



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

GUILHERME DURANTE CRUZ

Biologia funcional e estrutural relacionada a homeostase glicêmica em morcegos (Mammalia, Chiroptera): uma abordagem pautada nos diferentes hábitos alimentares

Florianópolis

Julho – 2021

GUILHERME DURANTE CRUZ

Biologia funcional e estrutural relacionada a homeostase glicêmica em morcegos (Mammalia, Chiroptera): uma abordagem pautada nos diferentes hábitos alimentares

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação
Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção
do título de Doutor em Ciências Fisiológicas
Orientador: Prof. Dr. Alex Rafacho
Coorientador: Prof. Dr. Sergio Luiz Althoff

Florianópolis

Julho – 2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cruz, Guilherme Durante
Biologia funcional e estrutural relacionada a
homeostase glicêmica em morcegos (Mammalia, Chiroptera):
uma abordagem pautada nos diferentes hábitos alimentares /
Guilherme Durante Cruz ; orientador, Alex Rafacho,
coorientador, Sergio Luiz Althoff, 2021.
134 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas,
Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciências Fisiológicas. 2. Morcegos. 3. Fisiologia
comparada. 4. Microscopia eletrônica. 5.
Imunofluorescência. I. Rafacho, Alex. II. Althoff, Sergio
Luiz. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas. IV. Título.

GUILHERME DURANTE CRUZ

**Biologia funcional e estrutural relacionada a homeostase glicêmica em morcegos
(Mammalia, Chiroptera): uma abordagem pautada nos diferentes hábitos alimentares**

O presente trabalho em nível de [mestrado/ doutorado] foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes
Instituição: Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga
Instituição: Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. Gustavo Jorge dos Santos
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de **Doutor em Fisiologia**

Profa. Dra. Fernanda Barbosa Lima
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Alex Rafacho
Orientador

Florianópolis

Julho – 2021

Este trabalho é dedicado aos meus aos meus queridos pais, namorada e filha

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Luiz Cesar e Eliza sem os quais essa longa e difícil caminhada não seria possível. Obrigado pelo apoio e esforço que dedicaram ao longo de todos esses anos para que eu alcançasse os meus objetivos. Jamais eu teria conseguido sem vocês. Jamais.

Agradeço a minha filha Julia que esteve sempre comigo em todos os momentos de alegria ou de dificuldade, sem distinção. Obrigado pelas conversas, pelo carinho e pelo amor. Amo você.

Agradeço ao meu Orientador Prof. Alex, por ter confiado em mim, por ter aberto as portas da pós-graduação e ter sido tão paciente comigo ao longo de todos esses anos. Obrigado por todos os ensinamentos. Sua contribuição como profissional e também como pessoa eu jamais esquecerei. Um exemplo que seguirei como modelo de vida.

Agradeço ao Prof. Sergio Althoff por ter aceito ser meu Coorientador e por todas as suas contribuições no início do projeto sem as quais nada disso teria sido possível. Também agradeço a todos os biólogos que me apoiaram nas capturas dos animais no início do projeto.

Agradeço demais a Profa. Luciana Ouriques, ao LabCev e ao LCME por todo apoio, ensinamentos e suporte durante os processos de microscopia eletrônica. Agradeço a Profa. Marielle Freitas pela recepção e suporte nas capturas e exames laboratoriais dos morcegos nectarívoros.

Agradeço a minha companheira Dayane por ter me dado a paz e tranquilidade durante este período em que muitas vezes fui ausente. Obrigado pelo seu amor. Amo você.

Agradeço aos professores Sebastião Taboga, Luiz Carlos Navegantes, Gustavo Jorge e Fernanda Barbosa por ajudar a aprimorar esse trabalho enquanto banca examinadora.

Agradeço a todos os meus amigos do grupo LIDoC que fizeram parte desta história. Foram anos de amizade e aprendizado que jamais serão esquecidos.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

E por fim agradeço muito ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas e a Universidade Federal de Santa Catarina, por terem aberto as portas para meu ingresso na pesquisa.

Resumo

O hábito alimentar de uma espécie pode ser determinante para o seu metabolismo geral. Muitos morcegos são conhecidos por fazerem uso restrito de determinadas dietas, e isso envolveu adaptações em sua estrutura corpórea, acumuladas ao longo de milhares de anos, incluindo os órgãos metabólicos (i.e., pâncreas, fígado, musculatura esquelética, intestinos, etc). Assim, buscamos nos morcegos uma forma de avaliar comparativamente essa relação de órgãos envolvidos na homeostase glicêmica com determinados padrões alimentares. Mais especificamente, objetivamos avaliar parâmetros metabólicos e estruturais relacionados a homeostase glicêmica em quatro espécies de morcegos com diferentes hábitos alimentares (frugívoro, hematófago, insetívoro e nectarívoro). Nossa hipótese é que as espécies que se restrinjam mais a dietas proteicas (i.e., hematófagos e insetívoros) possuirão ilhotas pancreáticas com uma contribuição menor das células beta e maior das células alfa; fígado e músculo com maiores reservas de glicogênio e mais aptos a disponibilidade energética e intestinos com arquitetura mais complexa. Da mesma forma nas espécies com dieta rica em carboidratos (i.e., frugívoros e nectarívoros) esperamos diferentes adaptações funcionais e estruturais em relação as espécies com dieta rica em proteína. Morcegos das espécies *Artibeus lituratus* e *A. fimbriatus* (frugívoros), n=15; *Desmodus rotundus* (hematófago), n=9; *Molossus molossus* (insetívoro), n=6 e *Anoura caudifer* (nectarívoro), n=5, foram capturados na natureza e pernoitaram em laboratório antes de serem estudados. Foram analisados glicemia, perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos, LDL, HDL, VLDL), sensibilidade a insulina e tolerância a glicose, conteúdo de glicogênio hepático e muscular, comprimento intestinal, massa de órgãos e relações com a massa corpórea, exames histológicos de microscopia de luz, imunofluorescência bem como microscopia de transmissão e de varredura. Nossos principais resultados revelaram que morcegos em dietas ricas em proteína apresentam equivalências metabólicas e estruturais entre si e diferenças em relação aos morcegos com dietas predominantes em carboidratos. Houve diferenças complexas no perfil lipídico e no teor de glicogênio hepático entre as espécies, em particular na espécie insetívora, que apresentou glicogênio tipo beta (β) (lenta mobilização) em fígado e músculo e em grande abundância. A espécie hematófaga foi a única com valores de glicogênio muscular superior ao hepático. Em relação as estruturas intestinais foram observadas evidências indiretas de atividade paracelular intestinal nas espécies com dieta rica em carboidrato, bem como maiores vilosidades e microvilosidades. Na espécie insetívora foi observado co-localização de grânulos endócrinos em células acinares pancreáticas. A relação de massa absoluta de ilhota (mg) foi maior no hematófago. A relação de massa absoluta normalizada pelo peso corpóreo (mg/g p.c.), massa relativa de ilhotas (%), bem como a densidade foram maiores na espécie nectarívora. Os dois grupos com dietas ricas em carboidratos e os insetívoros, na sequência, obtiveram as maiores massas de células beta. O hematófago foi o único grupo com massa absoluta de células alfa mais elevado que a massa de células beta. Assim, concluímos que morcegos com dieta predominante em proteínas possuem maiores reservas de glicogênio, embora questionável no hematófago, e ilhotas pancreática onde as células alfa apresentam uma preponderância maior do que nas espécies com predomínio em dieta rica em carboidrato, sendo estas espécies munidas de maior massa de células beta e um intestino com maior complexidade luminal. Além da dieta, outros fatores como o modo de forrageamento certamente influenciaram em adaptações metabólicas e morfológicas únicas dentro de cada grupo, ainda que estes sejam tão próximos filogeneticamente.

Palavras-chave: Morcegos 1. Pâncreas 2. Metabolismo 3.

Abstract

The feeding habits of a species can be determinant for its general metabolism. Many bats are known to make limited use of certain diets, and this involved adaptations in their body structure, accumulated over thousands of years, including metabolic organs (i.e., pancreas, liver, skeletal musculature, intestines, etc.). Thus, we seek in bats a way to comparatively evaluate this relation of organs involved in glycemic homeostasis with certain dietary patterns. More specifically, we aim to evaluate metabolic and structural parameters related to glycemic homeostasis in four species of bats with different eating habits (frugivore, hematophagous, insectivore and nectarivore). Our hypothesis is that species that are more restricted to protein diets (i.e., hematophagous and insectivorous) will have pancreatic islets with a smaller contribution from beta cells (β) and a greater contribution from alpha cells (α); liver and muscle with higher glycogen reserves and more apt to energy availability and intestines with more complex architecture. Likewise in species with a high carbohydrate diet (i.e., frugivores and nectarivores) we expect different functional and structural adaptations in relation to species with a high protein diet. Bats of the species *Artibeus lituratus* and *A. fimbriatus* (frugivores), $n = 15$; *Desmodus rotundus* (hematophagous), $n = 9$; *Molossus molossus* (insectivore), $n = 6$ and *Anoura caudifer* (nectarivore), $n = 5$, were captured in the wild and spent the night in the laboratory before being studied. Blood glucose, lipid profile (total cholesterol, triglycerides, LDL, HDL, VLDL), insulin sensitivity and glucose tolerance, hepatic and muscular glycogen content, intestinal length, organ mass and relationships with body mass were analyzed. histological studies of light microscopy, immunofluorescence as well as transmission and scanning microscopy. Our main results revealed that bats on high protein diets have metabolic and structural equivalences and differences from bats with predominant carbohydrate diets. There were complex differences in the lipid profile and in the hepatic glycogen content between species, particularly in the insectivorous species, which presented beta (β) glycogen (slow mobilization) in liver and muscle and in great abundance. The hematophagous species was the only one with muscle glycogen values higher than the liver. Regarding intestinal structures, indirect evidence of intestinal paracellular activity was observed in species with a high carbohydrate diet, as well as greater villi and microvilli. In the insectivorous species, co-localization of endocrine granules was observed in pancreatic acinar cells. The ratio of absolute islet mass (mg) was higher in the hematophagous. The ratio of absolute mass normalized by body weight (mg / g p.c.), islet relative mass (%), as well as density were higher in the nectarivorous species. The two groups with diets rich in carbohydrates and the insectivores, in sequence, obtained the largest masses of beta cells. The hematophagus was the only group with an absolute alpha cell mass higher than the beta cell mass. Thus, we conclude that bats with a predominant diet in proteins have higher glycogen reserves, although questionable in the hematophagous, and pancreatic islets where alpha cells have a greater preponderance than in species with a predominance in a diet rich in carbohydrates, these species being provided with greater mass of beta cells and an intestine with greater luminal complexity. In addition to the diet, other factors such as the foraging mode certainly influenced unique metabolic and morphological adaptations within each group, even though they are so close phylogenetically.

Keywords: Bats 1. Pancreas 2. Metabolism 3.

