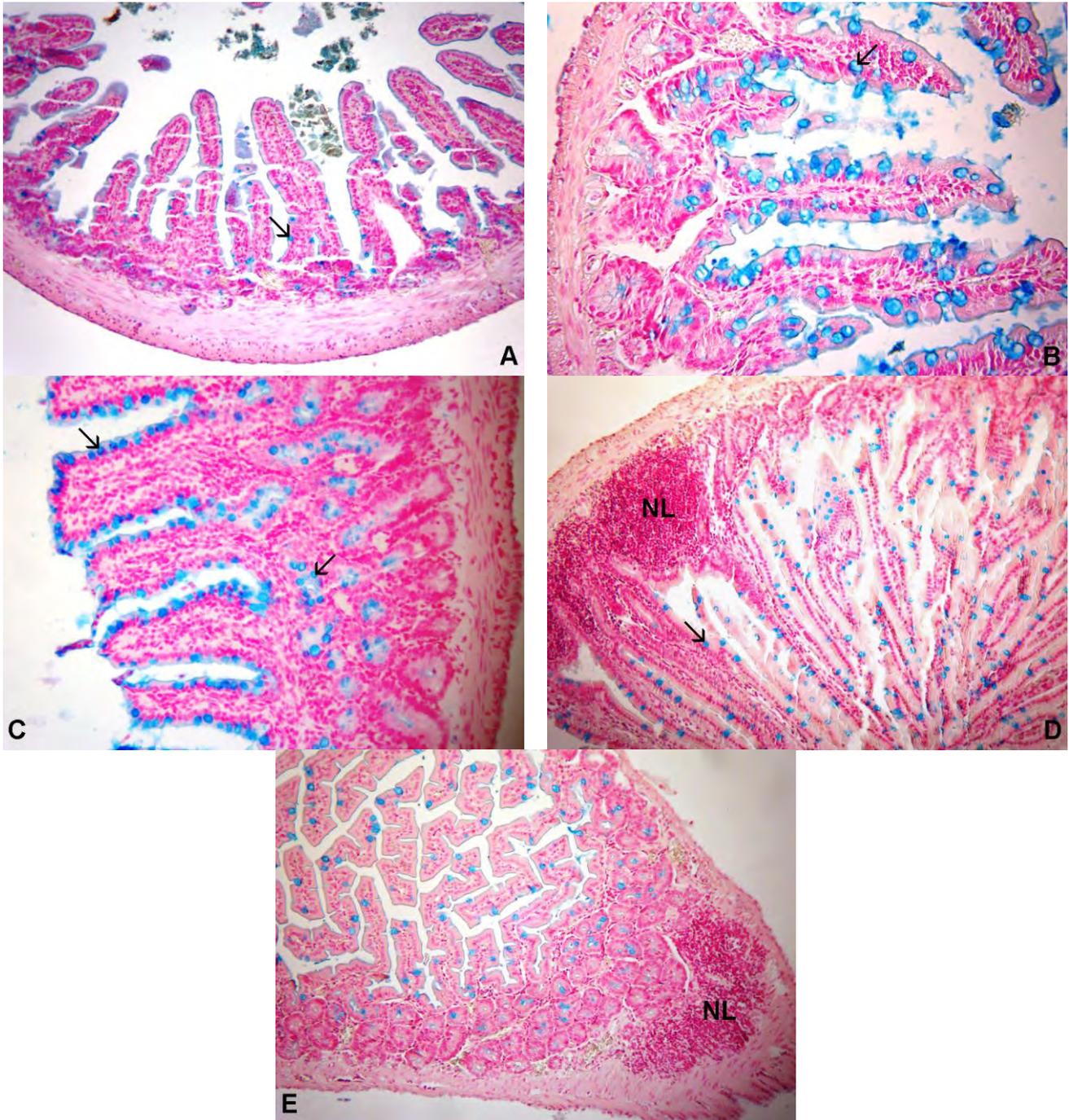
Quanta a marcação histoquímica, houve diferença interespecífica (Tabela 3). As células mucossecretoras apresentaram grânulos de secreção positiva ao PAS (marcando célula e planura estriada) e AB (marcando células), indicando GAG's neutras e ácidas, respectivamente (Figuras 15 e 16).



**Figura 14 (A-D).** Fotomicrografias em HE do intestino delgado das quatro espécies estudadas: **(A)** Visão geral do íleo da espécie *C. villosum*, com destaque para os vasos sanguíneos (VS) na camada mucosa (630x). **(B)** Visão geral do íleo de *D. capixaba* (300x). **(C)** Região do íleo da espécie *P. discolor* evidenciando a camada submucosa (SB) e a camada muscular interna (I) e externa (E), destaque para uma grande quantidade de células caliciformes (seta) (300x). **(D)** Visão geral do íleo da espécie *P. bilabiatum* (300x).



**Figura 15 (A-D).** Fotomicrografias em PAS do íleo das quatro espécies estudadas: **(A)** Visão em maior aumento das vilosidades da espécie *C. villosum*, com destaque para marcação positiva das GAG's neutras na planura estriada (seta) (1150x). **(B)** Espécie *D. capixaba*, com marcação positiva para GAG's neutras nas células caliciformes (seta) (630x). **(C)** Marcação positiva para GAG's neutras nas células caliciformes do epitélio (seta) e criptas (seta) da espécie *P. discolor* (630x). **(D)** Marcação positiva para GAG's neutras nas células caliciformes (seta) e planura estriada (seta) da espécie *P. bilabiatum* (300x).



**Figura 16 (A-E).** Fotomicrografias do íleo das quatro espécies estudadas: **(A)** Espécie *C. villosum* com marcação positiva das células caliciformes (seta) para GAG's ácidas (300x). **(B)** Espécie *D. capixaba*, com marcação positiva para GAG's ácidas nas células caliciformes (seta) (630x). **(C)** Marcação positiva para GAG's ácidas nas células caliciformes do epitélio (seta) e criptas (seta) da espécie *P. discolor* (630x). **(D)** Marcação positiva para GAG's ácidas nas células caliciformes (seta) da espécie *P. bilabiatum*, destaque para presença de nódulo linfoide (NL) (300x). **(E)** Corte longitudinal do íleo da espécie *D. capixaba* evidenciando nódulo linfoide (NL) (300x). (AB).

#### 4.1.4 Intestino grosso

Nesta região foi observado o surgimento de pregas intestinas e perda de vilosidades nas espécies *C. villosum*, *P. discolor* e *D. capixaba* (Figuras 17A 17B e 17C). Em *P. bilabiatum*, não foi possível visualizar a região do intestino grosso.

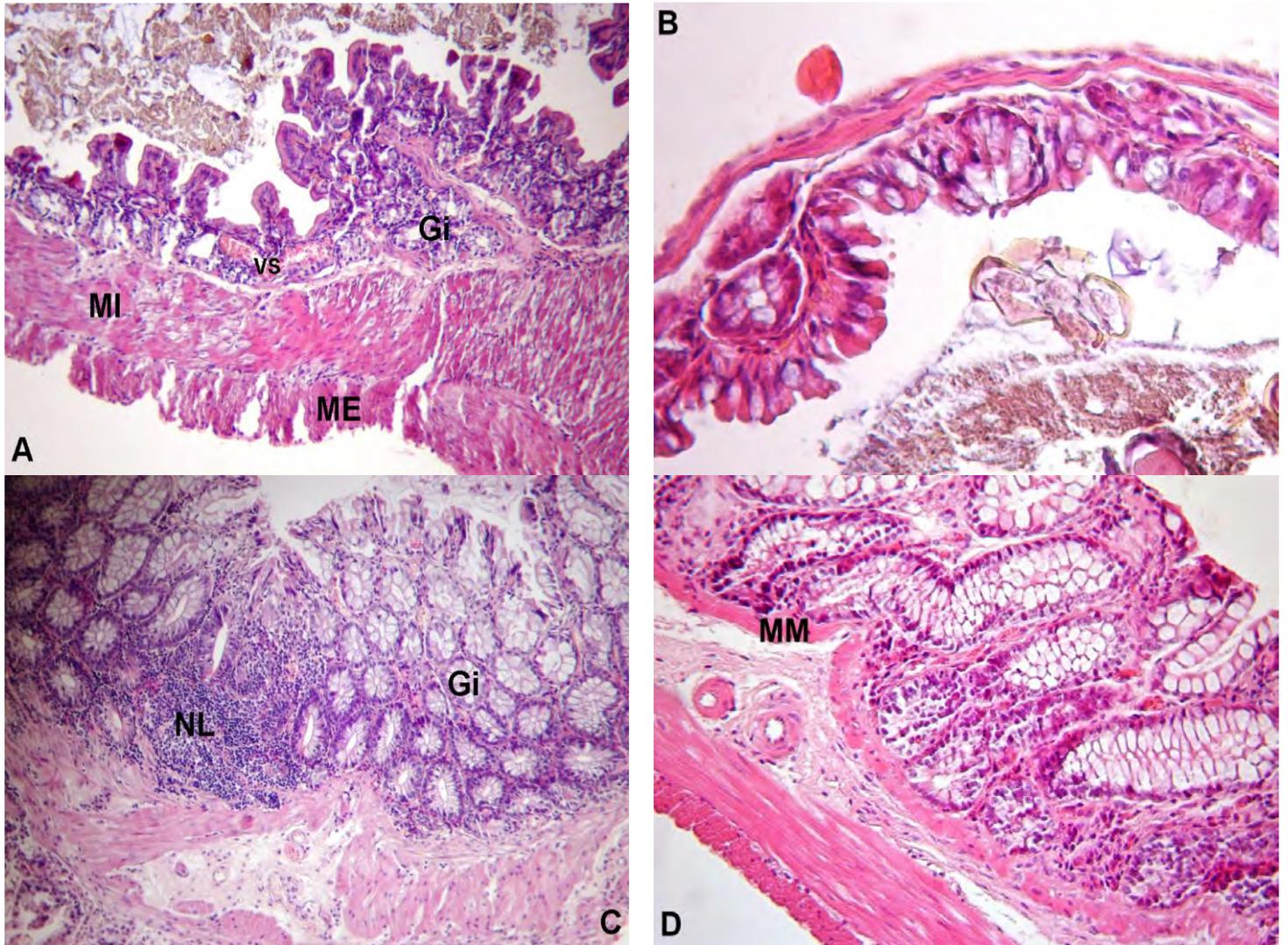
A túnica mucosa é revestida por epitélio cilíndrico simples com células caliciformes. A lâmina própria é constituída de tecido conjuntivo frouxo contendo glândulas intestinais simples tubulares (criptas de Lieberkühn) variando em quantidade e tamanho de acordo com a espécie estudada (Figuras 17B e 17C). Nota-se ainda, a presença moderada de vasos sanguíneos. A muscular da mucosa foi evidenciada apenas nas espécies *C. villosum* e *P. discolor* sendo constituída por uma camada de músculo liso (Figuras 17A e 17D).

A túnica submucosa apresenta-se constituída de tecido conjuntivo frouxo, com poucos vasos sanguíneos e desprovida de glândulas (Figura 17D).

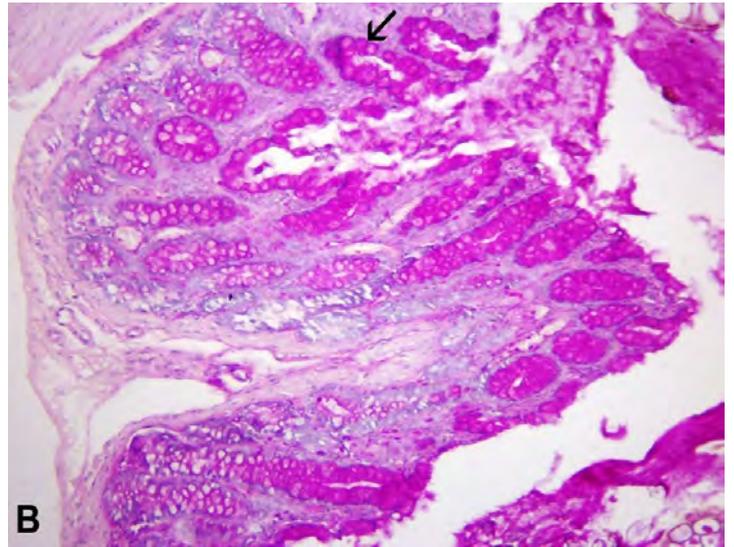
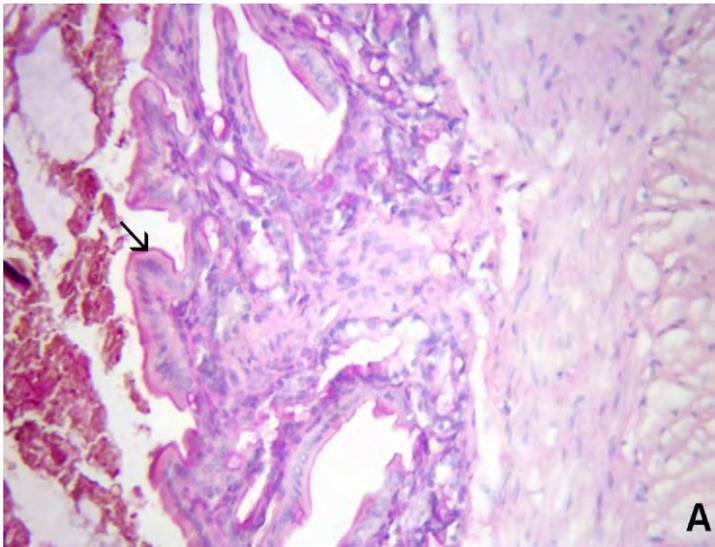
A túnica muscular é nitidamente mais espessa nas espécies *C. villosum* e *P. discolor*, quando comparada a região do intestino anterior. Essa se encontra dividida em duas camadas, uma mais grossa, a camada muscular circular interna; e outra mais delgada, a camada muscular longitudinal externa (Figura 17A). Interpondo-se entre elas é visualizado o plexo mioentérico. A túnica serosa que envolve a túnica muscular é composta por uma pequena faixa de tecido conjuntivo, revestido externamente por epitélio simples pavimentoso (mesotélio).

Quanta a marcação histoquímica, as células mucossecretoras apresentaram grânulos de secreção positiva ao PAS e ao AB, indicando GAG's neutras e ácidas, respectivamente (Figuras 18 e 19).

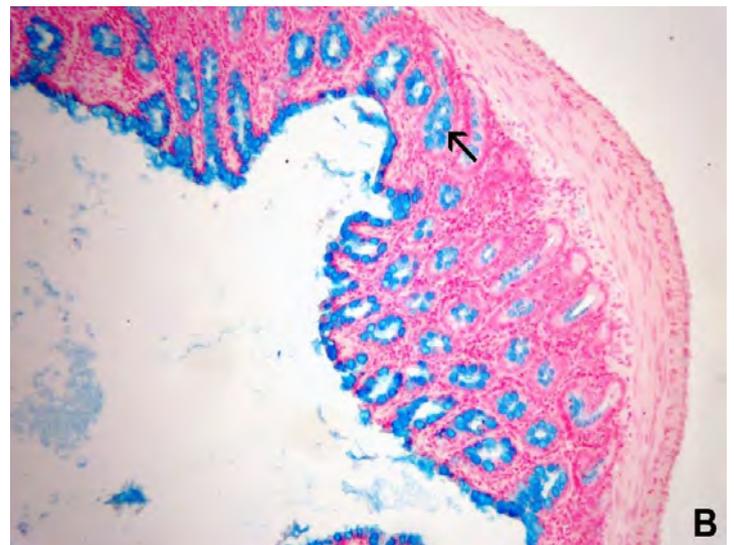
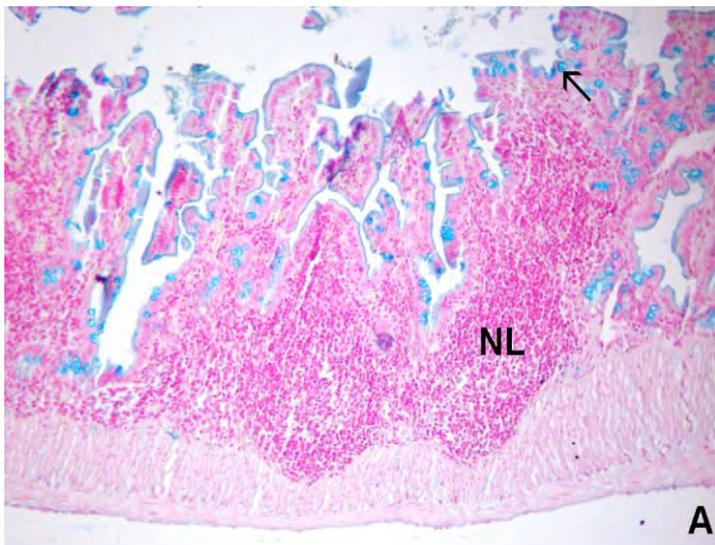
Nódulos linfóides não foram observados na espécie *D. capixaba*.



**Figura 17 (A-D).** Fotomicrografias em HE do intestino grosso das quatro espécies estudadas: **(A)** Visão geral do intestino grosso da espécie *C. villosum*, evidenciando as glândulas intestinais (Gi) e vasos sanguíneos na camada mucosa, destaque para espessa camada muscular interna (MI) e externa (ME) (150x). **(B)** Visão geral do intestino grosso de *D. capixaba* (630x). **(C)** Região do intestino grosso da espécie *P. discolor* com destaque para as numerosas glândulas intestinais (Gi) e presença de nódulo linfóide na mucosa (300x). **(D)** Destaque para presença da muscular da mucosa de *P. discolor* (630x).



**Figura 18 (A-B).** Fotomicrografias em PAS do intestino grosso das quatro espécies estudadas: (A) Visão geral da espécie *C. villosum*, com destaque para marcação positiva das GAG's neutras na planura estriada (seta) (630x). (B) Marcação positiva para GAG's neutras nas células caliciformes do epitélio (seta) e criptas da espécie *P. discolor* (300x).



**Figura 19 (A-B).** Fotomicrografias do intestino grosso das quatro espécies estudadas: (A) Espécie *C. villosum* com marcação positiva das células caliciformes (seta) para GAG's ácidas, destaque para a presença de nódulo linfoide (NL) (300x). (B) Marcação positiva para GAG's ácidas nas células caliciformes do epitélio e criptas (seta) da espécie *P. discolor* (300x).

## 4.2 análise imuno-histoquímica de células do sistema neuroendócrino difuso no intestino das espécies estudadas

Com a verificação das lâminas submetidas aos testes imuno-histoquímicos, observou-se que, dentre os anticorpos utilizados (5HT, CCK e SOM), apenas a somatostatina não obteve marcação ao longo do intestino. Quanto à morfologia das células endócrinas marcadas, dois padrões foram visualizados, tanto as células ditas do “tipo aberto”, quanto às ditas do “tipo fechado”.

### 4.2.1 Células imunorreativas à Serotonina (5-HT)

As células IR à 5-HT foram evidenciadas ao longo de todo o intestino nas espécies estudadas, ocorrendo tanto no epitélio intestinal quanto nas glândulas (Figuras 20B, 20D, 21A e 21C). Entre os anticorpos estudados (SOM, CCK e 5-HT) as células IR à 5-HT foram as mais abundante (Tabela 4).

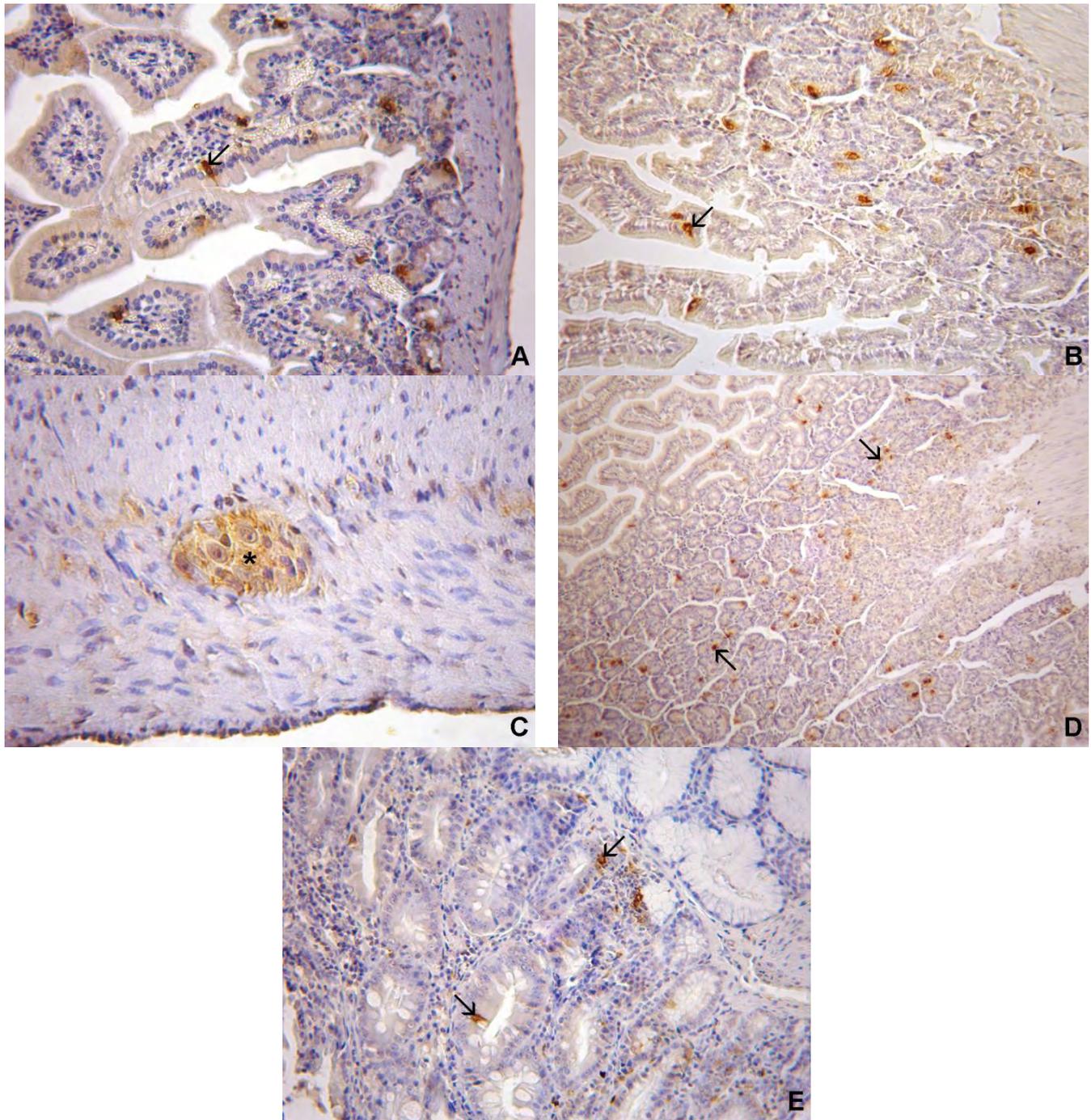
A frequência e a distribuição de células IR à 5-HT foram diferentes entre os animais estudados (Tabela 4). As espécies *C. villosum* e *P. discolor* apresentaram células IR à 5-HT ao longo de todo o intestino (Figuras 20, 21, 22 e 23). Já em *P. bilabiatum* esse tipo celular só foi identificado no intestino delgado (Figuras 20, 21 e 22). Em *D. capixaba*, essas células foram mais evidentes na porção final do intestino (íleo e intestino grosso) (Figuras 22B e 23B). Os dois padrões morfológicos foram observados em todas as espécies ao longo do intestino, visualizando tanto células do “tipo aberto” quanto do “tipo fechado”, sendo este o padrão morfológico predominante (Figuras 21A e 21B).

Apenas em *P. discolor* foi visualizado marcação do plexo mioentérico (Figura 20C).

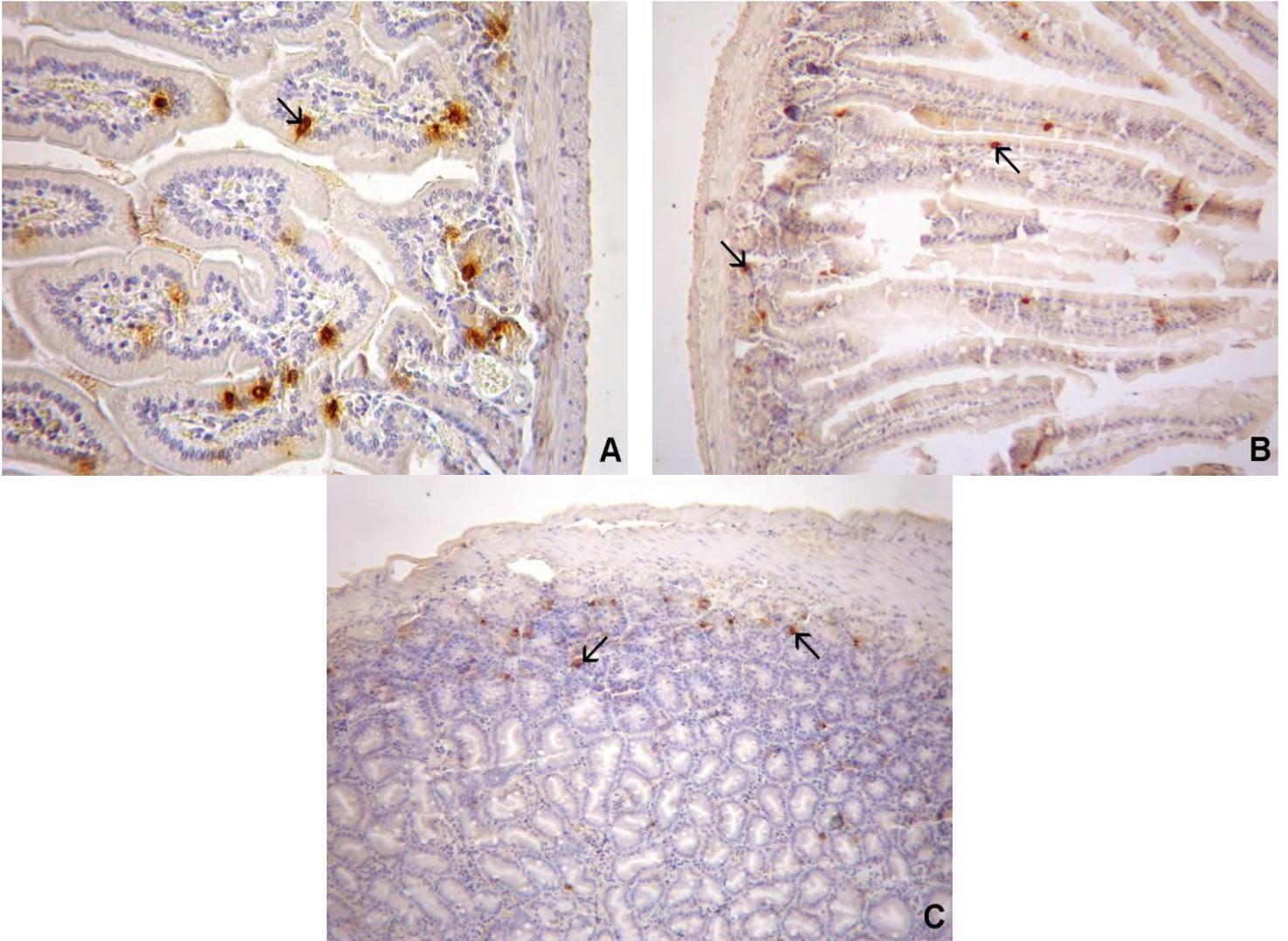
**Tabela 4.** Distribuição e frequência (média  $\pm$  SD) de células endócrinas no intestino das espécies estudadas.

Espécies Analisadas	Segmentos do intestino							
	Duodeno		Jejuno		Íleo		Intestino Grosso	
	5HT	CCK	5HT	CCK	5HT	CCK	5HT	CCK
<i>D. capixaba</i>	-	-	-	-	11,8 $\pm$ 2,9	-	3,8 $\pm$ 1,2	-
<i>P. bilabiatum</i>	13,3 $\pm$ 2,8	-	8,1 $\pm$ 2,3	-	10,1 $\pm$ 1,9	9,5 $\pm$ 1,3	*	*
<i>C. villosum</i>	14,0 $\pm$ 2,4	10,1 $\pm$ 2,8	21,2 $\pm$ 3,9	8,3 $\pm$ 1,4	13,7 $\pm$ 2,8	10,6 $\pm$ 2,3	10,4 $\pm$ 3,4	6,1 $\pm$ 1,3
<i>P. discolor</i>	7,3 $\pm$ 0,9	10,2 $\pm$ 2,0	8,9 $\pm$ 1,2	11,4 $\pm$ 2,5	9,6 $\pm$ 2,0	8,5 $\pm$ 1,4	4,2 $\pm$ 1,0	7,8 $\pm$ 1,9

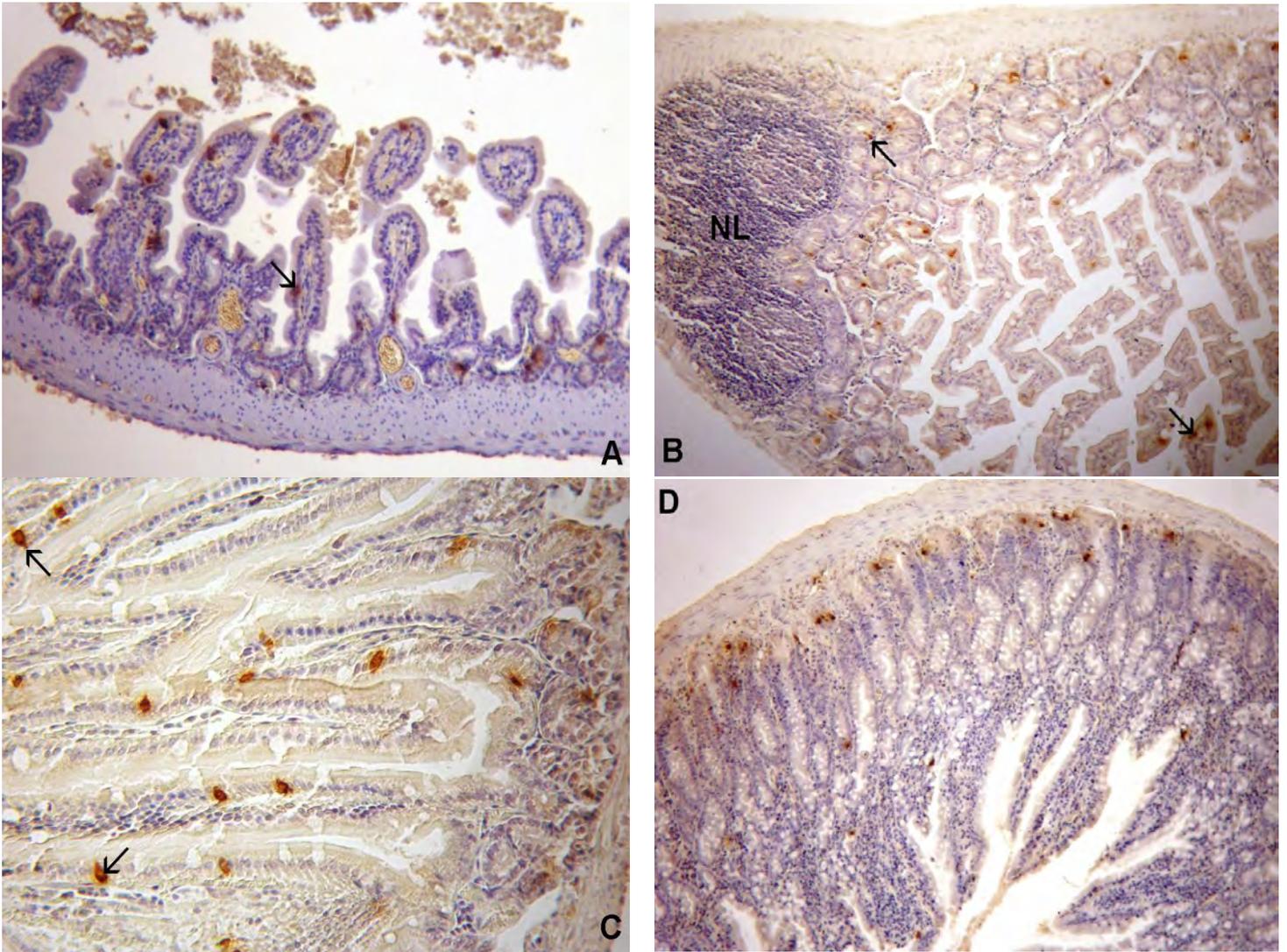
(-) marcação não observada. Órgão Não Visualizado (\*).