Lista de Figuras

1. Número de espécies de morcegos no Brasil por família.....	12
2. <i>Artibeus lituratus</i>	16
3. <i>Desmodus rotundus</i>	18
4. <i>Molossus molossus</i>	19
5. <i>Anoura caudifer</i>	20
6. Glicemia basal.....	44
7. Sensibilidade a insulina e tolerância a glicose – <i>Artibeus</i> sp.....	45
8. Perfil lipídico.....	47
9. Glicogênios.....	48
10. Massa de órgãos/peso corporal e comprimento intestinal.....	50
11. Pâncreas – Histologia.....	53
12. Histomorfometria do pâncreas endócrino.....	54
13. Pâncreas – Imunofluorescência – 20x.....	56
14. Pâncreas – Imunofluorescência – 40x.....	56
15. Fígado - Histologia.....	58
16. Intestino proximal - Histologia.....	59
17. Musculo esquelético – Histologia.....	60
18. Fígado - MET.....	62
19. Pâncreas - MET.....	63
20. Intestino proximal - MET.....	65
21. Musculo esquelético - MET.....	66
22. Intestino proximal transversal – MEV.....	67
23. Intestino proximal longitudinal – MEV.....	67

Lista de Tabelas

1.Perfil celular em ilhotas pancreáticas e hábito alimentar.....	32
2.Características alimentares dos grupos no experimento.....	43
3.Resumo dos principais resultados bioquímicos e de massa de órgãos.....	68
4.Resumo dos principais resultados morfológicos (MET).....	68
5.Resumo dos principais resultados em ilhotas pancreáticas.....	68

Sumário

1 - Introdução a ordem Chiroptera	14
Figura 1: Número de espécies de morcegos no Brasil por família	16
2 - Distribuição geográfica e biologia	19
2.1 – <i>Artibeus lituratus</i> e <i>Artibeus fimbriatus</i>	19
Figura 2: <i>Artibeus lituratus</i>	19
2.2 – <i>Desmodus rotundus</i>	20
Figura 3: <i>Desmodus rotundus</i>	21
2.3 – <i>Molossus molossus</i>	21
Figura 4: <i>Molossus molossus</i>	22
2.4 – <i>Anoura caudifer</i>	22
Figura 5: <i>Anoura caudifer</i>	23
3 – Biologia funcional e estrutural	23
3.1 – Morcegos frugívoros	25
3.2 – Morcegos hematófagos	28
3.3 – Morcegos insetívoros	29
3.4 – Morcegos nectarívoros	30
4. Pâncreas endócrino	31
Tabela 1. Descrição do perfil celular em ilhotas pancreáticas de acordo com o hábito alimentar	33
5 - Objetivos	33
5.1 – Geral	33
5.2 – Específicos	33
6 - Materiais e Métodos	34
6.1 – Autorizações	34
6.2 - Coletas dos animais e Áreas de estudo	34
6.3 – Manutenção e Delineamento Experimental	36
6.4 - Teste de tolerância a insulina intraperitoneal (ipITT) – <i>Artibeus</i> sp	37
6.5 - Teste de tolerância a glicose intraperitoneal (ipGTT) – <i>Artibeus</i> sp	37
6.6 – Massa de órgãos	38
6.7 - Testes bioquímicos plasmáticos	38
6.8 – Conteúdo de Glicogênios muscular e hepático	38
6.9 – Comprimento intestinal	39
6.10 – Histologia e Imunofluorescência	39
6.11 - Microscopia Eletrônica de transmissão (MET)	40

6.12 - Microscopia Eletrônica de varredura (MEV).....	41
6.13 – Análises Estatísticas	41
7 – Resultados	41
7.1 – Glicemia e Perfil lipídico.....	42
Figura 6: Gráfico -	42
7.2 – Sensibilidade a insulina e tolerância a glicose – <i>Artibeus</i> sp (frugívoros)	42
Figura 7: Gráficos - ITTip (0,33 IU/kg p.c.) e GTTip (3g/kg p.c.): Gênero <i>Artibeus</i> (frugívoros):.....	43
Figura 8: Gráficos - Perfil Lipídico	45
7.3 – Glicogênio hepático e muscular	45
Figura 9: Gráficos - Glicogênios	46
7.4 – Massa de órgãos/peso corporal e comprimento intestinal	47
Figura 10: Gráficos - Massa de órgãos/peso corporal e comprimento intestinal.....	48
7.5 – Morfologia e histomorfometria do pâncreas endócrino.....	49
Figura 11: Pâncreas – Histologia.....	51
Figura 12: Histomorfometria do pâncreas endócrino	52
Figura 13: Pâncreas – Imunofluorescência - 20x	54
Figura 14: Pâncreas – Imunofluorescência - 40x	54
7.6 – Análises morfológicas: Histologia (HE e PAS), MET e MEV	55
7.6.1 – Histologia comparada: Fígado, Intestino e Musculo esquelético	55
Figura 15: Fígado – Histologia.....	56
Figura 16: Intestino proximal – Histologia.....	57
Figura 17: Musculo esquelético - Histologia.....	58
7.6.2 - Microscopia Eletrônica por Transmissão (MET) comparada	58
Figura 18: Fígado – MET	59
Figura 19: Pâncreas - MET.....	60
Figura 20: Intestino proximal - MET	62
Figura 21: Musculo esquelético – MET	63
7.6.3 - Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV) comparada	63
Figura 22: Intestino proximal transversal – MEV:.....	64
Figura 23: Intestino proximal longitudinal - MEV:.....	64
7.7 – Sumarização dos Resultados obtidos.....	64
Tabela 3: Resumo dos principais resultados bioquímicos e de massa de órgãos.	64
Tabela 4: Resumo dos principais resultados morfológicos (MET).	65
Tabela 5: Resumo dos principais resultados em ilhotas pancreáticas.	65
8 – Discussão.....	67

8.1 - Perfil lipídico.....	67
8.2 - Glicogênio hepático e muscular	71
8.3 - Análises histológicas, imunofluorescências, comprimento intestinal, MET e MEV	74
8.4 – Pâncreas e ilhotas pancreáticas: Massas, densidades e percentual celular de alfa e beta	77
9 – Conclusão	80
10 - Dificuldades Encontradas.....	82
11 – Referências bibliográficas	83
12 – Anexos.....	94

1 - Introdução a ordem Chiroptera

O termo ‘morcego’ é derivado do latim *muris* (rato) e *coecos* (cego). Em grego é *verpertilio* e em latim é *nycteris*, que são nomes relacionados ao hábito de vida noturno. Os morcegos pertencem a ordem Chiroptera, palavra derivada do grego *cheir* (mão) e *pteron* (asa) (Reis, *et al.*, 2006). Os quirópteros estão entre os grupos de mamíferos mais diversificados do mundo, com 18 famílias, 202 gêneros e mais de 1.150 espécies vindo a compor aproximadamente 25% de todas espécies conhecidas de mamíferos, que totalizam cerca de 5416 espécies (Nogueira *et al.*, 2014). O Brasil abriga cerca de 15% da diversidade de morcegos do planeta (Wilson e Reeder, 2005).

Os Quirópteras são divididos em duas subordens, os Megaquirópteras e os Microquirópteras. A hipótese mais atual é a de monofiletismo do grupo, baseada em dados morfológicos (Simmons, 1998; Van Den Bussche *et al.*, 1998) e informações genéticas (Murphy *et al.*, 2001). Sabe-se também que os morcegos são oriundos do clado Scrotifera, um clado de mamíferos placentários, assim como também pertencem a esse clado os animais da ordem Carnivora, Pholidota, Perissodactyla e Cetartiodactyla (Murphy *et al.*, 2001).

O registro fóssil mais antigo provém de alguns dentes descobertos na França, do período Paleoceno, que apresentam caracteres tanto de morcegos quanto de mamíferos insetívoros (Eulipotyphla, o grupo dos musaranhos), permitindo relacionar filogeneticamente esses dois grupos (Murphy *et al.*, 2001). O fóssil completo mais antigo de um verdadeiro morcego foi encontrado em rochas Eocênicas (60 milhões de anos) nos Estados Unidos e este fóssil, denominado *Icaronycteris index*, não apresenta nenhuma característica intermediária, sendo um Microchiroptera de hábitos insetívoros. A morfologia craniana dessa espécie supracitada também indica capacidade para a ecolocalização. Outro fóssil encontrado na Alemanha a 50 milhões de anos, o *Palaeochiropterys tupaiodon*, também foi descrito com um morcego semelhante aos atuais (Speakman, 2001, Fenton, 1992, Simmons e Geisler, 1998). Por fim, estima-se que os morcegos surgiram há cerca de 80 milhões de anos sem que tivesse havido mudanças expressivas em sua arquitetura corpórea até então (Fullard, 1987).

Os morcegos evoluíram em paralelo ao surgimento das plantas com flores, que trouxe como consequência a abundância de insetos. Após milhões de anos alimentando-se de insetos, o processo de seleção natural culminou no desenvolvimento de membranas, o que possibilitou aos ancestrais dos morcegos planarem (Reis *et al.*, 2006). A partir daí, eles se tornaram caçadores aéreos muito bem-sucedidos. Assim, menos energia passou a ser dispendida com o voo planado se equiparado ao hábito da caminhada ou da corrida. Ainda, isso deu uma vantagem enorme ao poderem evitar contatos com predadores terrestres (Altringham, 1996).

Os Megachiroptera não ocorrem no Brasil e estão representados por apenas uma família, Pteropodidae, com 42 gêneros e 186 espécies distribuídas pelo Velho Mundo, na região tropical da África, Índia, sudeste da Ásia e Austrália (Reis *et al.*, 2007). Utilizam a visão para se orientar e, por isso, têm grandes olhos. Além disso, têm as orelhas pequenas e sem o tragus (pedaço da pele situada ventralmente ao canal auditivo), não apresentando ornamentações faciais e nasais, pois não apresentam ecolocalização (apenas uma espécie dessa família apresenta esse sistema) (Reis *et al.* 2006). A cauda e o uropatágio (membrana entre membros posteriores e corpo) estão ausentes, as vértebras cervicais não são modificadas e a cabeça fica virada para a região ventral quando estão empoleirados. Não hibernam e nem entram em torpor. As diferentes espécies possuem inúmeras estratégias reprodutivas, desde estacionalmente (sazonalmente) monoestra até poliestria assazonal (Taddei, 1976).

Os Microchiroptera estão compostos por 17 famílias, 157 gêneros e 930 espécies no Novo e Velho Mundo, não ocorrendo apenas nas regiões polares. Como é observado na **Figura 1**, no Brasil são conhecidas 9 famílias, 68 gêneros e 178 espécies (Nogueira *et al.*, 2014, Reis *et al.*, 2007; Wilson e Reeder, 2005). Entretanto, segundo levantamento da Sociedade Brasileira de Estudo de Quirópteros (SBEQ), complementando a referência principal de acordo com as últimas mudanças, a lista oficial de morcegos brasileiros inclui agora seria de 181 espécies em 68 gêneros e 9 famílias onde a lista de registros duvidosos mudou para 9 espécies e a lista de registros errôneos aumentou para 15 espécies (Garbino *et al.*, 2020).

No Brasil é a segunda ordem em riqueza (diversidade) de espécies, superada somente pela ordem Rodentia, com 243 espécies. As famílias brasileiras, com seus respectivos números de espécies são: Emballonuridae (17); Phyllostomidae (92); Mormoopidae (3); Noctilionidae (2); Furipteridae (1); Thyropteridae (5); Natalidae (1); Molossidae (29) e Vespertilionidae (28) (Nogueira *et al.*, 2014). Eles habitam todo o território nacional, ocorrendo na Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, semiárido nordestino, pampas, na região litorânea e em áreas urbanas.