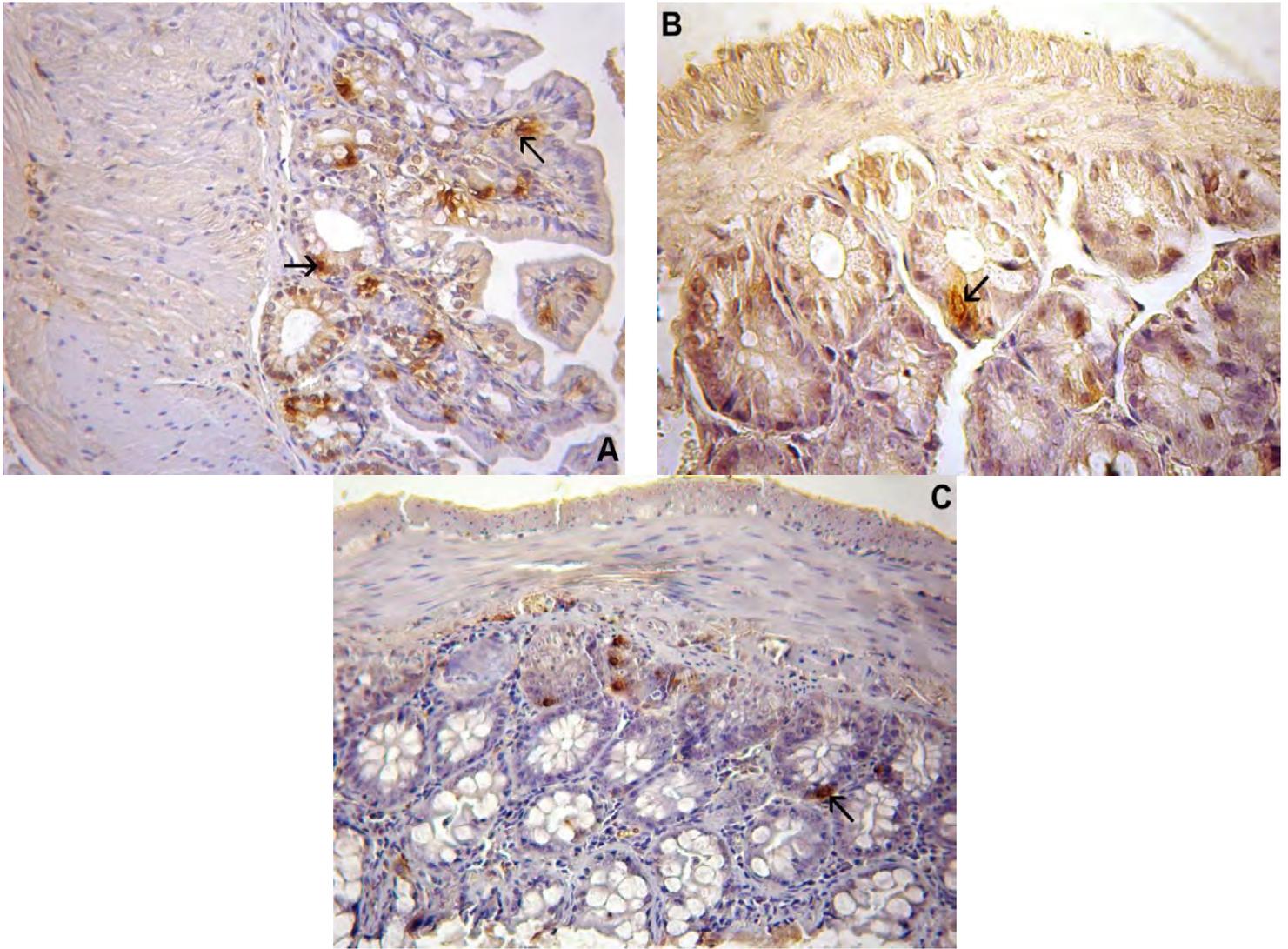
**Figura 20 (A-E).** Fotomicrografias de células IR à serotonina na região do duodeno: (A) Espécie *C. villosum* com células IR à 5-HT no epitélio e glândula intestinal, destaque para a célula do tipo aberto (seta) (630x). (B) Espécie *P. bilabiatum* com células IR à 5-HT no epitélio e glândula intestinal, destaque para a célula do tipo aberto (seta) (630x). (C) Espécie *P. discolor* com marcação do plexo mioentérico (\*) (1150x). (D) Marcação das células IR à 5-HT nas glândulas intestinais (seta) da espécie *P. bilabiatum* (300x). (E) Espécie *P. discolor* com células IR à 5-HT no epitélio e glândula intestinal (seta) (630x).



**Figura 21 (A-C).** Fotomicrografias de **células IR à serotonina** na região do jejuno: **(A)** Espécie *C. villosum* com células IR à 5-HT no epitélio e glândula intestinal, destaque para a célula do tipo aberto (seta) (630x). **(B)** Espécie *P. bilabiatum* com células IR à 5-HT no epitélio (seta) e glândula intestinal (seta) (300x). **(C)** Corte longitudinal do jejuno da espécie *P. discolor* com células IR à 5-HT no epitélio e glândula intestinal (seta) (300x).



**Figura 22 (A-D).** Fotomicrografias de células IR à serotonina na região do íleo: **(A)** Espécie *C. villosum* com células IR à 5-HT no epitélio (seta) e glândula intestinal (300x). **(B)** Espécie *D. capixaba* com células IR à 5-HT no epitélio (seta) e glândula intestinal (seta), destaque para a presença de nódulo linfoide (NL) (300x). **(C)** Espécie *P. bilabiatum* com células IR à 5-HT no epitélio e glândula intestinal, destaque para a célula do tipo aberto (seta) (630x). **(D)** Espécie *P. discolor* com células IR à 5-HT no epitélio e glândula intestinal (seta) (300x).



**Figura 23 (A-C).** Fotomicrografias de **células IR à serotonina** no intestino grosso: **(A)** Espécie *C. villosum* com células IR à 5-HT no epitélio (seta) e glândula intestinal (seta) (630x). **(B)** Espécie *D. capixaba* com células IR à 5-HT na glândula intestinal (seta), (1150x). **(C)** Espécie *P. discolor* com células IR à 5-HT na glândula intestinal (seta) (630x).

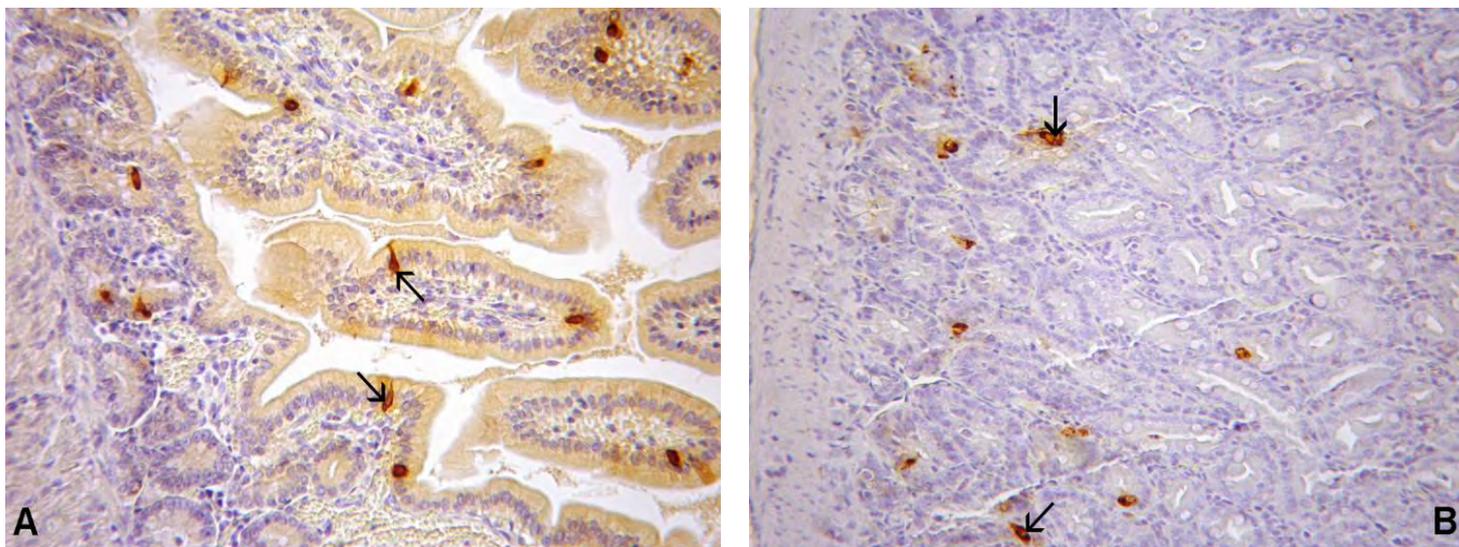
#### 4.2.2 Células imunorreativas à Colecistocinina (CCK)

As células IR à CCK foram evidenciadas ao longo de todo o intestino nas espécies *P. discolor* e *C villosum*. Já na espécie *P. bilabiatum* esse tipo celular só foi evidenciado na porção do íleo, e em *D. capixaba* esse tipo celular não foi evidenciado (tabela 4). As células IR à CCK ocorreram tanto no epitélio intestinal quanto nas glândulas (Figuras 24, 25, 26 e 27)

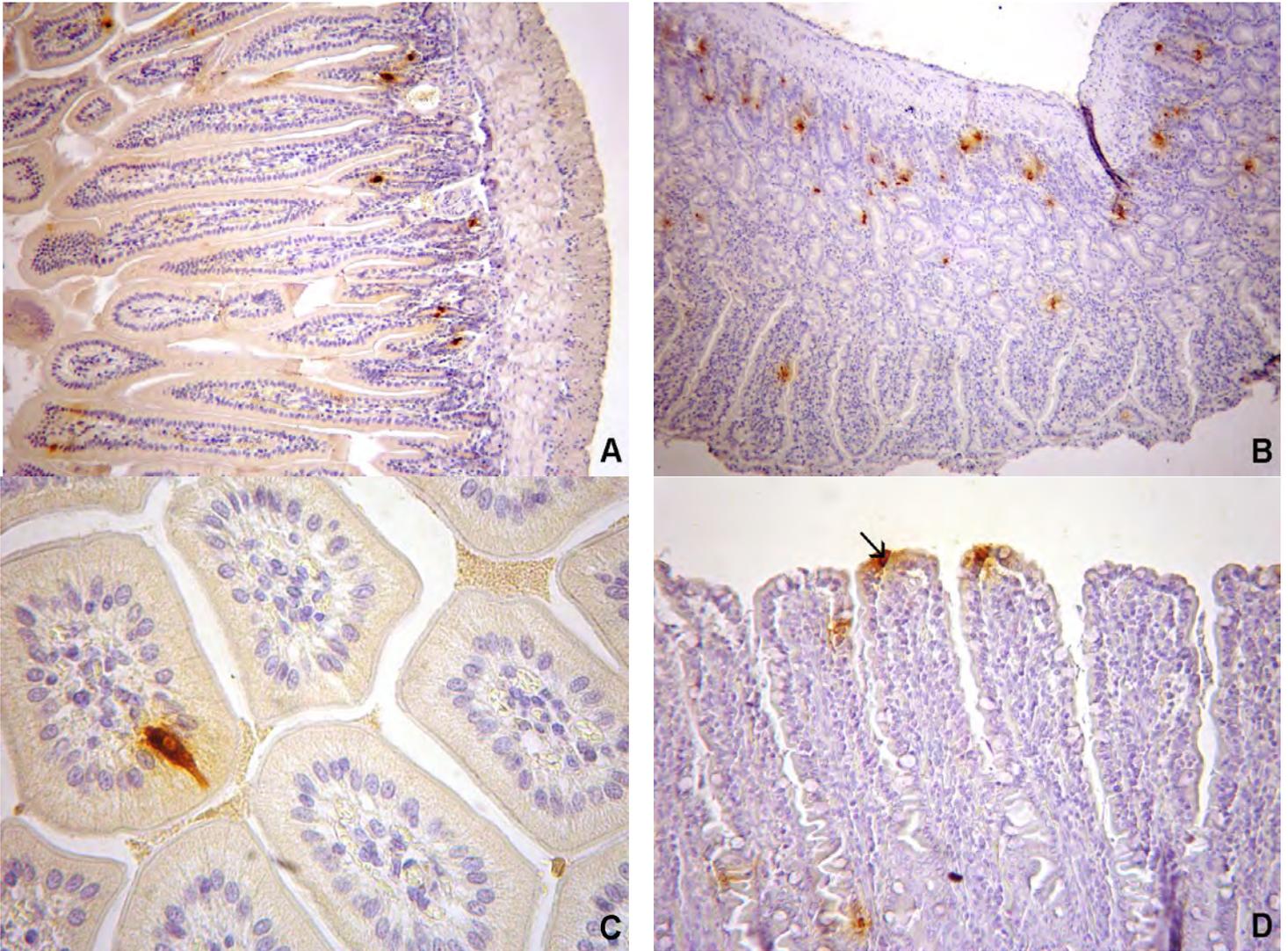
A frequência e a distribuição de células IR à CCK foram semelhantes entre as *P. discolor* e *C villosum* (Tabela 4). Dentre os padrões morfológicos apresentados, as células do “tipo fechado” (Figura 25D) foram observadas em maior quantidade quando comparadas com as do “tipo aberto” (Figura 25C).

#### 4.2.3 Células imunorreativas à Somatostatina (SOM)

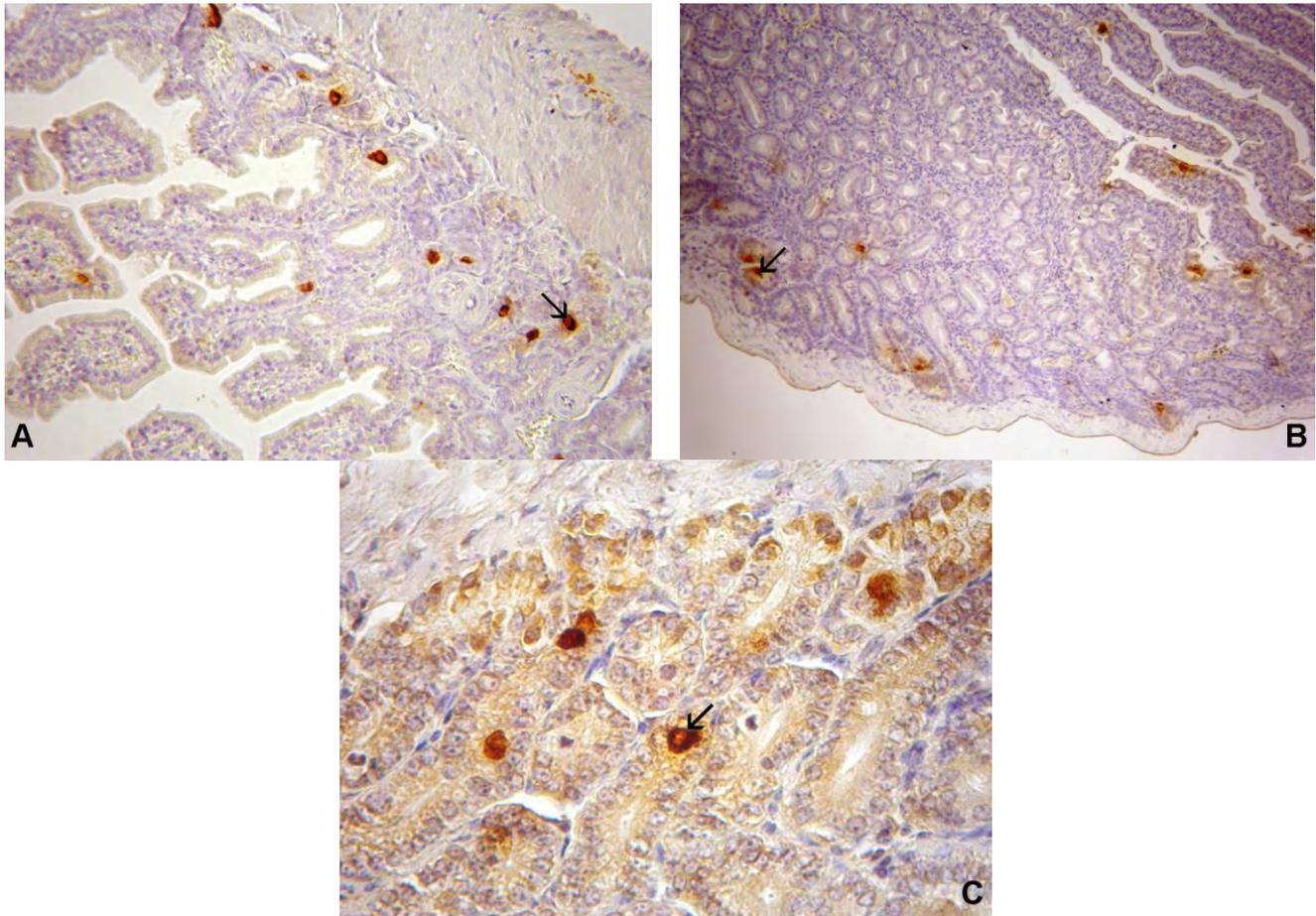
As células IR à SOM não foram evidenciadas ao longo do intestino das espécies estudadas.



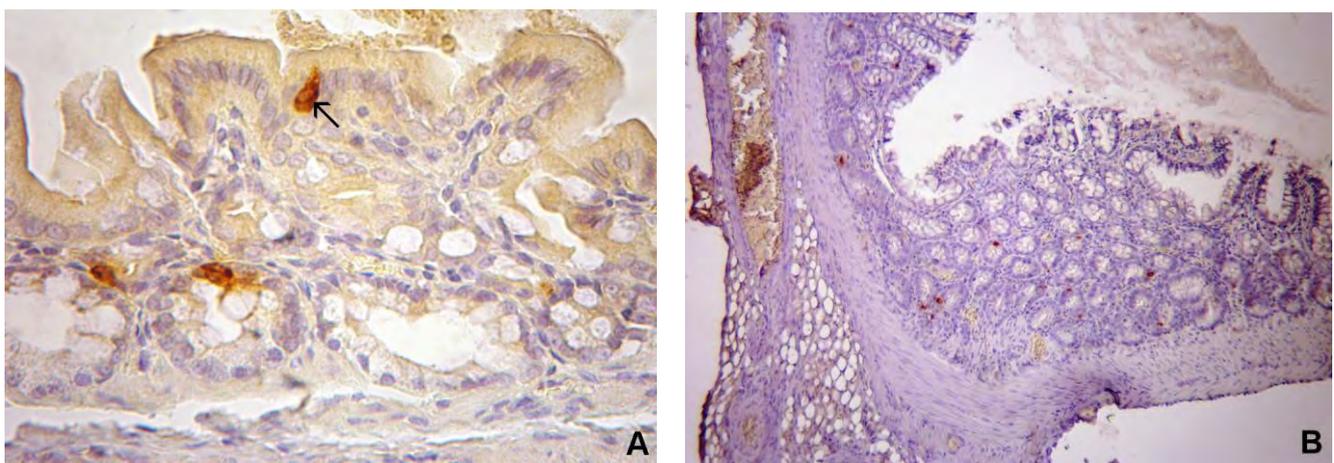
**Figura 24 (A-B).** Fotomicrografias de **células IR à colecistocinina** na região do duodeno: **(A)** Espécie *C. villosum* com células IR à CCK no epitélio e glândula intestinal, destaque para a célula do tipo aberto (seta) no epitélio (630x). **(B)** Espécie *P. discolor* com células IR à CCK no epitélio e glândula intestinal (seta), corte longitudinal (630x).



**Figura 25 (A-D).** Fotomicrografias de células IR à colecistocinina na região do jejuno: (A) Visão geral do jejuno da espécie *C. villosum* com marcação positiva para células IR à CCK (300x). (B) Visão geral do jejuno da espécie *P. discolor* com marcação positiva para células IR à CCK (300x). (C) Visão em maior aumento do corte longitudinal do epitélio da espécie *C. villosum*, evidenciando uma célula do tipo aberto (1150x). (D) Visão do epitélio da espécie *P. discolor* com células IR à CCK (seta) (630x).



**Figura 26 (A-C).** Fotomicrografias de **células IR à colecistocinina** na região do íleo: **(A)** Espécie *C. villosum* com células IR à CCK no epitélio e glândula intestinal (seta) (630x). **(B)** Espécie *P. discolor* com células IR à CCK no epitélio e glândula intestinal (seta) (300x). **(C)** Espécie *P. bilabiatum* com células IR à CCK na glândula intestinal (seta) (1150x).



**Figura 27 (A-B).** Fotomicrografias de **células IR à colecistocinina** no intestino grosso: **(A)** Espécie *C. villosum* com células IR à CCK no epitélio (seta) e glândula intestinal (1150x). **(B)** Visão geral do intestino grosso da espécie *P. discolor* com células IR à CCK na glândula intestinal (300x).

## 5 DISCUSSÃO

O trato intestinal é um órgão com alto custo metabólico a ser mantido e consome aproximadamente 20% de toda a energia que entra durante a digestão e absorção de nutrientes da dieta (CANT *et al.*, 1996). Anatomicamente o intestino é um tubo oco muscular com uma forma irregular e é dividido em duas regiões, delgado e grosso (DYCE *et al.*, 2010). No presente estudo, assim com em outras espécies de quirópteros (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2009; STROBEL *et al.*, 2015), o intestino foi dividido em dois segmentos: delgado (subdividido em: duodeno, jejuno e íleo) e grosso, sendo este último segmento de difícil diferenciação macroscópica. No geral, em quirópteros, o intestino grosso é curto e não forma os segmentos ascendente e transversal (FORMAN *et al.*, 1979).

Histologicamente, a parede do intestino das espécies *D. capixaba*, *P. bilabiatum*, *C. villosum* e *P. discolor* foi similar à de outros mamíferos quanto a sua constituição, estando presentes as camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa (OFUSORI *et al.*, 2008; PAKSUZ & PAKSUZ, 2015). Entretanto em morcegos, essas camadas são muito mais delgadas. Um estudo comparativo entre morcegos e outros mamíferos roedores, verificaram que os morcegos tendem a ter menos tecido intestinal, o que seria uma vantagem para os quirópteros por facilitar a decolagem e a realização de manobras durante o voo (CAVIEDES-VIDAL *et al.*, 2008).

Assim como na maioria das espécies, a camada mucosa do intestino delgado apresenta uma morfologia variável. Principalmente no que diz respeito à forma, tamanho e quantidade de vilosidades. Gadelha-Alves *et al.* (2008) após avaliar os intestinos delgado e grosso de cinco espécies de quirópteros filostomídeos em relação a seus hábitos alimentares, observou que a espécie frugívora *Sturnira lilium* (E. Geoffroy, 1810), apresentou vilosidades mais longas que outros quirópteros de hábito alimentar diferente. Resultado similar foi encontrado nesse estudo nas espécies *P. bilabiatum* e *C. villosum*, sendo este padrão melhor visualizado na região do jejuno. Já as espécies *D. capixaba* e *P. discolor* apresentaram um padrão regressivo, com vilosidades maiores no duodeno e diminuindo ao longo das demais regiões do intestino delgado, assim como em *Myotis myotis* (Borkhausen, 1797) (PAKSUZ, 2014). Segundo Forman *et al.* (1979) estas grandes vilosidades teriam o papel de retardar o trânsito do bolo alimentar e consequentemente, permitir uma melhor absorção dos nutrientes nele contido, além de desempenhar um papel importante, ajudando a complementar o movimento peristáltico de contrapeso a gravidade quando os animais estão em sua postura normal (SELIM & NAHAS, 2015).

Ainda em relação à mucosa, o epitélio intestinal, foi semelhante ao encontrado em outros mamíferos, sendo do tipo cilíndrico simples com planura estriada e células caliciformes. Equivalente ao observado em ratos, pangolín e morcegos (OFUSORI *et al.*, 2008; SELIM & NAHAS, 2015), sendo as células caliciformes encontradas em quantidade variável, tornando-se mais numerosas ao longo do tubo. Além disso, a quantidade de células caliciformes também pode alterar de acordo com a espécie estudada. Neste estudo a espécie *P. discolor* foi a que mais apresentou células caliciformes. Essa variação interespecífica também foi observada em outras espécies de morcegos por Ishikawa *et al.* (1985), Tedman & Hall (1985), Makanya & Maina (1994) cujo os quirópteros apresentaram menos células caliciformes do que *S. lilium*, *Phyllostomus hastatus* (Pallas, 1767), *Carollia perspicillata* (Linnaeus, 1758) e *Glossophaga soricina* (Pallas, 1766) (GADELHA *et al.*, 2008), o que pode estar

associado ao tipo de alimento consumido e a presença ou não de alimento no trato intestinal (MELLO *et al.*, 2012).

Quanto à histoquímica, a marcação foi diferente entre as espécies estudadas. *D. capixaba*, *P. bilabiatum* e *P. discolor* apresentaram coloração positiva para PAS e AB pH 2,5 para todas as regiões estudadas do intestino. Já em *C. villosum*, além de uma marcação menos expressiva ao longo do intestino, essa espécie não apresentou marcação para GAG's neutras na região do duodeno. Embora as mucinas no sistema digestório dos vertebrados sejam semelhantes em suas propriedades macromoleculares, elas variam dependendo do segmento do trato com respeito à quantidade de mucossubstâncias ácidas e neutras (FERRI *et al.*, 1999). Além disso, a distribuição das mucinas gastrointestinais pode variar de acordo com o número de células secretoras, tipo de célula, região anatômica, condição patológica e espécie (SCILLITANI *et al.*, 2007). Ambas as mucinas ácidas e neutras têm sido propostas para aumentar a viscosidade do muco (BANSIL & TURNER, 2006), entretanto as mucinas ácidas são relatadas como tendo maior viscosidade em comparação com as mucinas neutras (PINKY *et al.*, 2008).

Uma região de difícil visualização no intestino delgado dos quirópteros é a muscular da mucosa, pois consiste em uma camada de tecido muito fina (GADELHA-ALVES *et al.*, 2008). Nas espécies estudadas a muscular da mucosa só foi visualizada no intestino de *P. discolor*. Essa subcamada promove o movimento da camada mucosa, independentemente de outros movimentos do trato digestório, aumentando o contato da mucosa com o alimento (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Todavia em *D. capixaba*, *P. bilabiatum*, e *C. villosum* foram visualizados muitos plexos mionéricos ao longo de todo o intestino, promovendo também a contração intestinal, facilitando a absorção do alimento.

Na camada submucosa, da região duodenal, foram observadas as glândulas de Brünner nas espécies *P. discolor* e *P. bilabiatum*. Essas glândulas são específicas de mamíferos (SCHUMACHER *et al.*, 2004) Em alguns morcegos, elas são restritas à parte inicial do duodeno diretamente após o piloro (ISHIKAWA *et al.*, 1985). Assim como em *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774) (STROBEL *et al.*, 2015) essas também não foram observadas em *D. capixaba* e *C. villosum*.

Na maioria dos mamíferos, uma importante coleção de células linfoides, as placas de Peyer, estão presente no intestino. Elas estão localizadas na submucosa e na lâmina própria do intestino delgado e são essenciais para a iniciação e regulação das respostas imunes (KARARLI, 1995). Na espécie *P. discolor* os nódulos linfoides foram identificados na região do duodeno, enquanto que em *D. capixaba*, *P. bilabiatum* e *C. villosum* esses estavam presentes exclusivamente no íleo. Nickel *et al.* (1973) afirmou ainda que o número, o tamanho e a forma dos nódulos linfoides, estando eles isolados ou associados, variam com a espécie, idade, região intestinal e com a dieta do animal. Podendo estes encontrar-se bem distribuídos ao longo do trato nos morcegos (GADELHA-ALVES *et al.*, 2008).

A mucosa do intestino grosso nas espécies *D. capixaba*, *C. villosum* e *P. discolor* apresentou pregas e criptas, sendo de acordo com as descritas para outros morcegos (GADELHA-ALVES *et al.*, 2008; PAKSUZ & PAKSUZ, 2015). Em *P. pipistrellus* foi observado que o intestino grosso consistia apenas de cólon e reto e faltava um ceco e apêndice (STROBEL *et al.*, 2015). Em algumas espécies de morcegos, o intestino grosso pode até mesmo estar composto apenas pelo reto (OKON, 1977; SCILLITANI *et al.*, 2007). Esse intestino mais curto levaria à redução do peso corporal facilitando manobras realizadas durante o voo, além de aumentar o trânsito e a

absorção de nutrientes (CAVIEDES-VIDAL *et al.*, 2007; CAVIEDES-VIDAL *et al.*, 2008).

O epitélio dessa região foi semelhante ao delgado, entretanto o intestino grosso continha mais células caliciformes que produzem muco. Estas características do intestino grosso ajudam na produção de fezes e movimento fecal durante a defecação (KÖNIG & LIEBICH, 2007; DYCE *et al.*, 2010). Além de muitas células caliciformes é comumente encontrado no intestino grosso agregados de nódulos linfóides, devido o fato de que nessa região o bolo fecal acumula, aumentando a superfície de contato deste com o epitélio, podendo haver também a contaminação proveniente do meio externo próximo à região anal. Essa riqueza em tecido linfóide também está relacionada com a população bacteriana abundante no intestino grosso (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Estes nódulos foram visualizados apenas nas espécies *C. villosum* e *P. discolor*.

Muitas características histológicas geralmente encontradas no intestino de morcegos também foram observadas nas espécies estudadas, como a camada muscular composta de uma camada circular interna, sendo essa mais espessa na região do intestino grosso, e uma camada longitudinal externa, além de uma serosa, formada por tecido conjuntivo frouxo coberto por um mesotélio. O mesmo ocorreu em *G. soricina*, *Rousettus aegyptiacus* (E. Geoffroy, 1810) e *Taphozous nudiventris* Cretzschmar, 1830 (GADELHA-ALVES *et al.*, 2008; SELIM & NAHAS, 2015).

A descoberta de numerosos peptídeos reguladores existentes comumente no Sistema Nervoso Central (SNC), Sistema Nervoso Periférico, (SNP) e no Sistema Gastroenteropancreático (GEP), estabelecendo o Sistema Neuroendócrino Difuso (SND) (POLAK & BLOOM, 1983), possibilitou a realização de diferentes estudos nessa área. Uma vez que, acredita-se que este sistema atue regulando e controlando o curso fisiológico do organismo, desempenhando um papel importante na atividade de vida do organismo (MIN *et al.*, 2009).

Dentre os diferentes tipos de células neuroendócrinas espalhadas pelo trato gastrointestinal dos vertebrados, as células IR à 5-HT, são encontradas na mucosa de quase todo o tubo digestório e constituem a população predominante do sistema de células endócrinas do aparelho digestório (RODRIGUES, *et al.*, 2005). Nas espécies frugívoras *P. bilabiatum* e *C. villosum*, e na espécie onívora *P. discolor* esse tipo celular também foi o mais abundante, ocorrendo em todos os segmentos do intestino delgado, sendo observado tanto no epitélio como nas glândulas intestinais. Similar ao encontrado para as espécies de morcegos *Artibeus cinerius* (Gervais, 1856) e *S. lilium*, na qual a marcação para serotonina foi em toda a região do intestino (SANTOS *et al.*, 2008a). A serotonina também pode estar presente no sistema nervoso central e nos neurônios serotoninérgicos do gânglio mioentérico intestinal, que podem mediar reflexos locais (LI *et al.*, 2000). Em *P. discolor* foi possível visualizar marcação no plexo mioentérico. Já na espécie *D. capixaba* esse hormônio só foi identificado nas células endócrinas presentes no íleo e intestino grosso. Diferente do observado em *Anoura geoffroyi* Gray, 1838 e *G. soricina* (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2009).

Um peptídeo menos distribuído ao longo do trato gastrointestinal é a CCK, há um consenso geral de que as células enteroendócrinas contendo o hormônio colecistocinina, são confinadas ao intestino delgado e ocorrem predominantemente no duodeno e jejuno (FAKHRY *et al.*, 2017). Todavia em *C. villosum* e *P. discolor*, a CCK foi visualizada ao longo de todo o intestino. Assim como em outras espécies de morcegos e em rato (SANTOS *et al.*, 2008a; MACHADO-SANTOS *et al.*, 2009; FAKHRY *et al.*, 2017). Já em *P. bilabiatum* a CCK só foi visualizada no íleo e em *D. capixaba* não foi observada. Sabe-se que a CCK desempenha um papel fundamental na facilitação da digestão no intestino delgado. Esta atua inibindo a ingestão de alimentos

em mamíferos, além de contribuir para a transmissão excitatória e também estimula a secreção de pepsinogênio pelas células principais (SANTOS *et al.*, 2008b). Além disso, a CCK é liberada na corrente sanguínea em resposta às soluções ácidas, gordurosas e hipertônicas provenientes do estômago que alcançam o duodeno (RODRIGUES *et al.*, 2005).

A somatostatina pode ser encontrada ao longo de todo o trato gastrointestinal (RODRIGUES *et al.*, 2005). Entretanto em diferentes estudos sobre células endócrinas em quirópteros, as células IR à Somatostatina só foram identificadas na região do estômago. Isso ocorreu com os insetívoros *Pipistrellus abramus* (Temminck, 1840) e *Plecotus auritus* (Linnaeus, 1758) (YAMADA *et al.*, 1988), com o hematófago *Desmodus rotundus* (E. Geoffroy, 1810) (YAMADA *et al.*, 1984), e com os nectarívoros e frugi-nectarívoros *Anoura caudifer* (E. Geoffroy, 1818) e *C. perspicillata* (ASHIHARA *et al.*, 1999). Nesse estudo as células IR-somatostatina também não foram encontradas no intestino.