Numero de espécies de morcegos no Brasil por família

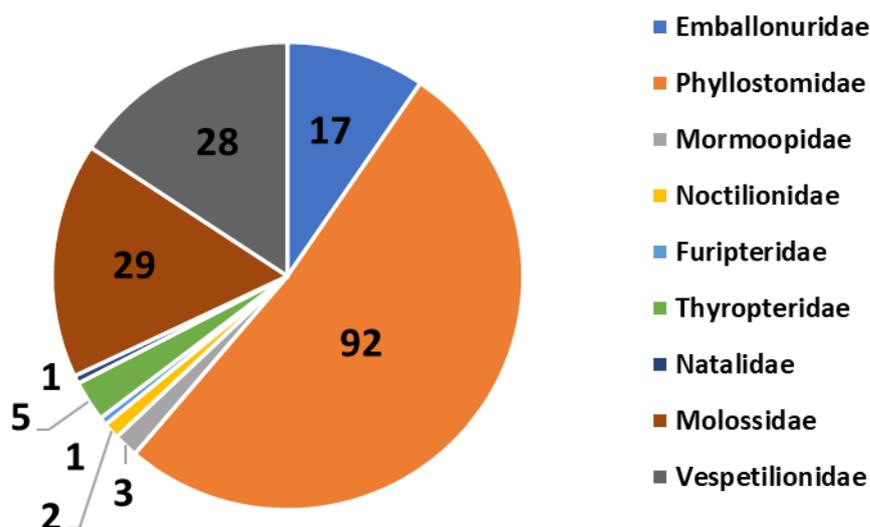


Figura 1: Número de espécies de morcegos no Brasil por família. Fonte: Nogueira *et. al.*, 2014

Os Microchiroptera apresentam tamanho médio, mas ocorrem espécies pequenas como *Furipterus horrens* com peso médio de 3 g e 15 cm de envergadura (Nowak, 1944). Outras espécies são relativamente maiores, como o filostomídeo *Vampyrum spectrum*, que chega a 190 g e 70 cm de envergadura (Emmons e Feer, 1990). Os morcegos possuem alta longevidade se comparados a mamíferos de mesmo porte: enquanto um rato de 40 g vive até 2 anos, um morcego vampiro por exemplo (também com 40 g) vive até 20 anos na natureza (Bernard *et al.*, 2005). Como animais noturnos, têm poucos cones na retina, entretanto não são cegos, e embora todas as famílias brasileiras usem a ecolocalização, alguns frugívoros maiores também se orientam pela visão (Reis *et al.*, 2006). Assim, utilizam primariamente o sistema de ecolocalização, apresentando olhos pequenos, orelhas grandes, tragus bem desenvolvido e as ornamentações nasais e faciais frequentemente estão presentes. Durante a ecolocalização, eles transmitem sons de alta frequência pela boca e/ou pelo nariz, que são refletidos por superfícies do ambiente indicando a direção e a distância relativa dos objetos (Fenton *et al.*, 1992).

Em média, os morcegos têm 1 filhote por ano, mas podem ter 2 ou 3 e, raramente, 4. Os Noctilionidae e Phyllostomidae geralmente são poliestros enquanto que os Vespertilionidae e Mollossidae são monoestros. A gestação dura desde 44 dias a 11 meses, dependendo da espécie, e o nascimento dos filhotes se dá em época de maior oferta de alimentos (Reis e Peracchi, 1981). Os morcegos possuem o hábito de cuidados maternos que pode se estender por até aproximadamente 3 meses de vida. Observações obtidas no contexto da Amazônia indicam que os insetívoros deixam seus

filhotes nos lugares de repouso enquanto os frugívoros procuram carregá-los em voo enquanto for possível (Reis, 1981).

Segundo Greenhall e Paradiso (1968), para interromper o jejum de 10 horas, o período de atividades é mais intenso nas duas primeiras horas ao escurecer e nas duas horas antes do amanhecer. Em climas frios, os morcegos costumam hibernar ou migrar, podendo se deslocar por mais de 1700 km (Altringham, 1996). No Brasil, embora se desloquem, pouco se sabe sobre os casos de migração por longas distâncias. Quando dormem durante o dia, muitas espécies ficam em estado de semi-torpor, com redução da temperatura do corpo. Não há registros de hibernação de morcegos em território brasileiro (Greenhall e Paradiso, 1968).

Além de suas claras vantagens ecológicas, essa evolução do voo trouxe custos energéticos elevados para os morcegos. Os morcegos em voo aumentam a taxa metabólica em 15 vezes em relação ao repouso (Austad e Fischer, 1991; Harrison e Roberts, 2000; Munshi-South e Wilkinson, 2010; Szewczak, 1997), mas compensam esse custo energético por meio de adaptações. Por exemplo, em países tropicais, muitas espécies entram em torpor ou semitorpor (principalmente) durante o repouso diurno, diminuindo de forma considerável o metabolismo diário (Speakman & Thomas, 2003).

Além disso, os períodos de atividade (forrageamento) são relativamente breves e quase que invariavelmente a noite. Algumas espécies de morcegos que se alimentam de recursos não disponíveis ao longo do ano, como insetos, lidam com a disponibilidade reduzida de presas por meio da hibernação no inverno, principalmente em países ou regiões mais frias de clima temperado. Nesse sentido, os morcegos também podem depender regularmente de suas reservas endógenas e, as vezes, por períodos muito longos. A esse respeito, os morcegos são excepcionais dentre os mamíferos na medida em que suas capacidades de armazenamento energético variam drasticamente desde hora em hora a períodos sazonais (Kronfeld-Schor *et al.*, 2000; Kunz *et al.*, 1998; Weber e Findlay, 1970). Ao que indica, os morcegos desenvolveram mecanismos que lhes permitem fazer uso eficiente de suas reservas endógenas, mantendo assim o equilíbrio energético em períodos de escassez de alimentos.

E em relação a dieta, os morcegos constituem um dos grupos de mamíferos mais diversificados. Praticamente todos os hábitos alimentares são observados entre os morcegos, excetuando-se os saprófagos. A subordem *Microchiroptera*, a única encontrada no Brasil, é dividida em 7 grandes grupos: Insetívoros, Carnívoros, Piscívoros, Nectarívoros, Frugívoros, Onívoros e Hematófagos (Reis, *et al.*, 2008; De Lima *et al.*, 2008). Ainda, alguns morcegos se alimentam de outros, embora não sejam canibais, pois capturam espécies diferentes da sua (Fenton *et al.*, 1992).

Entre os **Microchiroptera**, os carnívoros são os maiores, alimentando-se de rãs, lagartixas, aves, pequenos roedores e de outros pequenos morcegos. Quanto aos morcegos piscívoros, são

encontradas duas espécies no Brasil (*Noctilio leporinus* e *Noctilio albiventris*) que alimentando-se de peixes em regiões litorâneas ou continentais em todas as regiões do Brasil (Reis *et al.*, 2006). Os morcegos onívoros alimentam-se de insetos, néctar, pólen, frutas e pequenos invertebrados (Reis, *et al.*, 2008).

Os **morcegos frugívoros**, no Brasil, pertencem exclusivamente a família Phyllostomidae e ocasionalmente alimentam-se de insetos. Os frugívoros desempenham uma função importante na dispersão de sementes por apresentarem hábito de forrageio intenso, buscando alimento por distâncias razoáveis (Galindo-González, 1998). Se alimentam principalmente de frutos de plantas das famílias *Solanaceae*, *Piperaceae* e *Moraceae* e apresentam um número grande de dentes, com molares e pré-molares largos.

Os **morcegos hematófagos** alimentam-se exclusivamente de sangue de mamíferos ou de aves e, para isso, utilizam incisivos especializados para fazer um pequeno corte nos animais. Um anticoagulante é liberado com a saliva e estes sorvem o sangue que flui para fora. Uma vez saciados, excretam uma parte líquida do sangue graças aos rins especializados eliminando assim o excesso de peso, para retornarem aos seus abrigos. Existem apenas três gêneros e três espécies de morcegos hematófagos no mundo e todos são neotropicais. São eles: *Desmodus rotundus* (alimentam-se de sangue de mamíferos e aves (raramente)), *Diphylla ecaudata* (alimentam-se preferencialmente de sangue de aves) e *Diaemus youngii* (alimentam-se de sangue de aves e mamíferos) possuindo grandes e afilados dentes incisivos (Brass, 1994).

Os **morcegos insetívoros**, tais como os Vespertilionidae, obtêm a maioria dos insetos dos quais se alimentam em voo, ora acima da copa das árvores (Molossidae), ora abaixo (Embalonuridae e Vespertilionidae). São os mais numerosos, pela própria abundância de recursos. Os insetos, escorpiões, aranhas e outros pequenos artrópodes podem fazer parte de sua dieta. Existem relatos de morcegos que sobem a cerca de 3 mil metros de altura para alcançar voos de certas mariposas (Reis, *et al.*, 2006). Os morcegos contribuem para regular a abundância (ecossistema) de insetos com algumas espécies se alimentando de quantidades correspondentes a uma vez e meia o seu peso em uma única noite (Goodwin e Greenhall, 1961). Alguns Phyllostomidae podem capturar até 500 insetos por hora (Griffin *et al.*, 1960).

Os **morcegos nectarívoros** se alimentam de pólen e néctar de flores. Entretanto, em épocas de escassez estes morcegos também podem se alimentar de pequenos insetos devido aos poucos e diminutos dentes (Willig *et al.*, 1993).

A partir daqui abordaremos as espécies que representam 4 nichos baseados em seus perfis alimentares.

2 - Distribuição geográfica e biologia

2.1 – *Artibeus lituratus* e *Artibeus fimbriatus*

Os morcegos frugívoros *A. lituratus* (Figura 2) e *A. fimbriatus* pertencem a família Phyllostomidae, são espécies morfologicamente convergentes em diversos aspectos e foram confundidas durante muito tempo ao longo de suas áreas de ocorrências (Handley 1989).



Figura 2: *Artibeus lituratus*. Fonte do próprio autor, Guilherme Durante – UFSC, 2018

O *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) pode ser encontrado em todos os biomas brasileiros, sendo uma espécie dispersora de sementes e formadora de florestas muito importante. Essa espécie forma pequenas colônias (8 indivíduos) ou grandes (superior a 30 morcegos), habitando tanto árvores copadas, como cavernas, frestas entre rochas, ocos de árvores, telhados (Esbérard *et al.* 2006), ou em folhas de palmeiras, as quais são cortadas com os dentes (Zortéa e Chiarello 1994). Vive tanto em áreas conservadas quanto em cidades (Sazima *et al.* 1998). O *Artibeus lituratus* é uma espécie predominantemente frugívora, entretanto, quando há escassez de frutos, alimentam-se também de insetos como besouros, recursos florais e até mesmo de algumas folhas (Zortéa e Chiarello, 1994).

A espécie *A. lituratus* forma agrupamentos poligênicos e seu período reprodutivo varia geograficamente Wilson (1979). No Brasil, essa espécie apresenta um padrão de poliestria bimodal com um pico de fevereiro a março e outro de outubro a novembro (Bredt *et al.*, 1996).

A espécie *Artibeus fimbriatus* (Gray, 1838) é endêmica na América do Sul, com ocorrência no Brasil, Paraguai e Argentina (Barquez *et al.*, 1999; Simmons, 2020). No Brasil, só não há registro da espécie na região norte. Ocorre em áreas florestais, especialmente da Mata Atlântica, ocorrendo raramente em cidades. Alimenta-se primariamente de frutos, embora insetos e recursos florais possam também compor sua alimentação em períodos de escassez. Um estudo da sua dieta revelou o consumo mais frequente de frutos de Cecropiaceae, Moraceae, além de Solanaceae, Piperaceae e Curcubitaceae (Passos *et al.*, 2003). Dados da floresta atlântica indicam um padrão de poliestria bimodal para a espécie, com dois nascimentos por período reprodutivo (Fazzolari-Correa, 1995).

2.2 – *Desmodus rotundus*

O **morcego hematófago** *Desmodus rotundus* (Geoffrey, 1810) (**Figura 3**) pertence a família Phyllostomidae com registros revelando que no Brasil a espécie ocorre de norte a sul (Peracchi *et al.*, 2006). É uma espécie estritamente hematófaga (Gardner, 1977a) e seu hábito alimentar exige grande capacidade integrativa do cérebro, sendo que o neocórtex e o cerebelo são mais desenvolvidos que em outras espécies de morcegos (Bernard, 2005). Preferem o sangue de mamíferos de grande porte e a introdução de animais domésticos como cavalos, bovinos e suínos têm aumentado o número de indivíduos nos últimos anos em áreas onde há atividade humana. Raramente também se alimentam de sangue de aves. (Altringham, 1996).