Quanto ao processo citoplasmático das células endócrinas investigadas nesse estudo pode-se observar célula tanto do tipo aberto quanto do tipo fechado. As células do tipo aberto são as que apresentam processos citoplasmáticos que atingem o lúmen intestinal, e sugere que estes hormônios podem ser secretados através da via exócrina para o lúmen intestinal. Diferente das do tipo fechado, que supostamente indicam a segregação destes hormônios através dos caminhos parácrinos (HUANG & WU, 2005).

## 6 CONCLUSÃO

- Histologicamente o intestino delgado das quatro espécies foi similar.
- As espécies frugívoras apresentaram vilosidades maiores na região do jejuno, quando comparadas com as espécies nectarívora e onívora.
- Houve diferença interespecífica para marcação histoquímica.
- A célula endócrina secretora de serotonina foi a mais abundante.
- A espécie *Dryadonycteris capixaba* não apresentou células imunorreativas a colecistocinina no intestino
- Não foram identificadas células imunorreativas a somatostatina no intestino das espécies estudadas.

## **CAPÍTULO II**

### **ASPECTOS HISTOLÓGICOS DO PÂNCREAS DE QUATRO ESPÉCIES DE MORCEGOS DA FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE E IMUNO-HISTOQUÍCO DAS ESPÉCIES *Dryadonycteris capixaba* E *Pygoderma bilabiatum* (MAMMALIA, CHIROPTERA)**

## RESUMO

CARDOSO, Nathália das Neves. **Aspectos histológicos do pâncreas de quatro espécies de morcegos da família Phyllostomidae e imuno-histoquímico das espécies *Dryadonycteris capixaba* e *Pygoderma bilabiatum* (Mammalia, Chiroptera).** 2017. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Este trabalho visou descrever a histologia do pâncreas de quatro espécies da família Phyllostomidae (*Dryadonycteris capixaba*, *Pygoderma bilabiatum*, *Chiroderma villosum* e *Phyllostomus discolor*), bem como analisar a presença de células endócrinas no pâncreas das espécies *D. capixaba* e *P. bilabiatum*, buscando relacionar interespecificamente as características encontradas. Os animais analisados foram cedidos da coleção zoológica do Laboratório de Mastozoologia do Departamento de Biologia Animal (DBA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). O material da coleção foi fixado (formalina 10%) e acondicionado em álcool a 70%. Posteriormente foi encaminhado ao Laboratório de Histologia e Embriologia da UFRRJ, onde foram submetidos aos processamentos histológicos de rotina e aos testes imuno-histoquímico, para a obtenção de células produtoras de insulina, glucagon, somatostatina e colecistocinina. Histologicamente, foram identificados os componentes endócrinos (ilhotas pancreáticas) e exócrinos (ácinos secretores e seus ductos associados) do pâncreas. Todos os anticorpos testados obtiveram marcação no pâncreas das espécies *D. capixaba* e *P. bilabiatum*. Foram observadas células imunorreativas (IR) à insulina, ocupando toda a região da ilhota e células IR à glucagon na região da periferia e centro das ilhotas. As células IR à somatostatina e colecistocinina foram visualizadas apenas na periferia das ilhotas. Através deste estudo, notou-se que não houve diferença histológica interespecífica entre as espécies estudadas e que ocorreu similaridade quanto a distribuição das células endócrinas estudadas nas espécies *D. capixaba* e *P. bilabiatum*.

**Palavras chave:** Histologia, pâncreas, células endócrinas, morcegos.

## ABSTRACT

CARDOSO, Nathália das Neves. **Histological aspects of the pancreas of four species of bats of the family Phyllostomidae and immunohistochemical of the species *Dryadonycteris capixaba* and *Pygoderma bilabiatum* (Mammalia, Chiroptera).** 2017. Thesis (Doctor in Animal Biology). Institute of Biological Sciences and Health. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

The aim of this work was to describe the histology of the pancreas of four species of the family Phyllostomidae (*Dryadonycteris capixaba*, *Pygoderma bilabiatum*, *Chiroderma villosum* and *Phyllostomus discolor*), as well as to analyze the presence of endocrine cells in the pancreas of *D. capixaba* and *P. bilabiatum*, searching to relate interspecifically the characteristics found. The animals analyzed were transferred from the zoological collection of the Mastozoology Laboratory of the Department of Animal Biology (DBA) of the Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ). The collection material was fixed (10% formalin) and conditioned in 70% alcohol. Subsequently, he was referred to the Laboratory of Histology and Embryology of UFRRJ, where they were submitted to routine histological procedures and immunohistochemical tests to obtain insulin, glucagon, somatostatin and cholecystokinin producing cells. Histologically, the endocrine (pancreatic islets) and exocrine components (secretory acini and their associated ducts) of the pancreas were identified. All antibodies tested were labeled in the pancreas of the species *D. capixaba* and *P. bilabiatum*. Immunoreactive (IR) cells were observed on insulin, occupying the entire islet region and IR cells on glucagon in the region of the periphery and center of the islets. The IR cells to somatostatin and cholecystokinin were visualized only at the periphery of the islets. Through this study, it was observed that there was no interspecific histological difference between the studied species and that similarity occurred regarding the distribution of the endocrine cells studied in the species *D. capixaba* and *P. bilabiatum*.

Key words: Histology, pancreas, endocrine cells, bats.

# 1 INTRODUÇÃO

Espécies da família Phyllostomidae podem se alimentar de sangue, insetos, pequenos vertebrados, néctar, frutos e misturas onívoras complexas (GARDNER, 1977). Este espectro dietético amplo fornece uma oportunidade única para investigar a influência da dieta em traços fisiológicos. Assim, a dieta tem o potencial de atuar como uma força seletiva moldando a função digestiva (STUDIER *et al.*, 1983; KARASOV & DIAMOND, 1988; DIAMOND, 1991).

Um dos órgãos envolvido no controle do metabolismo energético é o pâncreas, esse participa diretamente das vias metabólicas da glicogenólise e neoglicogênese, através da liberação dos hormônios como a insulina e o glucagon. O pâncreas dos mamíferos é uma glândula mista, que tem ambos os compartimentos exócrino e endócrino. Dissipadas entre os acinos pancreáticos exócrino estão às unidades endócrinas. Estas se encontram localizadas em aglomerados de células conhecidas como ilhotas de Langerhans e são compostas por uma massa compacta de células, permeada por uma rede de capilares (GOLDSTEIN & DAVIES, 1968; GRUBE & BOHN, 1983).

Sabe-se que a distribuição de células endócrinas dentro das ilhotas de Langerhans pode variar tanto entre espécies como sob diferentes condições energeticamente exigentes (KRAMER & BUFFENSTEIN, 2004). Em muitas espécies de animais, verificou-se que a porção endócrina do pâncreas continha quatro tipos de células e a distribuição destas foi demonstrada em diferentes indivíduos. A presença dessas células e suas localizações dentro do pâncreas têm importantes implicações funcionais (MICHELMORE *et al.*, 1998).

Assim sendo é de extrema importância os estudos histológicos e imuno-histoquímico sobre o pâncreas, de forma que possam ser melhor compreendidos a fisiologia e o hábito alimentar da espécie a ser estudada bem como revelar muitas peculiaridades que dependem do ambiente ou da evolução filogenética (MOTTA, 1988).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Descrição histológica do pâncreas de *D. capixaba*, *P. bilabiatum*, *C. villosum* e *P. discolor* e imuno-histoquímica das espécies *D. capixaba*, *P. bilabiatum* buscando relacionar interespecificamente as características encontradas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o padrão histológico do órgão estudado;
- Caracterizar a presença e distribuição das células endócrinas secretoras de insulina (INS), glucagon (GLU), colecistocinina (CCK) e somatostatina (SOM), no pâncreas de *D. capixaba*, *P. bilabiatum*.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Animais estudados

Os animais foram coletados na Reserva Natural Vale e posteriormente foi retirado o pâncreas e o mesmo foi fixado em formalina 10% e acondicionado em álcool a 70%. Todos os exemplares sacrificados foram incorporados à coleção Adriano L. Peracchi (ALP), depositada no Laboratório de Mastozoologia do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). No presente trabalho foram analisados 12 exemplares adultos de quirópteros (Tabela 1). Os espécimes foram coletados através da licença 15809-1, fornecida pelo ICMBio/SISBIO.

**Tabela 5.** Dados sobre os animais estudados

<b>Espécies</b>	<b>Hábito Alimentar</b>	<b>Número de Indivíduos</b>	<b>Números de Tombo</b>
<i>Dryadonycteris capixaba</i>	Nectarívoro	3	ALP9667/ALP10115/ALP10329
<i>Pygoderma bilabiatum</i>	Frugívoro	2	ALP10044/ALP10116
<i>Chiroderma villosum</i>	Frugívoro	4	ALP10131/ALP10132/ALP10133/ALP10330
<i>Phyllostomus discolor</i>	Onívoro	3	ALP10751/ALP10754/ALP10880

### 3.2 Análises Histológicas e Histoquímicas

O material da coleção foi fixado (formalina 10%) e acondicionado em álcool a 70%. Posteriormente foi encaminhado ao Laboratório de Histologia e Embriologia da UFRRJ. Os pâncreas foram submetidos aos processamentos histológicos de rotina que incluem: desidratação (em uma série crescente de etanol - 70° GL a 100° GL), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em Histosec-parafina (Merck, Darmstadt, Germany) para obtenção de cortes de 5 µm espessura. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para o exame do órgão.

### 3.3 Estudo imuno-histoquímico

Para o método Imuno-histoquímico foi utilizado o kit Starr Trek Universal HRP Detection System (Código: 901-STUHRP700-090314). Neste estudo os cortes histológicos foram submetidos às etapas de procedimento de rotina da técnica de imuno-histoquímica, incluindo a incubação com os anticorpos específicos para: **colecistocinina** (CCK) (Código: C 2581 Sigma-Aldrich, inc), **somatostatina** (SOM) (Código: A 0566 - Dakocytomation), **glucagon** (GLU) (Código: G 2654 Sigma-Aldrich, inc) e **insulina** (INS) (Código: I 2018 Sigma-Aldrich, inc). Após o processamento imuno-histoquímico, os cortes foram contracorados pela hematoxilina de Harris, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e as lâminas foram montadas com lamínula e Entellan (Merck). Para garantir a especificidade das reações, controles positivos e negativos foram utilizados. Os controles negativos foram definidos por

substituição do anticorpos primário por soro não imune e para os controles positivos foram utilizados cortes dos tipos de tecidos indicados no datasheet de cada anticorpos.

### **3.4 Observações e fotomicrografias**

Todas as lâminas foram observadas e fotomicrografias foram feitas com câmera digital Sony Cybershot DSCW 230 acoplada ao microscópio Olympus BX41.

## **4 RESULTADOS**

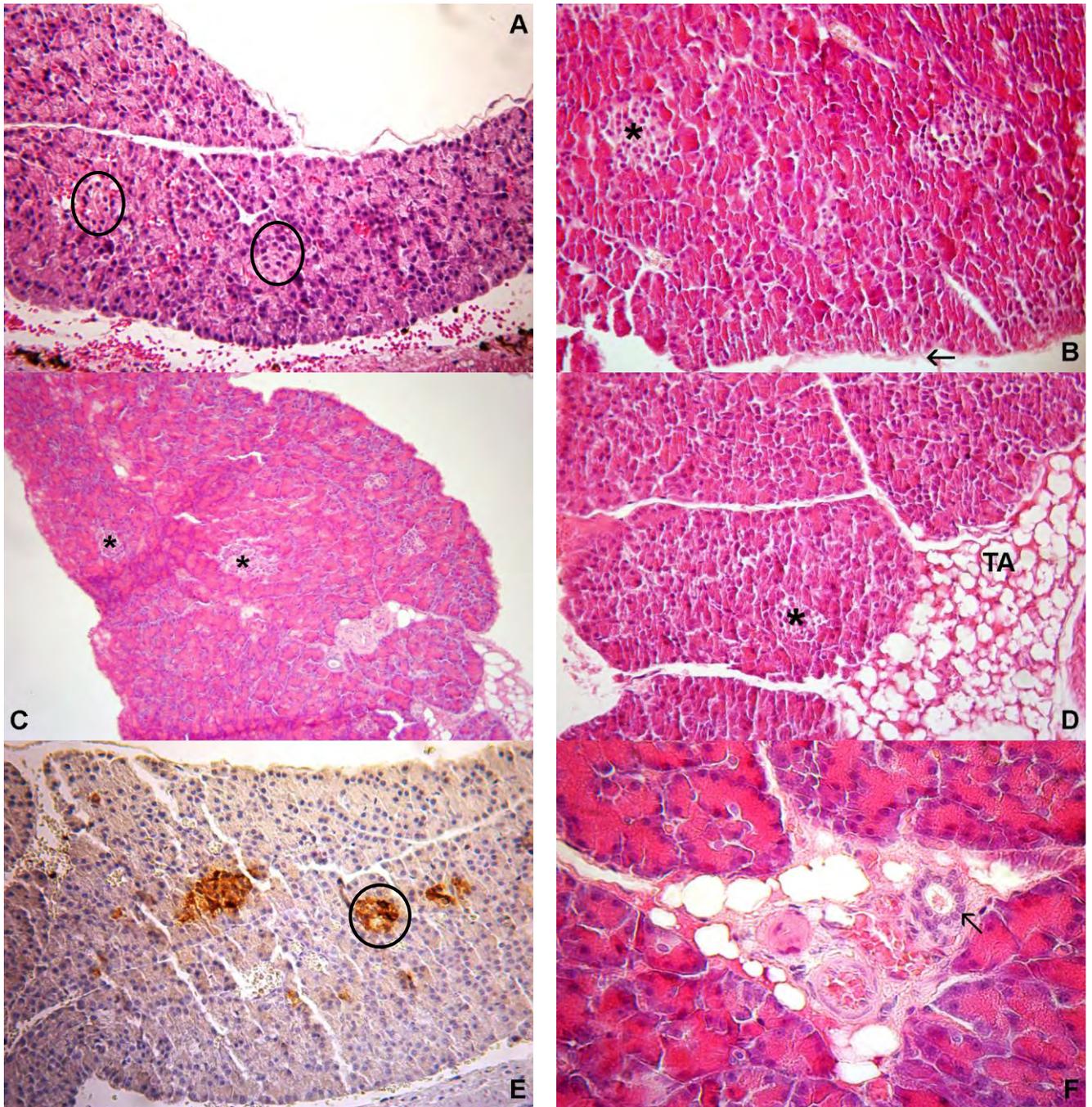
### **4.1 Descrição histológica do pâncreas das espécies estudadas**

Histologicamente o pâncreas dos morcegos *D. capixaba*, *P. bilabiatum*, *C. villosum* e *P. discolor* é coberto por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo, que se estende sobre a forma de septos para o interior do órgão, os quais subdividem a glândula em lóbulos, sendo observada a presença de ductos interlobulares (Figura 27F). Na região do parênquima foi visualizada uma parte exócrina formada por uma extensa rede capilar e ácinos pancreáticos, constituído por várias células serosas que circundam o lúmen, além de uma parte endócrina composta por ilhotas pancreáticas (Figura 27B). Essas formam grupos arredondados de cordões de células imersos no tecido exócrino, sendo separada do tecido exócrino por uma fina camada de tecido conjuntivo. A quantidade de ilhotas foi variável entre as espécies estudadas, *P. discolor* apresentou mais ilhotas que as demais espécies e *C. villosum* foi a que menos apresentou ilhotas. Externamente à cápsula foi visualizado tecido adiposo (Figura 27D).