Esta espécie se alimenta de sangue a partir dos 4 meses de idade, não conseguindo sobreviver mais de três dias sem se alimentar (Freitas *et al.*, 2003). A dentição é bem distinta de outros morcegos, já que seus dentes incisivos são maiores, afilados e projetados para frente. Isto permite que o animal retire primeiramente pequenos pedaços de pele e tecido das presas, para obter seu alimento (Greenhall *et al.*, 1983), o qual apresenta alta concentração de proteína e baixa concentração de gorduras e carboidratos (Mcfarland e Wimsatt, 1969). A espécie *Desmodus rotundus* geralmente dispensa o forrageio se comparado a outros morcegos, sendo seu deslocamento entre 3 a 8 km ao redor do abrigo (Fleming *et al.*, 1972; Crespo *et al.*, 1972; Greenhall *et al.*, 1983). Não há indícios de migrações estacionais, hibernação ou estivação (Uieda, 1993; Greenhall *et al.*, 1983).



Figura 3: *Desmodus rotundus*. Fonte do próprio autor, Guilherme Durante – UFSC, 2019

Desmodus rotundus é considerada uma espécie polimérica, sem um período definido de reprodução (Taddei *et al.*, 1976; Alencar *et al.*, 1994), onde a poliestria assazonal maximiza o sucesso reprodutivo da espécie. No segundo mês de vida, o filhote já recebe alimento regurgitado pela mãe e a acompanha até os 4 meses, tornando-se independente logo em seguida (Lord *et al.*, 1998).

2.3 – *Molossus molossus*

O **morcego insetívoro** *Molossus molossus* (Pallas, 1776) (**Figura 4**) pertence a família Molossidae e é encontrada na Flórida (EUA), México, América Central e Caribe, Colômbia, Equador, Venezuela, Suriname, Peru, Brasil, Paraguai, Uruguai e norte da Argentina (González, 1989; Koopman, 1993; Barquez *et al.*, 1999). Segundo Marinho-Filho e Sazima (1998), no Brasil, a espécie está presente em todos os biomas.



Figura 4: *Molossus molossus*. Fonte do próprio autor, Guilherme Durante – UFSC, 2019

São exclusivamente insetívoros e as fêmeas apresentam 2 períodos reprodutivos por ano na estação úmida gerando apenas 1 filhote por gestação (Reis, *et al.* 2006). Estes morcegos são encontrados em áreas urbanas ocupando forros de residências ou outras construções e em áreas não urbanizadas, ocupando ocos de árvores. Observações realizadas tanto no nordeste quanto no sul do Brasil parecem indicar que a espécie não realiza migrações (Fabian e Marques, 1989). Diferentemente dos Phyllostomidae, estes apresentam cauda livre além do uropatágio.

2.4 – *Anoura caudifer*

O morcego nectarívoro *Anoura caudifer* (É. Geoffroy, 1818) (**Figura 5**) pertence a família Phyllostomidae e já foi registrada em todas as regiões do território brasileiro. Esta espécie se alimenta principalmente do néctar de uma grande variedade de plantas (Sazima *et al.*, 1998), podendo esporadicamente incluir frutos e insetos em sua dieta (Teixeira & Peracchi, 1996). Embora seja uma espécie predominantemente nectarívora, pode visitar flores sem secreção de néctar, com o objetivo de apreensão de insetos atraídos pelo odor dessas flores (Willig *et al.*, 1993).



Figura 5: *Anoura caudifer*. Fonte: Prof. Dr. Sergio Luiz Althoff, acervo pessoal

Os dentes incisivos, podem estar deslocados lateralmente ou mesmo ausentes (no caso dos inferiores), deixando mais espaço para a passagem da língua durante a tomada de néctar. O lábio inferior possui um sulco mediano profundo e a língua é longa e altamente extensível, podendo alcançar um comprimento equivalente ao do próprio corpo (Winter & Von Helversen, 2003). Durante a visita as flores os glossófagos frequentemente empregam o voo pairado, configurando uma das convergências observadas em relação aos beija-flores. Ainda, fazem uso intensivo da ecolocalização durante o forrageio, mas a visão e a olfação também têm papel importante (Von Helversen et al., 2000).

Os dados disponíveis para o Brasil sugerem um padrão poliétrico sazonal para essa espécie, com nascimentos ocorrendo durante a época chuvosa (Taddei 1976; Zortéa, 2003).

3 – Biologia funcional e estrutural

O tipo de dieta de um animal pode modular as diferentes vias metabólicas, de tal forma que, no geral, o padrão metabólico do estado alimentado é distinto quando se ingere dieta rica em carboidrato ou rica em proteína (Tirone, *et al.*, 2001). Além disso, o estado nutricional também influencia o metabolismo de glicose sendo que a glicogênese é a principal via metabólica da homeostase glicêmica durante o estado alimentado, principalmente por meio da ação da insulina. Por outro lado, durante o jejum, a gliconeogênese e a glicogenólise são as vias metabólicas mais importantes, mediante principalmente a ação do glucagon (Beardsall *et al.*, 2006). É importante salientar que o metabolismo lipídico e proteico também participa, indiretamente, do metabolismo da glicose envolvendo os seguintes processos metabólicos: lipogênese/lipólise, proteogênese/proteólise bem como a cetogênese (Yeo *et al.*, 2007).

Ressalta-se que a maior parte dos animais com dietas ricas em proteína lidam melhor com a privação alimentar devido a maior atividade gliconeogênica presente até mesmo no período absorptivo e se estendendo em maior magnitude durante o jejum (Beardsall K. *et al.*, 2006). De qualquer forma, independentemente do tipo de dieta ingerida, os aminoácidos provenientes das proteínas corporais e os lipídeos (ácidos graxos livres e glicerol) sustentam a gliconeogênese e a beta-oxidação que são processos metabólicos fundamentais para a manutenção da glicemia durante o jejum (Tirone, *et al.*, 2001). Além das reservas lipídicas e proteicas, que também tem origem a partir da dieta, o organismo também possui reservas de carboidratos na forma de glicogênio, que ao ser hidrolisado em glicose, fornece um substrato para a produção de ATP além de ser o único substrato energético utilizado na ausência de oxigênio (Beardsall K. *et al.*, 2006).

O glicogênio é um polímero muito grande que consiste apenas em glicose (homoglicano), principalmente na junção alfa 1,4 glicosídica a qual os complexos enzimáticos, bem como os cofatores para agregação e dissociação de outras unidades de glicose, estão ligados. A forma esferóide do glicogênio é otimizada para armazenamento compacto com economia de espaço e possibilidade rápida para as enzimas acessarem a macromolécula para modificação.

Os grânulos de armazenamento de glicogênio são vistos no citoplasma de muitas células. Eles sempre têm bordas irregulares e não são limitados por quaisquer membranas. Para visualização microscópica de luz do glicogênio, recomenda-se a coloração de carmim de acordo com Best (coloração vermelha de áreas citoplasmáticas que contêm glicogênio) ou a coloração PAS que, no entanto, também tingem outros carboidratos em vermelho. Os seguintes tipos diferentes de grânulos de glicogênio podem ser diferenciados: Grânulo de alfa-glicogênio e Grânulo de beta-glicogênio.

Grânulo de alfa-glicogênio (*alpha granulum glycogeni*) é uma agregação semelhante a uma roseta de 5 a mais de 40 partículas únicas de glicogênio com diâmetros resultantes de 90 e até mais de 200 nm. Grânulo de beta-glicogênio esférico muito menor (*beta granulum*) se assemelha a um único ribossomo (diâmetro em seções de cerca de 15-20 nm), mas é um pouco menos denso em elétrons. Os diâmetros dos grânulos beta são cerca de 20 a 40, na maioria dos casos cerca de 30 nm. Enquanto os grânulos alfa são mais comumente vistos em hepatócitos, onde são o correlato morfológico para o armazenamento de curto prazo de grandes quantidades de glicose durante as fases anabólicas os grânulos beta são típicos para células do músculo esquelético ou cardíaco, que também podem apresentar alguns grânulos alfa

3.1 – Morcegos frugívoros

Os morcegos frugívoros apresentam demanda energética elevada por causa do alto custo energético do voo. Os carboidratos são boas fontes energéticas visto que são rapidamente digeridos e absorvidos. Downs e col. (2011) trabalhando com a espécie *Epomophorus wahlbergi* observaram que ao fornecer glicose e sacarose em diferentes concentrações, os animais nos grupos que ingeriram as menores concentrações apresentaram o maior aumento sérico de glicose e sacarose. Entretanto, todos os grupos apresentaram incremento energético total equiparável, sugerindo que independentemente do carboidrato ou da concentração ingerida houve uma elevada eficiência na assimilação de glicose e sacarose pelos morcegos.

Algumas evidências apontam que os pequenos morcegos e pequenas aves fazem uso de nutrientes recém adquiridos como fonte de energia para o voo, em vez de substratos endógenos, como fontes lipídicas ou glicogênio (Downs *et al.*, 2011). Amitai, e col. (2010), em estudo com a espécie *Rousettus aegyptiacus*, concluíram que morcegos frugívoros de médio a grande porte, independentemente do seu tamanho, utilizam principalmente os açúcares providos pela dieta para subsidiar o voo. Assim, tanto em repouso quanto durante o voo, os morcegos utilizam substratos recém-ingridos.

Melo e col. (2012) compararam o armazenamento das reservas energéticas do morcego frugívoro da espécie *Artibeus lituratus* em duas áreas florestais com diferentes graus de conservação. Os autores observaram que as reservas lipídicas eram inferiores nos tecidos analisados (músculo das patas posteriores, músculo peitoral, tecido adiposo e carcaça) dos morcegos coletados em região mais urbanizada, concluindo que a ação humana sobre os ambientes afeta o armazenamento de reservas energéticas corporais lipídicas de machos dessa espécie.

Mqokeli e col. (2012) investigaram como o organismo do morcego frugívoro *Epomophorus wahlbergi* regula a glicemia para evitar os efeitos negativos associados a hiperglicemia, visto que estes têm uma alta ingestão de açúcar em um curto período de tempo. A conclusão foi que a espécie apresenta rápida elevação da glicose sérica durante e após alimentação e em níveis relativamente maiores se comparado a outros mamíferos. Entretanto, esta observação não foi tipificada como uma hiperglicemia e nem mesmo deletéria para a espécie, haja vista que é a biologia natural da espécie.

Sabendo-se que uma elevada quantidade de glicose é absorvida em um curto período de tempo, Protzek, *et al.*, 2010 investigaram a espécie frugívora *Artibeus lituratus* para entender como se dá a homeostase glicêmica mesmo após períodos de jejum de 12 e 24 horas. Os autores observaram que as concentrações de glicose sanguínea se elevam de aproximadamente 68 mg/dL para 117 mg/dL 30

minutos após uma sobrecarga de 3 g/Kg de peso corpóreo de glicose, retornando aos valores basais após 90 minutos, sugerindo uma boa tolerância a glicose para a espécie.

Pinheiro e col. (2006), constataram que em morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* ocorre grande redução das concentrações plasmáticas de glicose após 48 h em jejum, podendo, contudo, permanecer estável por até 6 dias. Quantidades relativamente elevadas de glicogênio hepático e muscular foram constatados nesta espécie frugívora, bem como elevada presença de lactato plasmático após 24 horas de jejum, que sugere aproveitamento de substrato muscular para gliconeogênese e produção de glicose. Assim, a capacidade de armazenamento de glicogênio muscular e hepático nesta espécie parece ser fundamental para a manutenção da glicemia durante períodos curtos de jejum (até 48 horas). Em situações de jejum mais prolongadas a gliconeogênese hepática parece ser fundamental para a manutenção da glicemia (Pinheiro *et al.*, 2006; Ben-Hamo *et al.*, 2012).