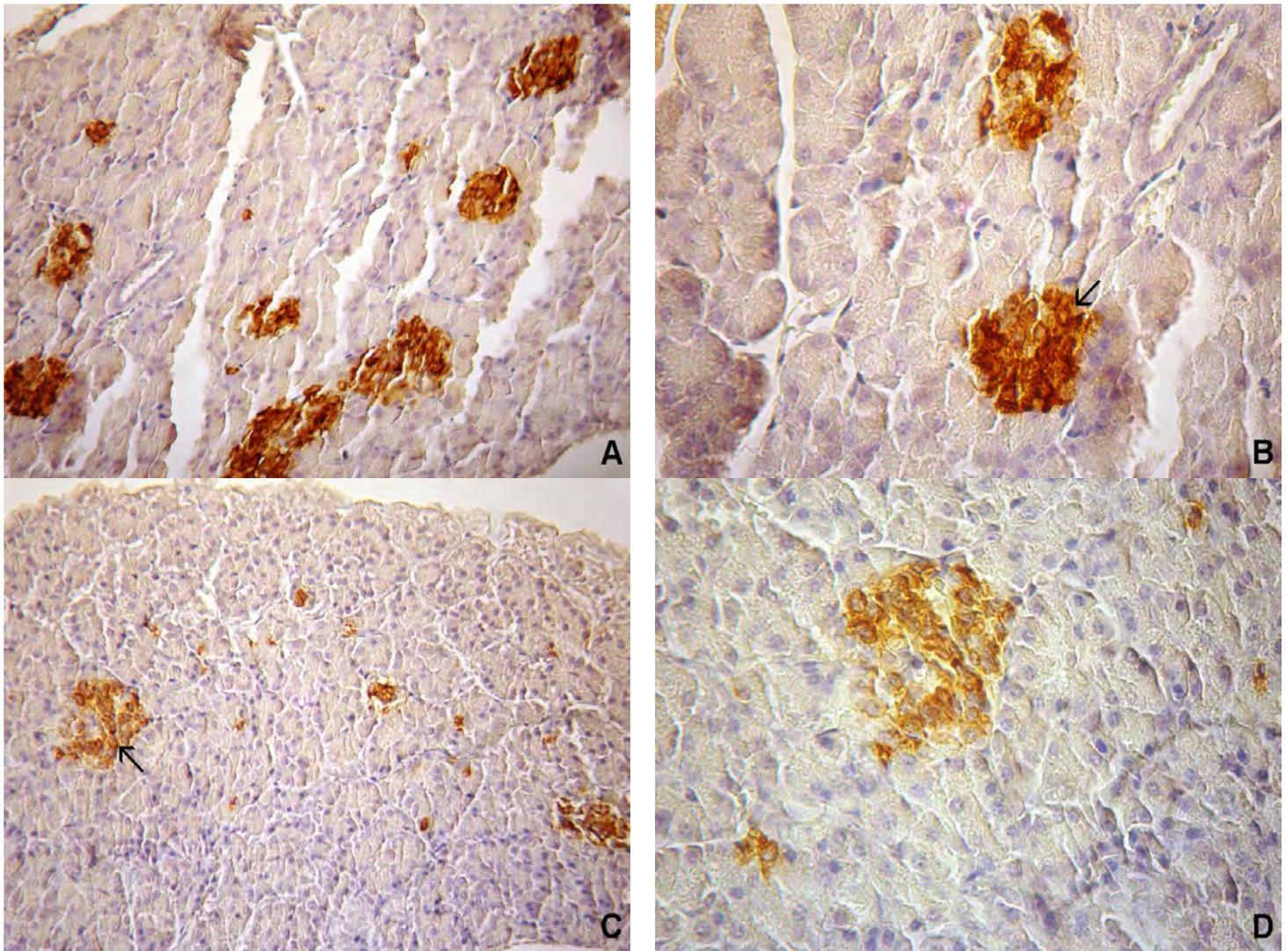
### **4.2 Análise imuno-histoquímica de células endócrinas no pâncreas de *Dryadonycteris capixaba* e *Pygoderma bilabiatum***

Com a análise das lâminas submetidas aos testes imuno-histoquímicos, observou-se que, todos os anticorpos utilizados (CCK, SOM, GLU e INS), obtiveram marcação positiva nas ilhotas pancreáticas das duas espécies estudadas.

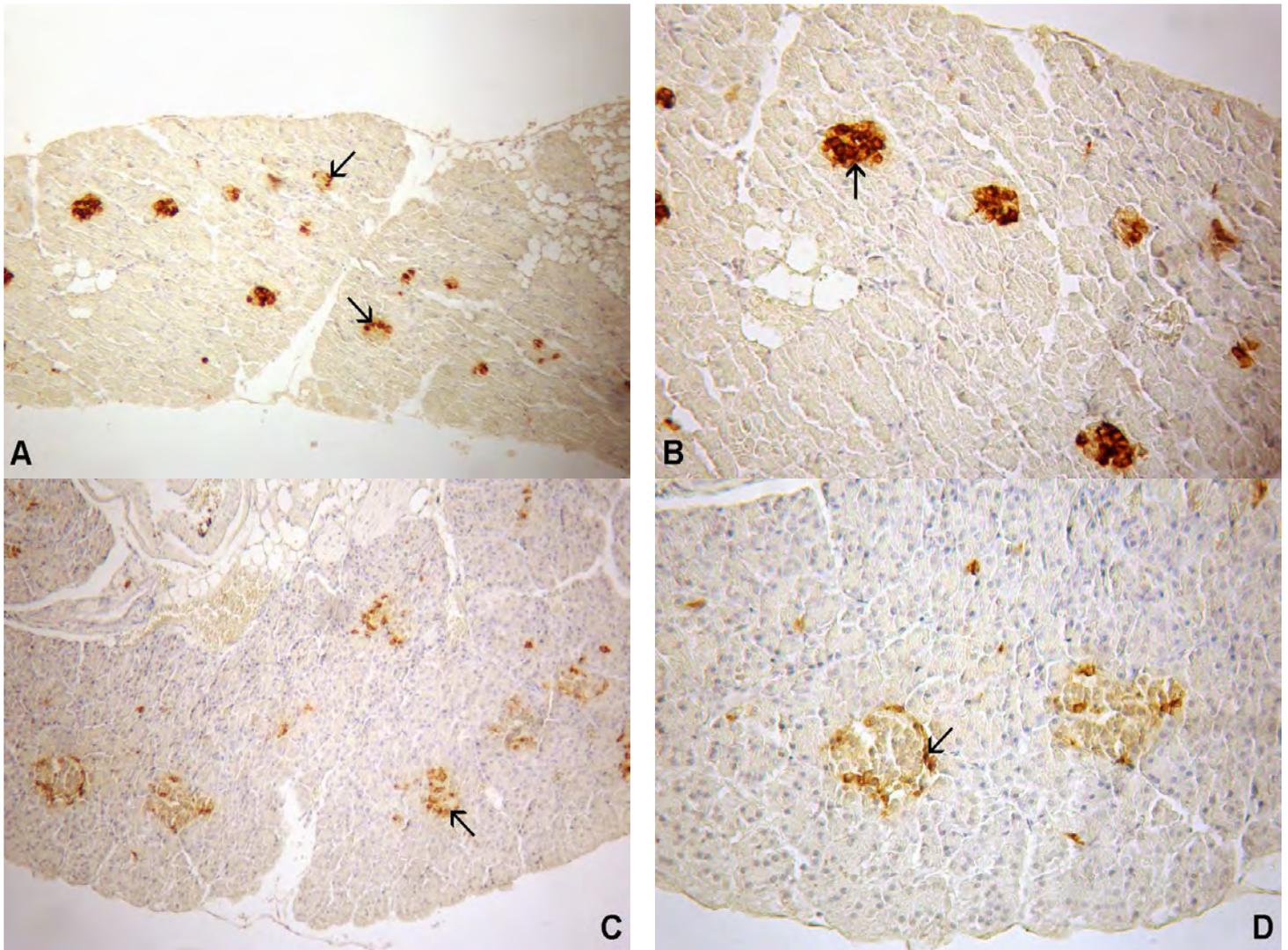
Os anticorpos CCK e SOM obtiveram marcação celular ao redor das ilhotas nas espécies *P. bilabiatum* e *D. capixaba* (Figuras 30 e 31), já as células IR à GLU foram visualizadas tanto na periferia (Figuras 29A e 29D), quanto no centro de cada ilhota (Figura 29B). E as células IR à INS marcaram toda a ilhota em ambas as espécies (Figura 28). Todavia a marcação em *D. capixaba* foi mais forte para todos os anticorpos estudados.



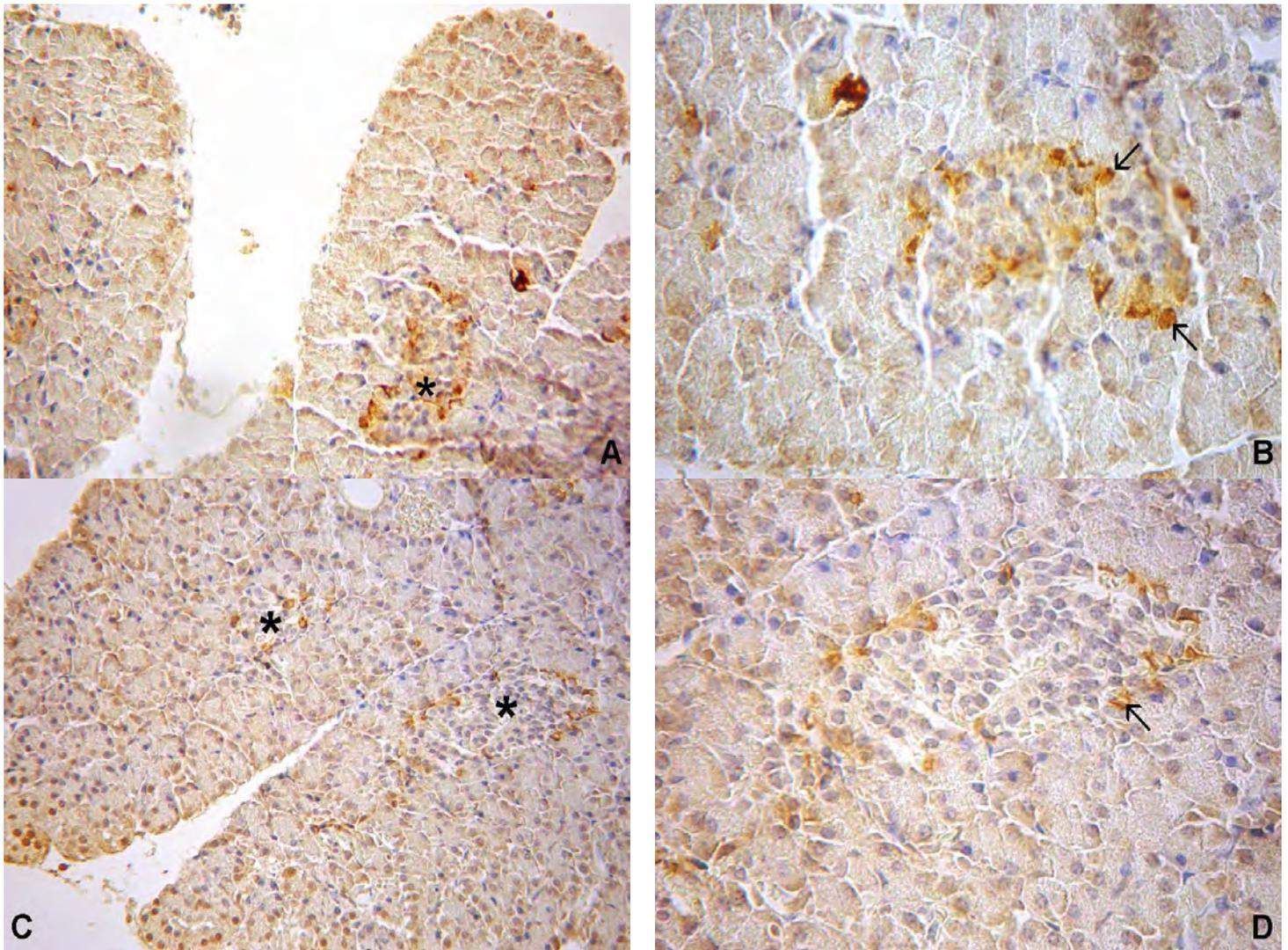
**Figura 27 (A-F).** Fotomicrografias do pâncreas das quatro espécies estudadas: **(A)** Pâncreas da espécie *C. villosum*, evidenciando as ilhotas (círculo) (630x) (HE). **(B)** Pâncreas da espécie *D. capixaba*, com destaque para cápsula de tecido conjuntivo (seta) e ilhotas (\*) (630x) (HE). **(C)** Visão geral do pâncreas da espécie *P. discolor* com destaque para ilhotas (\*) (300x) (HE). **(D)** Pâncreas da espécie *P. bilabiatum*, evidenciando tecido adiposo (TA) e ilhotas (\*) (630x) (HE). **(E)** Destaque para a presença de ilhotas (círculo) na espécie *C. villosum* (630x) (imuno-histoquímica). **(F)** Pâncreas da espécie *P. discolor*, evidenciando ducto interlobular (seta) (1150x) (HE).



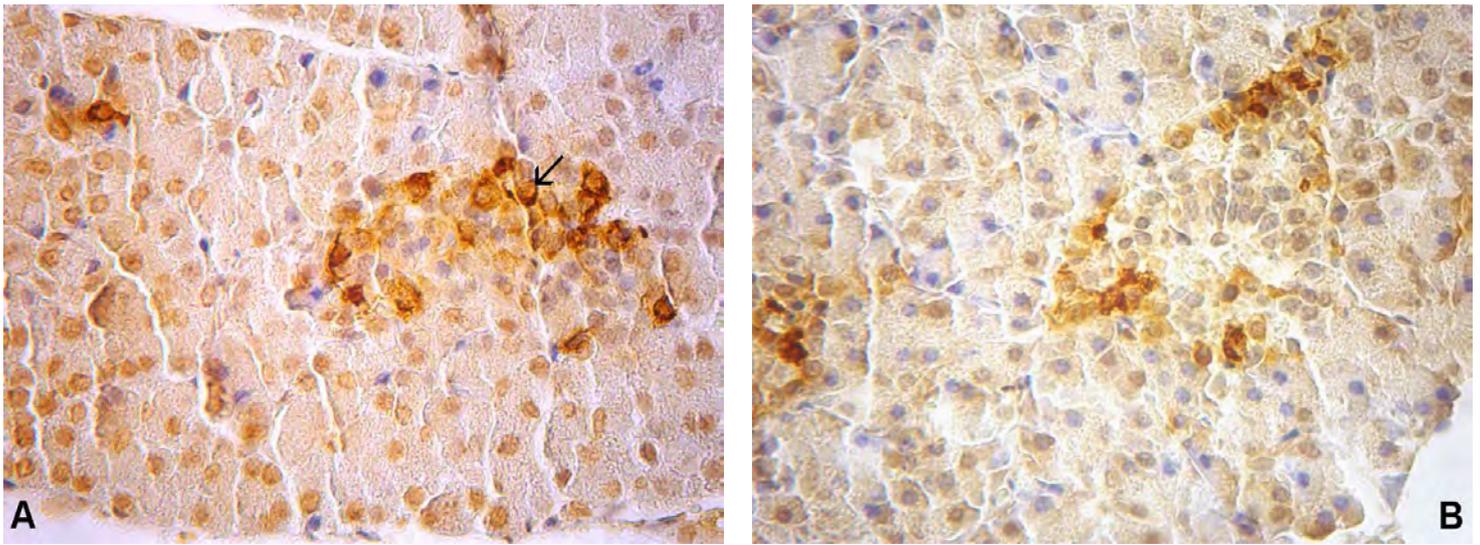
**Figura 28 (A-D).** Fotomicrografias de **células IR à insulina**: **(A)** Espécie *D. capixaba* com o pâncreas endócrino marcado positivamente para células IR à INS (630x). **(B)** Destaque para ilhota (seta) da espécie *D. capixaba* com marcação positiva para células IR à INS (1150x). **(C)** Visão geral do pâncreas da espécie *P. bilabiatum* com marcação positiva do pâncreas endócrino (seta) para células IR à INS (630x). **(D)** Destaque para ilhota da espécie *P. bilabiatum* com marcação positiva para células IR à INS (1150x).



**Figura 29 (A-D).** Fotomicrografias de células IR à glucagon: (A) Visão geral do pâncreas da espécie *D. capixaba*, com marcação positiva para células IR à GLU, na periferia da porção endócrina (seta) (300x). (B) Destaque para marcação total na ilhota (seta) da espécie *D. capixaba* para células IR à GLU (630x). (C) Visão geral do pâncreas da espécie *P. bilabiatum* com marcação positiva no centro da porção endócrina (seta) para células IR à GLU (300x). (D) Destaque para ilhota da espécie *P. bilabiatum* com marcação positiva para células IR à GLU, localizadas na periferia (seta) (630x).



**Figura 30 (A-D).** Fotomicrografias de células IR à colecistocinina: (A) Visão geral do pâncreas da espécie *D. capixaba*, com marcação positiva para células IR à CCK, na porção endócrina (\*) (300x). (B) Destaque para marcação positiva para células IR à CCK, localizadas na periferia da ilhota (seta) na espécie *D. capixaba* (1150x). (C) Visão geral do pâncreas da espécie *P. bilabiatum* com marcação positiva da porção endócrina (\*) para células IR à CCK (630x). (D) Destaque para ilhota da espécie *P. bilabiatum* com marcação positiva para células IR à CCK, localizadas na periferia (seta) (1150x).



**Figura 31 (A-B).** Fotomicrografias de **células IR à somatostatina**: **(A)** Destaque para marcação positiva para células IR à SOM, localizadas na periferia da ilhota (seta) na espécie *D. capixaba* (1150x). **(B)** Destaque para ilhota da espécie *P. bilabiatum* com marcação positiva para células IR à SOM, localizadas na periferia (1150x).

## 5 DISCUSSÃO

Semelhante às aves, o corpo dos morcegos é alimentado por altas taxas metabólicas, que podem aumentar até 20 vezes durante o voo (RACEY & SPEAKMAN, 1987). Entretanto, os morcegos na maioria das vezes se alimentam uma vez ao dia, precisando absorver uma grande quantidade de proteínas e/ou glicose em um curto intervalo de tempo (REIS *et al.*, 2007). O aproveitamento adequado dessa energia é em parte devido a modificações morfológicas na porção endócrina do pâncreas destes animais (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2017). Estudos apontam que em mamíferos de uma forma geral a porção endócrina do pâncreas constituem 1-2% da massa pancreática (LIAO & PORETSKY, 2014), contudo em morcegos essa taxa é elevada para 9,1% do volume total (MICHELMORE *et al.*, 1998). Contribuindo para eficiência no aproveitamento de energia.

Histologicamente o pâncreas das espécies estudadas foi similar ao de outros mamíferos (IKPEGBU *et al.*, 2013; MACHADO-SANTOS *et al.*, 2017), organizado em uma parte exócrina representada pelos acinos e ductos e uma parte endócrina composta pelas ilhotas pancreáticas. O pâncreas endócrino é funcionalmente separado do pâncreas exócrino. Enquanto o pâncreas exócrino é responsável pela secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes, o pâncreas endócrino regula a glicose e homeostase de nutrientes e metabolismo (LIAO & PORETSKY, 2014).

Quanto às ilhotas, estas são vistas como grupos arredondados de cordões de células, altamente vascularizados, imersos no tecido exócrino. Em morcegos esse formato é bastante variável, podendo apresentar desde um formato esférico ou elíptico até um formato irregular (MICHELMORE *et al.*, 1998; MACHADO-SANTOS *et al.*, 2013; MACHADO-SANTOS *et al.*, 2017), não havendo uma relação direta com o hábito alimentar e sim com as espécies estudadas. O mesmo foi observado em *D. capixaba*, *P. bilabiatum*, *C. vilosum* e *P. discolor*.

Todavia o mesmo não ocorre para a quantidade de ilhotas no parênquima pancreático. Machado-Santos *et al.* (2017) após ter analisado o pâncreas endócrino de

diferentes espécies de quirópteros, utilizando diferentes métodos morfológicos, afirma que há uma relação de aproximação entre a distribuição, disposição e proporção de células endócrinas das ilhotas pancreáticas e o tipo de dieta e/ou filogenia em morcegos.

A composição celular das ilhotas é bem diferenciada, podendo conter células beta que secretam insulina e amilina, células alfa que secretam glucagon, células delta que secretam somatostatina, células polipeptídicas pancreáticas que secretam o polipeptídio pancreático e células épsilon que secretam grelina (LIAO & PORETSKY, 2014). Nas espécies *D. capixaba* e *P. bilabiatum* além das células produtoras de insulina, glucagon e somatostatina, foram visualizadas células produtoras de colecistocinina.

Dentre os peptídeos investigados a insulina foi a que teve marcação mais intensa nas duas espécies estudadas (*D. capixaba* e *P. bilabiatum*), marcando toda a região da ilhota. O mesmo ocorreu para outras espécies de morcegos com hábitos alimentares diferentes, *R. aegyptiacus* (MICHELMORE *et al.*, 1998), *Diphylla ecaudata* Spix, 1823 (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2013), *A. geoffroyi* e *Pteronotus personatus* (Wagner, 1843) (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2017). Demonstrando que independente da dieta esse é tipo celular predominante nas ilhotas pancreáticas. Sabe-se que a insulina é secretada a uma taxa que depende em parte da concentração sanguínea de glicose. E que em momentos de estresse fisiológico (como jejum prolongado, hipoglicemia, hipovolemia), a manutenção dos níveis de glicose no sangue torna-se vitalmente importante (LIAO & PORETSKY, 2015).

Outro peptídeo bem distribuído em *D. capixaba* e *P. bilabiatum* foi o glucagon. Este foi visualizado nas periferias, mas também irradiado para o centro de cada ilhota. Em *R. aegyptiacus* (MICHELMORE *et al.*, 1998), *Heterocephalus glaber* Rüppell, 1842 (KRAMER & BUFFENSTEIN, 2004), *D. ecaudata* (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2013), *A. geoffroyi* e *P. personatus* (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2017), a marcação das células alfa também foram preferencialmente na periferia da ilhota. Esta forma de organização das células produtoras de glucagon não é normalmente observada em outros mamíferos (MICHELMORE *et al.*, 1998). Thorel *et al.* (2010) sugere que as células beta podem ser regeneradas a partir de células alfa, após o aumento da demanda metabólica ou da lesão (que leva à perda de células beta), revelando um grau de plasticidade das células pancreáticas previamente ignorado.

A acumulação de somatostatina nas células D em vários níveis dentro do trato gastrointestinal e pâncreas fornece uma base ideal para funções reguladoras em eventos digestivos, absorptivos e metabólicos. A somatostatina pode, por conseguinte, afetar as células localizadas nas proximidades das células D em alguns órgãos, ou ser liberada para a circulação, e assim, atuar como um hormônio endócrino (MORISSET, 2017). Em *D. capixaba* e *P. bilabiatum* as células produtoras de somatostatina foram visualizadas na periferia das ilhotas pancreáticas. Segundo Halban & Weir (1990) a somatostatina têm uma função parácrina na regulação da secreção da insulina e glucagon, o que justificaria a sua ocupação na região periférica da ilhota. Esse arranjo celular também foi visualizado em outras espécies de mamíferos (KRAMER & BUFFENSTEIN, 2004; MACHADO-SANTOS *et al.*, 2017).

Existe uma grande controvérsia sobre a marcação da CCK no pâncreas, possivelmente devido à diferença de espécies, procedimentos imuno-histoquímicos variados e a especificidade dos anticorpos utilizados (KOHTAROU *et al.*, 2015). Em diferentes estudos não foram avaliadas células produtoras de CCK no pâncreas de quirópteros (MICHELMORE *et al.*, 1998; MACHADO-SANTOS *et al.*, 2013; MACHADO-SANTOS *et al.*, 2017). Enquanto outros estudos imuno-histoquímicos do pâncreas documentaram a localização de receptores de CCK em células das ilhotas no

pâncreas de outras espécies de mamíferos (KARLSSON *et al.*, 1998; SCHWEIGER *et al.*, 2000; MORISSET *et al.*, 2003; KAGEYAMA *et al.*, 2005). Nesse estudo essa células foram visualizadas na periferia das ilhotas de *D. capixaba* e *P. bilabiatum*, sendo um importante achado para a literatura. Indicando que além da ação telócrina já conhecida na literatura (RODRIGUES *et al.*, 2005), a mesma pode estar agindo de forma parácrina sobre o pâncreas exócrino.

## 6 CONCLUSÃO

- Histologicamente o pâncreas das espécies estudadas foram semelhantes, sendo composto de uma parte exócrina e uma parte endócrina.
- Houve marcação das ilhotas pancreáticas para células produtoras de insulina, glucagon, somatostatina e colecistocinina nas espécies *Dryadonycteris capixaba* e *Pygoderma bilabiatum*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLMAN, H. & NILSSON, O. The gut as the largest endocrine organ of the body. **Annals of Oncology**, V. 12, p. 63-68, 2001.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Ed. Artmed, Porto Alegre, 4ª ed., 1584p., 2004.
- ARIMURA, A.; SATO, H.; DUPONT, A.; NISHI, N.; SCHALLY, A.V. Somatostatin: abundance of immunoreactive hormone in rat stomach and pancreas. **Science**, V.189, p. 1007-1009, 1975.
- ASHIHARA, N.; TADDEI, V.A.; HONDO, E.; KITAMURA, N.; PAI, V.D.; CAMPOS, J.; CHOLOQ, N.; YAMADA, J. An immunohistochemical study of gut endocrine cells in Nectarivorous and Frugi-nectarivorous Phyllostomid Bat (Chiroptera: *Anoura caudifer* and *Carollia perspicilata*). **Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, V. 4, p. 125-133, 1999.
- BANSIL, R.; TURNER, B.S. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. **Curr Opin Colloid**, V.11, p. 164–170, 2006.
- BUDDINGTON, R.K. & KROGDAHL, A. Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract. **Comparative Biochemistry and Physiology**, V.139, p. 261–271, 2004.
- CANT, J.P.; MCBRIDE, B.W.; CROOM, W.J. Jr. The regulation of intestinal metabolism and its impact on whole animal energetics. **Journal of Animal Science**, V.74, p. 2541–2553, 1996.
- CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, V. 46, p. 419-425, 2002.
- CAVIEDES-VIDAL, E.; McWHORTER, T.J.; LAVIN, S.R.; CHEDIACK, J.G.; TRACY, C.R.; KARASOV, W.H. The digestive adaptation of flying vertebrates: high intestinal paracellular absorption compensates for smaller guts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, V. 104, p. 19132-19137, 2007.
- CAVIEDES-VIDAL, E.; KARASOV, W.H.; CHEDIACK, J.G.; FASULO, V.; CRUZNETO, A.P.; OTANI, L. Paracellular absorption: a bat breaks the mammal paradigm. **Issue**, V. 1, p. 1-7, 2008.

- CECCARELLI, P.; PEDINI, V.; GARGIULO, M. Serotonin containing cells in the horse gastrointestinal tract. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, V. 24, p. 97-99, 1995.
- CHARLES-DOMINIQUE, P. 1986. Interrelations between frugivorous vertebrates and pioneer plants: *Cecropia*, birds and bats in French Guiana. In: Estrada, A. & Fleming, T.H. (Eds.), *Frugivores and seed dispersal*. W. Junk Publishers, Dordrecht, p.119-136.
- ÇINAR, K.; SENOL, N.; RUSTU, O. Immunohistochemical study on distribution of endocrine cells in gastrointestinal tract of flower fish (*Pseudophoxinus antalyae*). **World Journal of Gastroenterology**, V. 12. p. 6874-6878, 2006.
- D'ESTE, L.; BUFFA, R.; PELAGI, M.; SICCARDI, A.G.; RENDA, T. Immunohistochemical localization of chromogranin A and B in the endocrine cells of the alimentary tract of the green frog, *Rana esculenta*. **Cell and Tissue Research**, V. 277, p. 341-349, 1994.
- DIAMOND, J. Evolutionary design of intestinal nutrient absorption: enough but not too much. **News in Physiological Sciences**, V. 6, p. 92-96, 1991
- DÍAZ, M.M.; SOLARI, S.; AGUIRRE, L.F.; AGUIAR, L.M.S.; BARQUEZ, R.M. Clave de identificación de los murciélagos de Sudamérica. Publicación Especial N° 2, PCMA (Programa de Conservación de los Murciélagos de Argentina), 160 pp. 2016.
- DYCE, K.M.; SACK, W.O; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 6ª ed., p. 147-155, 2010.
- EISENTRAUT, M. Die ernahrung de fledermausen (Microchiroptera). **Zoologische Jahrbuecher Systematik**, V. 79, p. 14-117, 1950.
- FAKHRY, J. ;WANG J.; MARTINS, P.; FOTHERGILL, L. J.; HUNNE, B.; PRIEUR P.; SHULKES, A.; REHFELD, J. F.; CALLAGHAN, B.; FURNESS, J. B. Distribution and characterisation of cck containing enteroendocrine cells of the mouse small and large intestine. **Cell and Tissue Research**, V. 369, p. 245-253, 2017.
- FARIA, D. Reports on the diet and reproduction of the Ipanema fruit Bat, *Pygoderma bilabiatum* in a Brazilian forest fragment. **Chiroptera Neotropical**, V.3, p.65-66,1997.
- FENTON, M.B.; ACHARYA, L.; AUDET, D.; HICKEY, M.B.C.; MERRIMAN, C.; OBRIST, M.K.; SYME, D.M.; ADKINS, B. Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the Neotropics. **Biotropica** V. 24, p. 440-446, 1992.
- FERRI, D.; LIQUORI, G.E.; SCILLITANI, G. Morphological and histochemical variations of mucous and oxynticopeptic cells in the stomach of the seps, *Chalcides chalcides*. **Journal of Anatomy**, V. 194, p.71-77, 1999.
- FILHO, J.T.S.; FONSECA, C.C.; OLIVEIRA, M.G.A.; DONZELE, J.L.; MENIN, E. Determinação do Sistema Endócrino Difuso nos Intestinos de três Teleostei (Pisces) de Água Doce com Hábitos Alimentares Diferentes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, V.30, p.1403-1408, 2001.
- FLEMING, T.H. Plant-visit bats. **American Scientist**, V. 81, p. 460-467, 1993.
- FLEMING, T.H.; & SOSA, V. Effects of nectarivorous and frugivorous mammals on reproductive success of plants. **Journal of Mammalogy**, V.75, p. 845-851, 1994.
- FORMAN, G. L.; PHILLIPS, C. J.; ROUK, C. S. Alimentary tract. In: BAKER, R.J.; JONES JR., J.K.; CARTER, D. C., eds., *Biology of bats of new word family phyllostomatidae*, Part III. Spec.Publ. Texas Tech Univ., V. 16, p. 205-227, 1979.

- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica 1995-2000. Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Relatório Final. São Paulo, 46p. 2002.
- GADELHA-ALVES, R.; ROZENSZTRANCH, A.M.S.; ROCHA-BARBOSA, O. Comparative intestinal histomorphology of five species of Phyllostomid Bats (Phyllostomidae, Microchiroptera): ecomorphological relations with alimentary habits. **Internacional Journal of Morphology**, V. 26, p. 591-602, 2008.
- GANONG, W. F. **Fisiologia Médica**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 17<sup>a</sup> ed., 578 p., 1998.
- GARCIA, Q.S.; REZENDE, J.L.P.; AGUIAR, L.M.S. Seed dispersal by bats in a disturbed area of Southeastern Brazil. **Revista de Biologia. Tropical**, V. 48, p.125-128, 2000.
- GARDNER, A.L. Feeding Habits. **Special Publications of Museum Texas Tech University**, V. 13, p. 293-350, 1977.
- GILLETE D. D. Evolution of feeding strategies in bats. **Tebiwa**, V. 18, p. 39-48, 1975.
- GOLDSTEIN, M.B. & DAVIES, E.A. The three-dimensional architecture of the islets of Langerhans. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, V. 71, p.161–171, 1968.
- GORCHOV, D.L.; CORNEJO, F.; ASCORRA, C.; JARAMILLO, M. The role of seed dispersal in the natural regeneration of rain forest after strip-cutting in the Peruvian Amazon. **Vegetatio**, V. 107, p.339-349, 1993.
- GRUBE, D. & BOHN, R. The microanatomy of human islets of Langerhans, with special reference to somatostatin (D) cells. **Archivum histologicum Japonicum**, V 46, p.327–353, 1983.
- GUYTON, A.C. & HALL, J. E. **Fisiologia médica**. Ed Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 10<sup>a</sup> ed., 973 p. 2002.
- HALBAN, P. A. & WEIR, G. C. (1990). In “Principles and Practice of Embryology and Metabolism” (K. L. Becker, Ed.), pp. 1068–1073. Lippincott, Philadelphia.
- HABER, E. P.; CURI, R.; CARVALHO, C. R. O.; CARPINELLI, A. R. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, V. 45, p. 219-227, 2001.
- HUANG, X.G.; WU, X.B. Immunohistochemical study on gastrointestinal endocrine cells of four reptiles. **World Journal of Gastroenterology**, V.11, p. 5498–5505, 2005.
- IKPEGBU, E.; NLEBEDUM, U.C.; NNADOZIE, O.; AGBAKWURU, I.O. Pancreas of the adult African Giant Pouched Rat (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse - 1840): a microanatomical observation. **NeBIO** V. 4, p. 58-61, 2013.
- ISHIKAWA, K.; MATOBA, M.; TANAKA, H.; ONO, K. Anatomical study of the intestine of the insect-feeder bat, *Myotis frater kaguae*. **Journal of Anatomy**, V. 50, p.142-141, 1985.
- JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 12<sup>a</sup> ed., 538p., 2013.
- KAGEYAMA, H.; KITA, T.; HORIE, S.; TAKENOYA, F.; FUNAHASHI, H.; KATO, S.; HIRAYAMA, M.; LEE, E.Y.; SAKURAI, J.; INOUE, S.; SHIODA, S. Immunohistochemical analysis of cholecystokinin a receptor distribution in the rat pancreas. **Regulatory Peptides**, V.126, p.137-143, 2005.
- KARARLI, T.T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, V. 80, p.16-351, 1995.