Shen e col. (2012) demonstraram que a proteína transportadora de glicose 4 (GLUT4) codificada pelo gene *Slc2a4*, desempenha um papel crítico na captação de glicose pelo músculo esquelético e conseqüentemente, na homeostase da glicose. Ainda, Tracy e col. (2007), hipotetizaram que a absorção intestinal de compostos solúveis em água que não são ativamente transportados seria extensa nesses morcegos e diminuiria com o aumento da massa molecular de acordo com a absorção paracelular. Como previsto, este estudo revelou que a biodisponibilidade declinou com o aumento da massa molecular e foi significativamente maior em morcegos da espécie frugívora *Rousettus aegyptiacus*, do que foi relatado para ratos e outros mamíferos. Além disso, a absorção fracionada de 3OMD-glicose (glicose com afinidade ao transportador de glicose, mas que pode ser também absorvida paracelularmente) foi a mais elevada, enquanto que a absorção de compostos inertes ou de elevada massa como L-ramanose e celobiose (massa =342Da) respectivamente foram menores, ainda que muito maiores quando comparadas as taxas de absorção de outros mamíferos. Assim, concluíram que estes morcegos dependem mais da absorção intestinal paracelular passiva do que mamíferos não voadores.

Em estudo anterior, Keegan e col. (1977), demonstraram que a absorção intestinal de glicose por morcegos frugívoros *Rousettus aegyptiacus* é muito eficiente e já postulavam que essa rápida absorção intestinal de glicose se daria por meio de espaços intercelulares (via paracelular) no epitélio intestinal. Estas interpretações foram obtidas em resposta a administração de solução de glicose e frutose por meio de um cateter direcionado ao estômago, seguida da avaliação das concentrações de glicose e frutose na circulação e nos compartimentos gastrointestinais ao longo de 30 minutos.

Os aspectos ultraestruturais dos espaços intercelulares entre os enterócitos foi documentada por Makanya *et al.*, 2001, onde relataram que no morcego frugívoro *Epomophorus wahlbergi* são

relativamente grandes, consistentes com a absorção paracelular. Eles notaram que as membranas celulares laterais possuíam modificações incluindo elaborados processos citoplasmáticos interdigitantes, longos e tortuosos que aumentariam significativamente a área de superfície. Demonstraram também uma abundância de mitocôndrias no citosol adjacente as membranas laterais, que permitiria maior capacidade para o transporte de sódio ou nutrientes para espaços intercelulares em morcegos frugívoros (Makanya *et al.*, 2001). Nessa linha, há evidência de que esse fenótipo celular geraria maior gradiente osmótico impulsionando a absorção paracelular (Pappenheimer e Reiss, 1987).

Há algumas evidências de que os morcegos têm uma proporção maior de área vilosa intestinal em relação a área de superfície intestinal nominal quando comparada a mamíferos não-voadores. Makanya e col. (1997) hipotetizaram que a maior área de superfície vilosa em morcegos em comparação com mamíferos não-voadores é devido a um maior número de enterócitos com um aumento correspondente no número de espaços intercelulares explicando em parte a absorção paracelular relativamente elevada em *R. aegyptiacus* (frugívoro). Ainda, Makanya e col. (1997) demonstraram que as microvilosidades no intestino delgado destes morcegos são muito longas e delgadas quando comparadas com a do rato. Esta morfologia resulta na superfície de absorção por unidade de área no morcego sendo 3 vezes maior do que no rato.

Morcegos frugívoros como *Artibeus lituratus* são capazes de ingerir diariamente dietas de alta densidade energética chegando a consumir uma massa alimentar semelhante a seu próprio peso corporal. Por isso, nestas espécies supõe-se que a digestão é muito eficiente e acelerada, implicando em adaptações morfofisiológicas gastrointestinais e pancreáticas relevantes (Craik, J.D., *et al.*, 2000). Tal fato é resultado de um aparato intestinal mais curto do que o de outros mamíferos não voadores de mesmo peso.

Por meio de um estudo retrospectivo e comparativo, Michelmore e col. 1998, verificaram em uma espécie de morcego frugívoro (*Rousettus aegyptiacus*) com dieta rica em carboidratos que 9% do volume pancreático era composto por tecido endócrino. A contribuição das células alfa e delta não está completamente esclarecida, mas as células beta compunham 51% das células que compõem as ilhotas pancreáticas (Michelmore, A.J. *et al.*, 1998). Nesta espécie, as células alfa (31%) foram encontradas preferencialmente na região periférica, mas irradiando-se de áreas centrais da ilhota. As células beta (51%) distribuem-se de forma mais difusa, mas menos periféricas. As células delta (9%) foram notadas de forma difusa, mas preferencialmente centrais, assim como as células produtoras de polipeptídeo pancreático (PP), com surpreendentes 17%, distribuídas também mais em região central (Michelmore *et al.*, 1998). Neste estudo, o padrão de distribuição das células alfa foi diferente da grande maioria dos mamíferos porque se irradiam centralmente ao invés de compor um ‘anel’ periférico (Michelmore

et al., 1998). No mesmo sentido, o percentual de células PP foi muito acima do esperado ao contrário do que ocorre em outras espécies onde as células PP são consideradas raras (Brereton, M.F *et al.*, 2015).

3.2 – Morcegos hematófagos

Em morcegos hematófagos foi demonstrado em *D. rotundus* que períodos curtos de jejum (24 h) estão associados a valores glicêmicos reduzidos, mas ainda compatíveis com a sobrevivência (Freitas *et al.*, 2003). Ainda, após as 24 h de jejum os conteúdos de lipídeos e proteínas no fígado e em tecido muscular permanecem inalterados, enquanto o conteúdo de glicogênio hepático e muscular diminuem assim como a glicemia. Entretanto, em situações mais prolongadas de jejum, a glicemia declina acentuadamente seguido de morte após 48-72 h (Freitas *et al.*, 2003). Esta espécie hematófaga (com alimentação predominantemente proteica - sangue bovino contendo 93,1% de proteínas), tem capacidade limitada de armazenamento energético em tecidos (glicogênio, lipídeos e proteínas) e baixa capacidade de mobilização destes substratos, principalmente proteínas.

Botion e col. (1992) afirmam que estes morcegos em geral quando não comem, não conseguem sobreviver por mais de 3 dias de jejum, não mantendo níveis adequados de glicose no sangue, com seus estoques hepáticos de glicogênio sendo pelo menos 40% menores do que os de outras espécies de mamíferos.

Ben-Hamo e col. (2012) concluíram que estes animais são ineficientes na mobilização energética a partir de estoques lipídicos ou proteicos durante o jejum e que, portanto, o limitado armazenamento de glicogênio hepático é prontamente utilizado.

Outros estudos, entretanto, demonstram que mamíferos com dietas predominantes em proteínas resistem mais tempo ao jejum prolongado (Beardsall K. *et al.*, 2006). Por exemplo, em estudo com gatos (*Felis catus*) (de dieta predominantemente proteica) e ratos (onívoros com dieta contendo alto teor de proteico) foram observados comportamentos metabólicos comuns, sem alteração da homeostase glicêmica ao longo de 3 dias de jejum, com aumento da capacidade gliconeogênica e com diminuição da reserva de glicogênio hepático (Kettelhut *et al.*, 1980).

Essas observações também se reproduzem em certa medida na raposa do ártico (*Alopex lagopus*) bem como em leões e tigres (todos carnívoros), sendo a gliconeogênese a principal via envolvida na manutenção da glicemia destes animais durante o jejum (Fowler, 1986, Opazo *et al.*, 2004). No geral, inúmeros estudos comprovam que mamíferos da ordem carnívora como por exemplo Felidae, Mustelidae e Ursidae com dietas ricas em proteínas suportam melhor o jejum prolongado que mamíferos com dietas ricas em carboidratos.

Voltando aos morcegos, e com relação a insulinemia, foi demonstrado que morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus*, quando alimentados, apresentam valores de insulina plasmática 3 vezes menor do que em ratos alimentados com dieta padrão (contendo 14% de proteína) e 2,3 vezes menor do que em ratos alimentados com dieta hiperproteica (contendo 50% de proteínas) (Freitas *et al.* 2003). A secreção de insulina obtida a partir de fragmentos de pâncreas deste morcego hematófago foi menor em comparação a outras espécies, embora o aminoácido leucina favoreça algum aumento na secreção de insulina, assim como em outros mamíferos. E no teste de tolerância a glicose (GTT) a espécie hematófaga em questão não respondeu adequadamente, não alcançando níveis normoglicêmicos, mesmo após 4 horas da administração (Freitas *et al.* 2013). Assim, são animais que aparentam menor manejo da glicose, ou seja, menor utilização da glicose, o que é condizente, visto que hematófagos apresentam dieta rica em proteína e pobre em carboidratos.

Gadella-Alves e col. (2008) demonstraram a partir de um estudo histomorfométrico com intestinos de morcegos que *Desmodus rotundus* possui vilosidades curtas em comparação a morcegos habituados a outras dietas, apresentando vilosidades mais largas, mas com ápices mais agudos além escassas células caliciformes em epitélio de revestimento.

Nestes morcegos, o tecido pancreático endócrino perfaz aproximadamente 1,6% da massa do pâncreas e as células beta correspondem a aproximadamente 34% das células que compõem a ilhota pancreática (Freitas, *et al.*, 2013). Assim como em roedores, as células beta se distribuem preferencialmente no centro da ilhota (Freitas *et al.* 2013; Protzek, *et al.*, 2010).

Em outro estudo, outra espécie hematófaga *Diphylla ecaudata* apresentou 4% de tecido endócrino no pâncreas (Machado-Santos *et al.*, 2013), com distribuição celular semelhante a observada na espécie frugívora *Rousettus aegyptiacus*. Os resultados para o hematófago *D. ecaudata* revelam ainda 55% para células beta; 16% para células alfa e 14% para células delta, sem avaliação para as células PP (Machado-Santos *et al.*, 2013).

3.3 – Morcegos insetívoros

No planeta, aproximadamente 70% de todas as espécies de morcegos são insetívoras (Neuweiler, 2000), e eles provavelmente possuem a melhor resiliência entre os quirópteros frente aos jejuns prolongados. Freitas e col (2010) observaram que em *Molossus molossus* os valores de glicemia após 48 h de jejum diminuem drasticamente em fêmeas, enquanto em machos se mantém constante. Os valores de ácidos graxos circulantes são similares em ambos os sexos. Fêmeas alimentadas apresentaram maior conteúdo de glicogênio no fígado, maior conteúdo de proteína no músculo peitoral e maior conteúdo de lipídeo nos músculos de membros anteriores e posteriores (em comparação com

machos). Acredita-se que esses morcegos insetívoros mantenham as concentrações normais de glicose no sangue nas primeiras 48 h de jejum pela gliconeogênese provida pelo lactato (Freitas *et al.*, 2010). Essa menor glicemia de jejum observada em fêmeas não parece ser resultado de menor mobilização lipídica e proteica muscular (Freitas *et al.*, 2010).

Pasksuz e col (2015) avaliaram o trato intestinal do morcego insetívoro *Myotis myotis* por meio macroscópico e estudos de microscopia de luz. Macroscopicamente, o trato gastrointestinal de *M. myotis* é curto e convoluto, sem ceco ou apêndice. Histologicamente, a superfície luminal é coberta por uma série de vilosidades em formato de dedo ou pirâmide.