- KARLSSON, S.; SUNDLER, F.; AHRÉN, B. CCK receptor subtype in insulin-producing cells: a combined functional and in situ hybridization study in rat islets and a rat insulinoma cell line. **Regulatory Peptides**, V.78, p.95-1103, 1998.
- KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à Patologia**. Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2<sup>a</sup> ed., 654p., 2004.
- KOHTAROU, K.; HIROMI, T.I.; MOTOKAZU, U.; KYOKO, M.; AKIHIRO, F.; MASAHIKO, W.; TOSHIHIKO, I. Cellular and subcellular localization of cholecystokinin (CCK)-1 receptors in the pancreas, gallbladder, and stomach of mice. **Histochemistry and Cell Biology**, V.143, p. 301-312, 2015.
- KÖNIG, H.E. & LIEBICH, H.G. **Anatomia dos animais domésticos**. Ed. Artmed, Porto Alegre, 4<sup>a</sup> ed.,787p., 2007.
- KRAMER, B. & BUFFENSTEIN, R. The pancreas of the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*): an ultrastructural and immunocytochemical study of the endocrine component of thermoneutral and cold acclimated animals. **General and Comparative Endocrinology**, V.139, p.206–214, 2004.
- KU, S.K.; LEE, H.S.; LEE, J. H. Immunohistochemical study on the endocrine cells in gut of the stomach less Teleost, *Zacco platypus* (Cyprinidae). Anatomia, Histologia, Embryologia. **Journal of Veterinary Medicine Series**, V. 33, p. 212-219, 2004.
- KUNZ, T. H.; TORREZ, E. B.; BAUER, D.; LOBOVA, T.; FLEMING, T. H. Ecosystem services provided by bats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, V. 1223, p. 1-38, 2011.
- LANGER, P. Lactation, weaning period, food quality and digestive tract differentiations in Eutheria. **Evolution**, V. 57, p. 1196-215, 2003.
- LAVIN, S.R.; KARASOV, W.H.; IVES, A.R.; MIDDLETON, K.M.; GARLAND, T. Morphometrics of the avian small intestine compared with that of nonflying mammals: a phylogenetic approach. **Physiological and Biochemical Zoology**, V. 81, p.526-50, 2008.
- LI, Y.; HAO, Y.; ZHU, J.; OWYANG, C. Serotonin released from intestinal enterochromaffin cells mediates luminal non-cholecystokinin-stimulated pancreatic secretion in rats. **Gastroenterology**, V. 118, p. 1197-1207, 2000.
- LIAO, E. P & PORETSKY, L. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. **Diabetes Mellitus: Associated Conditions**. V. 43, P. 1-330, 2014.
- MACHADO-SANTOS, C.; NASCIMENTO, A.A.; PERACCHI, A.L.; MIKALOUSKAS, J.S.; GOUVEIA, S.F.; ROCHA, P.A.; SALES, A. Distributions of the endocrine cells in the gastrointestinal tract of nectarivorous and sanguivorous bats: A comparative immunocytochemical study. **Tissue and Cell**, V 41, p. 222-229, 2009.
- MACHADO-SANTOS, C.; AQUINO, J.C.F.; MIKALAUKA, J.S.; ABIDU-FIGUEIREDO, M.; MENDES, R.M.M.; SALES, A. What difference exists in the pancreas of mammals with sanguivorous diet? A morphological, stereological and immunohistochemical study of the pancreatic islets of the hematophagous bat *Diphylla ecaudata*. **Regulatory Peptides**, V. 183, p. 62–68, 2013.
- MACHADO-SANTOS, C.; AQUINO, J.C.F.; ROCHA, P.A.; ABIDU-FIGUEIREDO, M.; BRITO-GITIRANA, L.; SALES, A. Influence of feeding habits in the endocrine pancreas of insectivore bat *Pteronotus personatus* and nectarivore bat *Anoura geoffroyi*: A comparative stereological and immunohistochemical study. **Tissue and Cell**, V. 49 p. 2017.

- MAKANYA, N.A. & MAINA, J.N. The morphology of the intestine of the insectivorous horseshoe bat (*Rhinolophus hildebrandti*, Peters): a scanning electron and light microscopic study. **African Journal of Ecology**, V. 32, p. 158–168, 1994.
- MEDELLIN, R. A. & GAONA, O. Seed dispersal bats and birds in forests and disturbed habitats of Chiapas, Mexico. **Biotropica**, V. 31, p.478-485, 1999.
- MEDELLÍN, R.A.; EQUIHUA, M.; AMIN, M.A. Bat diversity and abundance as indicators of disturbance in neotropical rainforests. **Conservation Biology**, V. 14, p.1666-1675, 2000.
- MELLO, R.; SILVA, C.M.G.; FONTE, F.P.; SILVA, D.L.F.; PEREIRA, J.A.; MARGARIDO, N.F. Avaliação do número de células calciformes nas criptas da mucosa colônica com e sem trânsito intestinal. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões**, V. 39, p. 139-145, 2012.
- MICHELMORE, A.J.; KEEGAN, D. J.; KRAMER, B. Immunocytochemical Identification of Endocrine Cells in the Pancreas of the Fruit Bat, *Rousettus aegyptiacus*. **General and Comparative Endocrinology** V.110, p.319–325, 1998.
- MIN, H. E.; KAI-YU, W.; YU, Z. Immunocytochemical Identification and Localization of Diffuse Neuroendocrine System (DNES) Cells in Gastrointestinal Tract of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). **Agricultural Sciences in China**, V. 8, p. 238-243, 2009.
- MORRISON, D.W. Influence of habitat on the foraging distance of the fruit bats, *Artibeus jamaicensis*. **Journal of Mammalogy**, V. 59, p.622-624, 1978.
- MORISSET, J. Somatostatin One of the Rare Multifunctional Inhibitors of Mammalian Species. **Pancreas** V. 46, p. 8–18, 2017.
- MORISSET, J.; JULIEN, S.; LAINÉ, J. Localization of cholecystokinin receptor subtypes in the endocrine pancreas. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, V. 51, p.1501-1513, 2003.
- MOTTA, P. Functional morphology of the feeding apparatus of ten species of Pacific butterfishes perciformes, Chaetodontidae: an ecomorphological approach. **Environmental Biology of Fishes**, V. 22, p.39-67, 1988.
- MO, J. Z. & WANG, C. D. Effects of the gut hormones on gastric emptying. **Biomedical Research-Tokyo**, V. 15, p. 127-131, 1994.
- NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. **The viscera of the domestic mammals**. Berlin: Ed. Verlag Paul Parey, Hamburg. 511p., 1973.
- NOGUEIRA, M. R. & PERACCHI, A. fig-seed predation by 2 species of *chiroderma*: discovery of a new feeding strategy in bats. **Journal of Mammalogy**, V. 84, p. 225–233, 2003.
- NOGUEIRA, M. R.; LIMA, I. P.; MORATELLI, R.; TAVARES, V.C.; GREGORIN, R.; PERACCHI, A. L. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. **Check List**, V.10, p. 808–821, 2014.
- OFUSORI, D. A.; CAXTON-MARTINS, E.A.; KOMOLAFE, O.O.; OLUYEMI, K. A.; ADEEYO, O.A.; AJAYI, S.A.; OLUWAYINKA, P. O.; ADELAKUN, E.A.; KEJI, S.T.; ADESANYA, O.A. A Comparative Study of the Ileum in Rat (*Rattus norvegicus*), Bat (*Eidolon helvum*) and Pangolin (*Manis tricuspis*) as Investigated Using Histological Method. **International Journal of Morphology**, V.26, p.137-141, 2008
- OKON, E. E. Functional anatomy of the alimentary canal in the fruit bat, *Eidolon helvum*, and the insect bat, *Tadarida nigeriae*. **Acta Zoologica**, V.58, p.83-93, 1977.

- PAKSUZ, E. P. The effect of hibernation on the morphology and histochemistry of the intestine of the greater mouse-eared bat, *Myotis myotis*. **Acta Histochemica**, V.116, p. 1480–1489, 2014.
- PAKSUZ, E. P. & PAKSUZ, S. The Morphology of the Intestine of the Greater Mouse-Eared Bat, *Myotis myotis* (Borkhausen, 1797). **Global Veterinaria**, V. 14, p. 686-692, 2015.
- PERACCHI, A.L.; NOGUEIRA, M.R.; LIMA, I.P. Novos achegos à lista dos quirópteros do município de Linhares, estado do Espírito Santo, sudeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera). **Chiroptera Neotropical**, V. 17, p. 842-852, 2011.
- PERACCHI, A. L.; LIMA, I. P.; REIS, N. R.; NOGUEIRA, M. R.; ORTÊNCIO FILHO, H. Ordem Chiroptera. In: Reis, N. R. Peracchi, A. L.; Pedro, W. A.; Lima, I. P (Eds.). **Mamíferos do Brasil**. 2 ed. Londrina: Nelio R. dos Reis. p.155-234, 2011.
- PÉREZ-BARBERÍA, F.J.; GORDON, I.J.; ILLIUS, A.W. Phylogenetic analysis of stomach adaptation in digestive strategies in African ruminants. **Oecologia**, V.129, p. 498-508, 2001.
- PINKY; MITTAL, S.; MITTAL, A.K. Glycoproteins in the epithelium of lips and associated structures of a hill stream fish Garra lamta (*Cyprinidae*, *Cyprinoformes*): a histochemical investigation. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, V. 37, p.101–13, 2008.
- POLAK, J. M. & BLOOM, S. R. Distribution of newly discovered regulatory peptides. **Biomedical Research**, V. 4, p. 7-23, 1983.
- POLAK, J.M.; BISHOP, A.E.; BARBOSA, A.J.A.; BLOOM, S.R. Hormônios gastrointestinais. In: DANI R AND CASTRO LP (Eds), Gastroenterologia Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, Brasil, p. 1446-1465. 1993.
- RACEY, P.A. & SPEAKMAN, J.R. The energy costs of pregnancy and lactation in heterothermic bats. **Symposia of the Zoological Society of London**, V.57 p.107–125, 1987.
- REHFELD, J. F. The new biology of gastrointestinal hormones. **Physiological Reviews**, V. 78, p. 1087-1102, 1998.
- REIS, N. R. PERACCHI, A. L.; SHIBATTA, O. A.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. Sobre os morcegos brasileiros. In: Reis, N. R. Peracchi, A. L.; Pedro, W. A.; Lima, I. P., **Morcegos do Brasil**, Londrina, Nélio dos Reis. p.61-98, 2007.
- ROBIN, H.A. Recherches anatomique sur les mamifères de l'ordre des chiropteres. **Annales Des Sciences Naturelles comprenant la zoologie**, V. 12, p.1-180, 1881.
- RODRIGUES, S.S.; FONSECA, C. C.; NEVES, M. T. D. Células endócrinas do sistema gastroenteropancreático: Conceitos, distribuição, secreções, ação e controle. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, V. 8, p. 171-180, 2005.
- SANTOS, C.M. (2007) Estudo imuno-histoquímico das células Endócrinas do tubo gastrintestinal de Morcegos (mammalia, chiroptera). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil, 60p.
- SANTOS, C.M.; NASCIMENTO, A. A.; PERACCHI, A. L. ; DIAS, D. ; RIBEIRO, T.P.; SALES, A. A Comparative Immunocytochemical Study of Endocrine Cells in the Digestive Tract of two Frugivorous Bats: *Artibeus cinerius* and *Sturnira lilium*. **Acta Histochemica**, V. 110, p. 134-142, 2008a.
- SANTOS, C.M.; NASCIMENTO, A.A.; PERACCHI, A.L.; SALES, A.; MIKALOUSKAS, J.S. ; GOUVEIA, S.F.. Immunocytochemical study of

- gastrintestinal endocrine cells in insectivorous bats (Mammalia: Chiroptera). **Brazilian Journal of Biology**, V. 68, p. 663-669, 2008b.
- SAZIMA, M.; FABIÁN, M.E.; SAZIMA, I. Polinização de *Luehea speciosa* (Tiliaceae) por *Glossophaga soricina* (Chiroptera, Phyllostomidae). **Revista Brasileira de Biologia**, V. 42, p.505-513, 1982.
- SCHUMACHER, U.; DUKU, M.; KATOH, M.; JÖRNS, J.; KRAUSE, W.J. Histochemical similarities of mucins produced by Brunner's glands and pyloric glands: a comparative study. **The Anatomical Record**, V.278A, p.540-50, 2004.
- SCHWEIGER, M.; ERHARD, M.H.; AMSELGRUBER, W.M. Cell-specific localization of the cholecystokininA receptor in the porcine pancreas. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, V. 29, p.357-361, 2000.
- SCILLITANI, G.; ZIZZA, S.; LIQUORI, G.E.; FERRI, D. Lectin histochemistry of gastrointestinal glycoconjugates in the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum* (Schreber, 1774). **Acta Histochemica**, V.109, p.347-57, 2007.
- SELIM, A. & NAHAS, E.E. Comparative histological studies on the intestinal wall between the prenatal, the postnatal and the adult of the two species of Egyptian bats. Frugivorous *Rousettus aegyptiacus* and insectivorous *Taphozous nudiventris*. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, V. 70, p. 25–32, 2015.
- SIMMONS, N. B. Order Chiroptera. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Eds.). Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. 3.ed. v.1. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005, p.312-529.
- SIPINSKI, E.A. & REIS, N.R. Dados ecológicos dos quirópteros da Reserva Volta Velha, Itapoá, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, V.12, p.519-528, 1995.
- SLACK, J.M.W. Developmental biology of the pancreas. **Development**, V.121, p.1569–80, 1995
- SMITH, E. L. *et al.* **Bioquímica de mamíferos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 620 p.
- STROBEL, S.; ENCARNAÇÃO, J.A.; BECKER, N.I.; TRENCZEK, T.E. Histological and histochemical analysis of the gastrointestinal tract of the common pipistrelle bat (*Pipistrellus pipistrellus*). **European Journal of Histochemistry**, V.59, p. 107-115, 2015.
- STUDIER, E.H.; WISNIEWSKI, S.J.; FELDMAN, A.T.; DAPSON, R.W.; BOYD, B. C.; WILSON, D.E. Kidney structure in neotropical bats. **Journal of Mammalogy**, V. 64, p. 445–452, 1983.
- TADDEI, V. A. Morcegos: Algumas Considerações Sistemáticas e Biológicas. **Boletim Técnico, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral**, Campinas, São Paulo, V.172, p. 1-31, 1983.
- TAVOLONI, P. (2005) Diversidade e frugivoria de morcegos filostomídeos (Chiroptera, Phyllostomidae) em habitats secundários e plantios de *Pinus* spp., no município de Anhembi – SP. Dissertação de Mestrado, no Programa da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 83 p.
- TEDMAN, R.A.& HALL, L.S. The morphology of the gastrointestinal tract and food transit time in the fruit bats *Pteropus alecto* and *P. poliocephalus* (Megachiroptera). **Australian Journal of Zoology**, V. 33, p.625–640, 1985.
- TEELING, C.E.; SPRINGER S.M.; MADSEN, O.; BATES, P.; O'BRIEN, J.S.; MURPHY, J.W. A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and the Fossil Record. **Science**, V. 307, p. 580-584, 2005.

- TELSER, A.G.; YOUNG, J.K.; BALDWIN, K.M. **Histologia**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. 2007.
- THOREL, F.; NEPOTE, T.V.; AVRIL, I.; KOHNO, K.; DESGRAZ, R.; CHERA, S.; HERRERA, P.L. Conversion of adult pancreatic  $\alpha$ -cells to  $\beta$ -cells after extreme  $\beta$ -cell loss. **Nature**, V. 464, p.1149–1154, 2010.
- UIEDA, W. & VASCONCELLOS-NETO, J. Dispersão de *Solanum spp* (Solanaceae) por morcegos, na região de Manaus, Amazonas, **Revista Brasileira de Zoologia**, V. 2, p. 449-458, 1985.
- VANNER, S. Myenteric neurons activate submucosal vasodilator neurons in guinea pig ileum. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, V. 279, p. 380-387, 2000.
- VOIGT, C. C. & KINGSTON T. **Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World**. Ed. Springer, 601p., 2016.
- WHITTAKER, T.J. & JONES, S.H. The role of frugivorous bats and birds in the rebuilding of a tropical forest ecosystem, Krakatau, Indonesia. **Journal of Biogeography**, V.21, p.245-258, 1994.
- YAMADA, J.; CAMPOS, V.J.M.; KITAMURA, N.; PACHECO, A.C.; YAMASHITA, T.; CARAMASCHI, V. Immunohistochemical study of gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrinal cells in the vampire bat (*Desmodus rotundus*). **Gergebaurs morphologisches Jahrbuch**, V. 130, p. 845-856, 1984.
- YAMADA, J.; BAOREN, L.; DENG, Z.; KITAMURA, N.; YAMASHITA, T.; PHILLIPS, J. An immunocytochesmical study of gut endocrine cells in two species of insectivorous vespertilinid bat (Chiroptera: *Pipistrellus abramus* and *Plecotus auritus sacrimontis*). **Gegenbaurs Morphologisches Jahrbuch**, V.134, p. 79-91, 1988.