Zhang e col. (2015), observaram que intestinos de morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis* comparados a espécie *Mus musculus* mostraram-se mais curtos e estreitos e, após a correção da diferença de tamanho do corpo por normalização para a massa, os morcegos tinham 40% menos área de superfície nominal do que o camundongo. O aumento da área de superfície das vilosidades foi 90% maior no morcego do que no camundongo, principalmente por causa de vilosidades mais longas e uma maior densidade de vilosidades no intestino do morcego.

Machado-Santos e col. (2017) em estudo com pâncreas do morcego insetívoro *Pteronotus personatus* concluíram que o diâmetro médio das ilhotas pancreáticas foi de apenas 41 *um* e a densidade das ilhotas de 3,4%, com 35,5% de células beta e 25,8% de células alfa. Machado e col., (2013) obtiveram resultados onde observou-se que a massa de tecido pancreático total sobre a massa corporal foi de 0,6%.

3.4 – Morcegos nectarívoros

Mamíferos geralmente obtém energia a partir de lipídeos e estoques de glicogênio combinados com alimentos. Morcegos nectarívoros consomem principalmente uma dieta pobre em gordura e proteínas, mas rica em carboidratos simples (Welch, 2008). Nestes animais, a metabolização de carboidratos, ou seja, a oxidação preferencial de glicose exógena, é tão rápida e eficiente que compensa diretamente a alta taxa metabólica, poupando em custos energéticos o surgimento de eventos como a lipogênese e a glicogênese, que devido ao alto peso dessas reservas, prejudicaria o desempenho do animal durante o voo (Ben-Hamo *et al.*, 2012). Portanto, morcegos nectarívoros utilizam rapidamente carboidratos da dieta quando disponíveis e os usam predominantemente em vez de gordura ou glicogênio (Amaral *et al.*, 2019).

Amaral e col., (2019) em estudo com o morcego nectarívoro *Glossophaga soricina* observaram que estes animais têm pouca reserva adiposa e de glicogênio hepático e muscular, obtendo energia

principalmente de carboidratos da dieta, com redução significativa dos valores glicêmicos em até 40% em apenas 18 h de jejum.

Por meio da avaliação de Carbono 13 (C^{13}) contido numa dieta a base de frutose, glicose ou sacarose, Voigt e colaboradores (2007) observaram que os morcegos nectarívoros utilizam 82%, 95% ou 77% respectivamente destes substratos para manutenção de seu metabolismo. Esse e outro estudo do grupo (Voigt e Speakman, 2007) reforçam o entendimento de que os morcegos nectarívoros (i.e., *G. soricina*) possuem elevada demanda e dependência do substrato dietético para sua sobrevivência. As taxas de incorporação fracionária de carboidratos oriundos da dieta dentro do *pool* de substratos metabolizados estão entre as taxas mais rápidas já encontradas em um mamífero (Voigt e Speakman, 2007).

A dieta rica em carboidratos nos nectarívoros, associada a necessidade de rápida obtenção energética por glicose, reservas lipídicas limitadas e customização do peso corporal devido a menor massa intestinal e de bolo fecal, corroboram a hipótese de que esses animais dependem de boa capacidade de absorção paracelular intestinal. Também garantem maior eficiência energética, dado o custo para o voo, fatores que são observados de forma similar em muitas aves (Keegan and Mödinger, 1979). Inclui, Pappheimer e col. (1993) sugeriram que a absorção passiva é seletivamente vantajosa porque requer pouca energia.

Gadelha-Alves e col. (2008) em estudo comparativo histomorfométrico de intestinos de morcegos concluíram que a espécie nectarívora *Glossophaga soricina* apresenta mucosa com vilosidades mais delgadas, com tecido conjuntivo frouxo, retilíneas e digitiformes. Em relação ao pâncreas endócrino, Machado-Santos e col. (2017) estudando o morcego nectarívoro *Anoura geoffroyi* concluíram que o diâmetro médio das ilhotas é de 88 μm e a massa relativa das ilhotas de 6,1%. Machado e col., (2013 e 2017) em estudo comparativo entre morcegos hematófagos, frugívoros e nectarívoros observaram que a massa de tecido pancreático total sobre a massa corporal foi a menor nos morcegos nectarívoros (0,3%). Não há dados em literatura sobre proporção de células alfa e beta em ilhotas pancreáticas de morcegos nectarívoros.

4. Pâncreas endócrino

Há pouco consenso sobre a distribuição celular nas ilhotas pancreáticas de morcegos e menos ainda sobre a distribuição de ilhotas por áreas distintas do pâncreas. Em alguns mamíferos marsupiais por exemplo as células alfa podem ultrapassar os 70% da composição de uma ilhota e em algumas aves são as células beta que podem ultrapassar os 70% (Steiner, D.J *et al.*, 2010).

Até o momento há algumas evidências relacionadas ao padrão de distribuição das células pancreáticas endócrinas, mas nenhum deles teve o cuidado de associar o perfil celular com contextos e hábitos metabólicos. Alguns estudos em outras espécies também dão um panorama da variabilidade do perfil de distribuição celular nas ilhotas pancreáticas. Como é visto na **Tabela 1** a seguir, há uma variação enorme no padrão de distribuição celular das ilhotas pancreáticas entre os diferentes animais. Cada qual com sua citoarquitetura devidamente selecionada ao longo dos milhares de anos que moldaram a existência da espécie e sua adaptação ao meio em que se inserem. A seguir, uma Tabela contendo uma breve sumarização da citoarquitetura das ilhotas pancreáticas e o hábito alimentar entre diferentes animais.

	Dieta	Célula alfa (α)	Célula beta (β)	Célula delta (δ)
ONÍVOROS				
Homem	ONÍVORO	CENTRAL + PERIFÉRICA	CENTRAL + PERIFÉRICA	CENTRAL + PERIFÉRICA
Rato	ONÍVORO	PERIFÉRICA	CENTRAL	PERIFÉRICA
Camundongo	ONÍVORO	PERIFÉRICA	CENTRAL	PERIFÉRICA
Suíno	ONÍVORO	PERIFÉRICA	CENTRAL	PERIFÉRICA
CARNÍVOROS				
Canino	CARNÍVORO/ONÍVORO	PERIFÉRICA	CENTRAL	CENTRAL + PERIFÉRICA
Felino	CARNÍVORO	CENTRAL	PERIFÉRICA	PERIFÉRICA
Hiena - <i>Hyena hyena</i>	CARNÍVORO	PERIFÉRICA	CENTRAL	CENTRAL + PERIFÉRICA
Baleia Beluga - <i>Delphinapterus leucas</i>	CARNÍVORO	PERIFÉRICA	CENTRAL	SEM DADOS
Foca - <i>Arctocephalus Pusillus</i>	CARNÍVORO	PERIFÉRICA	CENTRAL	PERIFÉRICA
HERBÍVOROS				
Macaco Rhesus- <i>Macaca mulatta</i>	HERBÍVORO/ INSETÍVORO	CENTRAL + PERIFÉRICA	PERIFÉRICA	CENTRAL + PERIFÉRICA
Equino	HERBÍVORO	CENTRAL	PERIFÉRICA	PERIFÉRICA
Bicho preguiça de três dedos - <i>Bradypus tridactylus</i>	HERBÍVORO	PERIFÉRICA	CENTRAL	CENTRAL + PERIFÉRICA
Elefante - <i>Loxodonta spp</i>	HERBÍVORO	PERIFÉRICA	CENTRAL	PERIFÉRICA
Coelho	HERBÍVORO	PERIFÉRICA	CENTRAL	PERIFÉRICA
Bovino	HERBÍVORO RUMINANTE	PERIFÉRICA	CENTRAL	CENTRAL + PERIFÉRICA
Bubalino	HERBÍVORO RUMINANTE	PERIFÉRICA	CENTRAL	PERIFÉRICA
Caprino	HERBÍVORO RUMINANTE	PERIFÉRICA	CENTRAL	PERIFÉRICA
Ovino	HERBÍVORO RUMINANTE	PERIFÉRICA	CENTRAL	PERIFÉRICA
Camelo - <i>Camelus dromedarius</i>	HERBÍVORO RUMINANTE	PERIFÉRICA	CENTRAL	PERIFÉRICA
MORCEGOS – DIETA VARIADA				
Morcego - <i>Rousettus aegyptiacus</i>	FRUGÍVORO	PERIFÉRICA	CENTRAL	CENTRAL + PERIFÉRICA
Morcego – <i>Pteronotus personatus</i>	INSETÍVORO	PERIFÉRICA	CENTRAL	PERIFÉRICA

Morcego - <i>Diphylla ecaudata</i>	HEMATÓFAGO	PERIFÉRICA	CENTRAL	PERIFÉRICA
Morcego - <i>Anoura geoffroyi</i>	NECTARÍVORO	PERIFÉRICA	CENTRAL	PERIFÉRICA
OUTROS				
Anfíbios	VARIADO MAS PREDOMINANTEMENTE INSETÍVORO	PERIFÉRICA	CENTRAL	PERIFÉRICA
Peixes	VARIADO	PERIFÉRICA	CENTRAL	CENTRAL + PERIFÉRICA
Serpentes	CARNÍVORO/INSETÍVORO	PERIFÉRICA	CENTRAL	PERIFÉRICA

Tabela 1. Descrição do perfil celular em ilhotas pancreáticas de acordo com o hábito alimentar. Localização de células alfa, beta e delta nas ilhotas pancreáticas entre diferentes espécies. Adaptação de Steiner *et al.*, 2010 e Kim *et al.*, 2009.

A partir deste referencial teórico podemos dizer que o hábito alimentar parece ser determinante não somente para a massa endócrina e o perfil de distribuição celular nas ilhotas pancreáticas, mas também determinante para adequação estrutural e funcional de outros órgãos relacionados a homeostase glicêmica como o fígado (e estoques de glicogênio), intestino e musculatura esquelética.

Assim, buscamos nos morcegos uma forma comparativa de avaliar essa relação de órgãos relacionados a homeostase glicêmica com padrões alimentares, já que estes morcegos são mamíferos com padrões alimentares específicos. Nossa **hipótese** é que as espécies que se restrinjam mais a dietas proteicas (i.e., *Desmodus* e *Molossus*) possuirão ilhotas pancreáticas com uma contribuição menor das células beta e maior das células alfa; fígado e músculo com maiores reservas de glicogênio mais aptos a disponibilidade energética e intestinos com arquitetura mais complexa, revelando assim um conjunto de aparatos mais contrarreguladores para se adequar a este padrão biológico. Nas espécies com dieta rica em carboidratos (i.e., *Artibeus* e *Anoura*) esperamos adaptações funcionais e estruturais que esteja em coerência com o perfil alimentar (ex., maior peso das células beta pancreáticas, menores estoques de glicogênio e menor complexidade na arquitetura intestinal).

5 - Objetivos

5.1 – Geral

Avaliar parâmetros metabólicos e estruturais relacionados a homeostase glicêmica em quatro espécies de morcegos com diferentes hábitos alimentares visando a comparação entre as mesmas.

5.2 – Específicos

- 1) Avaliar a sensibilidade a insulina e a tolerância a glicose nos animais do gênero *Artibeus* sp.;
- 2) Avaliar os parâmetros metabólicos e bioquímicos envolvidos na homeostase glicêmica (glicemia basal) e lipídica (colesterol total, triglicerídeos, LDL, HDL, VLDL) fazendo um comparativo entre as diferentes espécies;
- 3) Avaliar os parâmetros metabólicos relacionados ao padrão energético de estocagem (conteúdo de glicogênio hepático e muscular) fazendo um comparativo entre as diferentes espécies;
- 4) Avaliar a relação do comprimento intestinal e a relação de massa de órgãos em função do peso corporal, como inferência indireta do estado metabólico, fazendo um comparativo entre as diferentes espécies.
- 5) Avaliar a morfologia tecidual de pâncreas, fígado, músculo esquelético e intestino em exames histológicos, imunohistoquímicos e ultraestruturais, fazendo um comparativo entre as diferentes espécies e associando as diferentes características celulares com os resultados bioquímicos.
- 6) Avaliar a massa de células endócrinas no pâncreas, a densidade de ilhotas e a proporção de células por ilhota, para associá-las ao perfil metabólico, fazendo um comparativo entre as diferentes espécies.

6 - Materiais e Métodos

6.1 – Autorizações

O estudo está devidamente autorizado e homologado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) (nº de identificação 1725300517) que segue todo o Marco Regulatório com base na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Este estudo também está respaldado pela autorização do Ministério do Meio Ambiente por meio do ICMBio (Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade) com o nº de identificação 58350-3.

6.2 - Coletas dos animais e Áreas de estudo

As coletas de campo foram realizadas em municípios do Estado de Santa Catarina e no município de Viçosa – MG onde a coleta dos espécimes foi realizada por meio da instalação de redes de neblina, acompanhado por biólogos credenciados que trabalham com monitoramento de fauna e

consultoria ambiental além de estudantes autorizados. Os animais utilizados na pesquisa foram das espécies endêmicas *Artibeus lituratus*, *Artibeus fimbriatus*, *Desmodus rotundus*, *Molossus molossus* e *Anoura caudifer*. Todos os animais do gênero *Artibeus* foram coletados em 23/10/2017 (Indaial – SC: 26° 53' 52" S, 49° 13' 54" O), 23/09/2018 (Guaramirim – SC: 26° 28' 23" S, 49° 00' 10" O) e 26/11/2018 (São José – SC: 27° 36' 55" S, 48° 37' 39" O). Os animais da espécie *Desmodus rotundus* foram coletados em 31/01/2019 (Navegantes – SC: 26° 53' 56" S, 48° 39' 15" O) e 15/12/2018 (Blumenau – SC: 26° 55' 10" S, 49° 03' 58" O), e os animais da espécie *Molossus molossus* em 20/03/2019 (Blumenau – SC: 26° 55' 10" S, 49° 03' 58" O). E por último, os nectarívoros da espécie *Anoura caudifer* foram coletados no período entre 15 a 21/01/2020 (Viçosa – MG: 20° 45' 14 " S, 42 °52 '54. 98 " O). Todos os animais foram capturados e coletados nas estações de verão e primavera a fim de uniformizar as atividades fisiológicas inerentes das espécies e de equiparar os recursos ambientais presentes nas duas estações.

Para as espécies frugívoras, insetívoras e hematófagas a captura, identificação taxonômica, sexagem e estimativa da faixa etária foi realizada por meio da supervisão do Prof. Dr. Sergio Luis Althoff, FURB, Santa Catarina e/ou pelos biólogos autorizados e cadastrados em nosso protocolo do ICMBIo (58350-3). Foram armadas redes de neblina para a captura (entre 19:00 e 02:00 h) seguida de coleta da quantidade desejável de morcegos, abertas ao pôr do sol e permanecendo abertas por um período de aproximadamente 6 h consecutivas. As redes utilizadas foram com malha de 15 mm, de 3x3 m, 7x3 m, 12x3 m, 18x3 m, dependendo do caso, dispostas a uma altura de cerca de três metros. Com auxílio de lanternas as redes foram revisadas a cada 20 min. Para a retirada dos morcegos das redes foram utilizadas luvas de couro e os animais foram transferidos em sacos individuais de algodão contendo um chumaço de algodão embebido com água, onde permaneceram até o momento da biometria (comprimento de antebraço), identificação e, dependendo do caso, marcação. A faixa etária foi determinada por meio da avaliação da ossificação das epífises das falanges dos dedos da mão. Os indivíduos foram classificados como jovens, quando as epífises ainda não estivessem totalmente ossificadas e como adultos, quando as epífises se encontrassem totalmente ossificadas. O estado reprodutivo foi avaliado nas fêmeas através da palpação direta do abdome e exame das mamas. Se detectada indicação de gravidez, o indivíduo era devolvido a natureza. Na sequência, os morcegos foram transportados (mantidos nos sacos) de carro particular para o Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas (Lidoc) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

No caso dos morcegos nectarívoros *Anoura caudifer*, procedimentos e cuidados similares foram realizados e os espécimes foram transportados (em gaiolas) na sequência da captura ao

Departamento de Ecofisiologia de Quirópteros do Centro de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa (UFV) com coordenação da Prof. Dra. Mariella Bontempo Duca de Freitas.

6.3 – Manutenção e Delineamento Experimental

Assim que foram remanejados aos respectivos locais de pernoite, os morcegos foram pesados em balança eletrônica em uma bolsa de tecido por período não superior a 30-45 segundos e a seguir foram identificados por meio de coleira plástica. Os morcegos foram mantidos em gaiolas apropriadas (dois a três animais por gaiola) em uma sala de 3x3 m com ambiente relativamente controlado (ex., controle de luz claro/escuro 12/12 h, temperatura ambiente protegida do exterior por paredes de alvenaria e arejamento natural do laboratório). Todos os morcegos receberam os alimentos apropriados para a espécie durante 1 a 2 noites pós-coleta, dependendo da espécie em cativeiro como será descrito na sequência.

Em relação aos **morcegos frugívoros** foram utilizados 15 animais no total sendo destes 11 da espécie *Artibeus lituratus* e 4 da espécie *Artibeus fimbriatus*. *Artibeus fimbriatus* foi utilizado para os experimentos de ITT e GTT e também compor lâmina de histologia. Todos estes permaneceram 2 pernoites pós-coleta em gaiolas preparadas para adaptação e descanso sendo fornecido mamão e água *ad libitum*. Foram realizados teste de tolerância a insulina intraperitoneal (ipITT) as 8:00 h no primeiro dia pós adaptação/descanso (com os animais alimentados) e teste de tolerância a glicose intraperitoneal (ipGTT) as 14:00 h no segundo dia (com os animais em jejum de aproximadamente 8 h (fase clara), seguida de eutanásia (16:00 h) por meio de sobredose de tiopental sódico (200 mg/Kg de peso corpóreo) seguido de decapitação em guilhotina para posterior coleta de amostras para exames laboratoriais.

Em relação aos **morcegos hematófagos** foram utilizados 9 animais da espécie *Desmodus rotundus*. Estes permaneceram 1 pernoite pós-coleta em gaiolas preparadas para adaptação e descanso, recebendo sangue de carneiro desfibrinado (fornecido pelo BC/UFSC), em placas de Petri disponibilizadas na base da gaiola e água *ad libitum*. No dia seguinte os animais foram submetidos a um jejum de 8 h (fase clara) e foram eutanasiados e tiveram materiais biológicos coletados por volta das 16:00 h como descrito para *Artibeus* sp.

Para os **morcegos insetívoros** da espécie *Molossus molossus*, foram utilizados 6 animais Estes permaneceram 1 pernoite pós-coleta em gaiolas preparadas para adaptação e descanso. Não receberam alimentação durante o pernoite pois durante a coleta destes já foram observadas grandes quantidades de insetos na cavidade oral. Água potável foi fornecida *ad libitum*. No dia seguinte pós descanso/adaptação foi realizada eutanásia (10:00 h, como descrito anteriormente) com coleta de

amostras para exames laboratoriais. Apesar de terem sido eutanasiados pela manhã, e não pela tarde, estes animais foram submetidos a um período aproximado de 8 h de jejum, considerando que haviam acabado de comer no momento da captura.

E para os **morcegos nectarívoros** foram utilizados 5 animais da espécie *Anoura caudifer*. Estes também permaneceram 1 pernoite pós-coleta em gaiolas preparadas para adaptação e descanso. Não receberam alimentação durante o pernoite porque logo após a captura, eles foram alimentados oralmente com solução de água e açúcar por meio de seringas, para evitar efeitos deletérios do estresse por contenção. Já no laboratório, água potável foi fornecida *ad libitum*. No dia seguinte pós descanso/adaptação foi realizada eutanásia (10:00 h, como descrito para as demais espécies) com coleta de amostras para exames laboratoriais. Apesar de terem sido eutanasiados pela manhã, e não pela tarde, estes animais foram submetidos a um período aproximado de 8 h de jejum, visto que eles foram alimentados imediatamente após a captura como descrito.

6.4 - Teste de tolerância a insulina intraperitoneal (ipITT) – *Artibeus* sp

Todos os 15 morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* foram submetidos ao ipITT. A glicemia basal (min. 0) (glicosímetro digital AccuChek Performa – Roche) foi obtida a partir de uma gota de sangue coletada de uma veia da asa submetida a uma breve punção com agulha 27G. Após a determinação da glicemia basal, receberam uma injeção intraperitoneal de insulina humana recombinante (Biohulin[®]) equivalente a 0,33 IU/Kg de peso corpóreo. Amostras de sangue foram coletadas para dosagem das concentrações de glicose sanguínea nos tempos 15, 30, 45 e 60 min. A constante de decaimento de glicose (*K*) foi calculada a partir do “slope” da linha de regressão obtida com valores de glicose log-transformados entre 0 e 60 min. (Rafacho *et al.* 2007).

Nas espécies *Desmodus rotundus*, *Molossus molossus* e *Anoura caudifer* o teste não foi realizado por dificuldades técnicas na obtenção de sangue em tempos consecutivos devido ao diminuto tamanho dos vasos sanguíneos das asas e membros, bem como com o intuito de se evitar estresse ao animal com possível morte durante a sua manipulação.

6.5 - Teste de tolerância a glicose intraperitoneal (ipGTT) – *Artibeus* sp

Os 15 morcegos do gênero *Artibeus* tiveram a glicemia basal mensurada como descrito para o ipITT. Imediatamente, foi administrada solução de glicose 50% (3 g/Kg de peso corpóreo, *i.p.*) e foram coletadas amostras de sangue dos morcegos (na asa oposta daquela utilizada para a coleta de sangue no ipITT) nos tempos 15, 30, 45, 60 e 120 min.

Nas espécies *Desmodus rotundus*, *Molossus molossus* e *Anoura caudifer* o teste não foi realizado pelas razões supracitadas no tópico anterior.

6.6 – Massa de órgãos

Os morcegos foram pesados e em seguida anestesiados para eutanásia como descrito previamente. Alguns órgãos (baço, fígado, rins e pâncreas) foram cuidadosamente coletados e tiveram sua massa obtida em balança eletrônica. Fragmentos de fígado, pâncreas, músculo peitoral e do intestino proximal foram processados para análises histológicas e microscopia eletrônica de transmissão, enquanto fragmentos de intestino proximal foram processados também para microscopia eletrônica de varredura. Para as análises, 13 (treze) animais do grupo *Artibeus sp*, 5 (cinco) *Desmodus rotundus*, 6 (seis) *Molossus molossus* e 5 (cinco) *Anoura caudifer* foram utilizados.

6.7 - Testes bioquímicos plasmáticos

O sangue do tronco foi coletado imediatamente após a decapitação para obtenção de plasma e realização de dosagens de parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol total, triglicérides, LDL, HDL e VLDL). As amostras de plasma, obtida por centrifugação de sangue em tubos contendo anticoagulante EDTA, foram armazenadas em freezer -80C e processadas posteriormente.

Glicose sanguínea e perfil lipídico plasmáticos: A glicose sanguínea foi obtida no momento basal do ipITT e ipGTT ou imediatamente antes de se aplicar a sobredose de anestesia (Tiopental sódico - 200 mg/Kg de peso corpóreo). Os componentes plasmáticos do perfil lipídico como o colesterol total (COL), triglicérides (TG) e HDL foram quantificados e realizados de acordo com instruções dos fabricantes (Labtest®, MG, Brasil). O LDL e VLDL foram oriundos de cálculos realizados, onde $VLDL = TG/5$ e $LDL = COL - (HDL+VLDL)$.

6.8 – Conteúdo de Glicogênios muscular e hepático

Fragmentos (300 a 500 mg) de fígado e do músculo peitoral (sempre do mesmo lóbulo) foram coletados para quantificação posterior do conteúdo de glicogênio. Os fragmentos foram mantidos em solução de KOH 30% em tubos de ensaio em banho maria fervente por 1 h. Em seguida, foi acrescentado Na_2SO_4 e etanol. O material foi homogeneizado e conduzido ao banho maria novamente por 15 s. Após centrifugação, o sobrenadante, contendo lípidos saponificados, aminoácidos, etc foi descartado e o ‘pellet’ ressuspensionado em água destilada aquecida. Etanol foi adicionado em seguida e após novo aquecimento rápido em banho maria o material foi centrifugado. Após diluição do precipitado em H_2O destilada, o conteúdo de glicogênio foi quantificado por espectrofotometria com base em uma curva de glicose de referência (Gonçalves-Neto, *et al.* 2014).

6.9 – Comprimento intestinal

O comprimento intestinal total foi mensurado imediatamente após a eutanásia e os resultados expressos como comprimento intestinal (cm)/massa corpórea (g).

6.10 – Histologia e Imunofluorescência

Fragments de **fígado, musculo esquelético peitoral, pâncreas e intestino proximal** foram fixados em formalina neutra tamponada – pH 7,2 e mantidos por até 48 h em temperatura ambiente. Em seguida realizou-se a desidratação por álcool em concentrações crescentes e diafanização em xilol dos fragmentos até a inclusão em parafina. Posteriormente as mesmas foram seccionadas em 5 µm em micrótomo (Micrótomo Rotativo Leica RM2255.), levadas a banho maria e coradas de acordo com a técnica de coloração para Hematoxilina Eosina. Parte das amostras de fígado foram coradas com PAS (Ácido periódico-Schiff) para evidenciação de glicogênio. Todos os segmentos de intestino proximal analisados foram retirados da região imediatamente posterior a área antropilórica, portanto em trecho inicial de duodeno.

Para imunofluorescência as lâminas de pâncreas obtidas da etapa anterior foram desparafinizadas em xilol e em diluições decrescentes de álcoois. Na sequência foi realizada recuperação antigênica com tampão citrato e bloqueio com PBST 0,2% + 3% albumina, deixando bloqueando em câmara úmida por 1 h, sendo esta a primeira incubação, lavando-se em PBS na sequência. Para a segunda incubação foram utilizados anticorpos primários anti-insulina (cobaia, Dako®, 1:400) e anticorpos primários anti-glucagon (coelho, Santa Cruz® 1:1000) por 4 h em câmara úmida, lavando-se em PBS na sequência. Na terceira incubação foram utilizados anticorpos secundários (anti-cobaia, Alexa fluor 488, Jackson ImmunoResearch, 1:500) e (anti-coelho Cy-3, Jackson ImmunoResearch, 1:500) e incubados por 1 h em câmara úmida protegida da luz com posterior lavagem em PBS. Foi então aplicado o meio de montagem contendo DAPI e a lamínula foi então selada com esmalte incolor nos bordos. As lâminas foram armazenadas em geladeira e posteriormente imagens representativas de cada corte foram adquiridas a partir do microscópio invertido Olympus IX83 com câmara acoplada Olympus DP73 e utilização do software CellSens Dimension 1.12 para captura de imagens.

Para a determinação da massa de ilhota pancreática, utilizaram-se lâminas de histologia de todos os grupos previamente coradas em HE com contagem em aumento de 40x de toda área pancreática de 5 animais (escolhidos aleatoriamente) de cada grupo. A contagem de pontos foi realizada em ocular reticulada (100 pontos/cruzamentos) em microscópio Nikon Eclipse E200 onde distinguiam-se e se computava pontos incidentes sobre o tecido exócrino, endócrino e outros (tecido

adiposo, tecido linfático, hemácias, parede de vasos). Todos os pontos foram anotados e calculados posteriormente para o fornecimento de resultados de massa absoluta, relativa e relações com massa corpórea de acordo com publicação prévia (Rafacho *et al.*, 2009).

Para determinação da densidade de ilhotas pancreáticas, todas as ilhotas compondo a extensão do corte foram contabilizadas por meio de aumento de 4x, considerando-se como ilhota qualquer estrutura endócrina com ao menos 4 células. Foram utilizadas lâminas de histologia em HE dos mesmos animais e contagem realizada no mesmo equipamento. O resultado foi expresso em n^o/área fracional que corresponde a densidade em 10.000 pontos contados.

Para determinação da proporção de células alfa e beta por ilhota foi utilizado microscópio Mshot MF31 LED de fluorescência em lâminas confeccionadas para tal, também dos mesmos animais e em aumento de 40x. A proporção de células alfa e beta foi obtida a partir de imagens contendo a dupla marcação glucagon/insulina e analisadas com o uso do Software Image J (versão 1.53e). Sobre as imagens foi posicionado um grid de 100 pontos e computados os pontos incidentes sobre o total da ilhota, com discriminação dos pontos incidentes sobre as células alfa e beta. A proporção de células foi obtida para cada ilhota a partir de uma regra de 3: número total de pontos incidido sobre as células alfa ou beta x 100, dividido pelo número total de pontos incididos sobre a ilhota. Foram analisadas todas as ilhotas que compreenderam os cortes submetidos a imunofluorescência (n=X secções por espécie).

6.11 - Microscopia Eletrônica de transmissão (MET)

Com o objetivo de analisar organelas e estruturas intracelulares, fragmentos de 2 mm³ de **fígado, pâncreas, musculo esquelético peitoral e intestino proximal** de cada espécie foram coletados para microscopia eletrônica de transmissão. Para o processamento do MET, as amostras foram pré-fixadas no LabCev – UFSC, em solução de glutaraldeído 2,5% + solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2, concentração final) + paraformaldeído 2% e mantidos por 12 h em geladeira em tubos de 2,0 ml. A pré-fixação foi seguida por quatro lavagens de 30 min., no mesmo tampão. Posteriormente, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (1:1), durante 4 h a temperatura ambiente (Pueschel, 1979; Ouriques & Bouzon 2003). Após esse período, o material foi lavado duas vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M, sendo mantido por 30 min. em cada lavagem. A desidratação foi realizada em uma série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo o material mantido 30 min. em cada etapa. A última série de acetona 100% foi trocada duas vezes.

O material foi então infiltrado com resina Spurr em séries graduais de acetona-resina Spurr durante três dias, seguido de duas infiltrações em resina pura por 12 h, e polimerizados em estufa a 70°C por 24 h. Os cortes ultrafinos foram feitos com navalha de diamante em ultramicrótomo e, posteriormente, contrastados com acetato de uranila 1% e citrato de chumbo 1%. Os cortes foram observados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 TEM (TEM 100 kV) do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC com a supervisão técnica da Profa. Dra. Luciane Cristina Ouriques – UFSC.

6.12 - Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)

Com o objetivo de analisar a microarquitetura intestinal bem como a disposição das vilosidades, fragmentos de 2mm³ de **intestino proximal** de cada espécie de morcego, com exceção da espécie *Anoura caudifer*, foi fixado no mesmo fixador utilizado para MET. A desidratação foi realizada em uma série de soluções aquosas de concentrações crescentes de álcool (30%, 50%, 70%) com a pós-fixação parando na lavagem de álcool 70%. Após esta etapa, há a fase de análise de ponto crítico realizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. A aquisição das fotos foi obtida através de um Microscópio de varredura convencional com filamento de tungstênio modelo JEOL JSM-6390LV com software próprio.

6.13 – Análises Estatísticas

Os resultados quando paramétricos foram expressos como média \pm desvio padrão e quando não-paramétricos foram expressos como mediana e intervalos interquartis. Para dados contínuos que apresentaram distribuição normal, foi aplicada a análise de variância de 1 via (*one way* ANOVA) e análise de variância de 2 vias (*two way* ANOVA) este último apenas nos casos de ITT e GTT, seguida de pós teste de Tukey para o primeiro e pós teste de RM Friedmann e Dunn para o segundo. Para dados contínuos que não apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn. ANOVA (paramétrico) ou teste de Friedman (não-paramétrico) para medidas repetidas foi aplicado, quando indicado assim como Teste t. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

7 – Resultados

Para melhor compreensão e interpretação dos resultados, a tabela abaixo resume as principais características alimentares dos animais utilizados no experimento (**Tabela 2**).

7.1 – Glicemia e Perfil lipídico

Glicemia: Os valores de glicose sanguínea foram menores e estatisticamente significantes entre os animais do grupo *Anoura* (nectarívoro) em relação aos grupos *Desmodus* (hematófago) com média e desvio padrão resultante do grupo *Anoura* em 46 ± 20 mg/dL em relação aos 84 ± 21 mg/dL do grupo *Desmodus* ($p < 0,05$). *Artibeus* (frugívoro) com média e desvio padrão de 72 ± 22 mg/dL e *Molossus* (insetívoro) com média e desvio padrão de 56 ± 10 mg/dL (**Figura 7A**). Não houve diferenças entre os grupos *Artibeus*, *Desmodus* e *Molossus* e entre *Anoura*, *Molossus* e *Artibeus*.

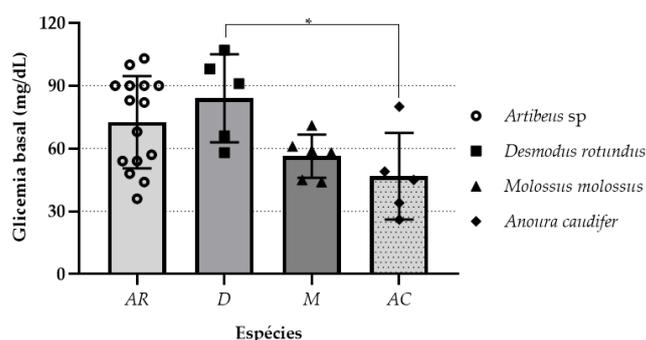


Figura 6: Gráfico - Glicemia basal: Valores menores ($p < 0,05$) do grupo *Anoura* (nectarívoro) em relação ao grupo *Desmodus* (hematófago) com média e desvio padrão de $46,8 \pm 20,6$ e 84 ± 21 (mg/dL) respectivamente. *Artibeus* (AR) $n=15$; *Desmodus* (D) $n = 5$; *Molossus* (M) $n=6$; *Anoura* (AC) $n=5$. Dado simétrico (KS), e homocedástico pelo Bartlett's e por Brown. Gráfico paramétrico, Anova de 1 via com média e desvio padrão.

7.2 – Sensibilidade a insulina e tolerância a glicose – *Artibeus sp* (frugívoros)

A partir do ipITT observamos redução significativa ($p < 0,05$) dos valores de glicose sanguínea nos min. 15 e 30 em relação aos valores basais na espécie *A. lituratus* e *A. fimbriatus*, separadamente, bem como com o agrupamento dos dados do gênero (**Figura 6A e 6B**). Os valores glicêmicos revelaram uma contrarregulação como pôde ser visto com o retorno gradual da glicemia, com recuperação completa dos valores 60 min. após a administração da insulina.

O teste de tolerância a glicose intraperitoneal não revelou diferenças estatísticas entre os tempos quando considerado os animais separados por sp. seja na presença (**Figura 6C**) na ausência (**Figura 6D**) do outlier. Ao agrupar todos os animais, observamos um incremento significativo ($p < 0,05$) nos min. 15, 30 e 45 em relação aos valores basais (**Figura 6E**). Também foi possível observar a normalização dos valores glicêmicos 2 h após a administração da sobrecarga de glicose.

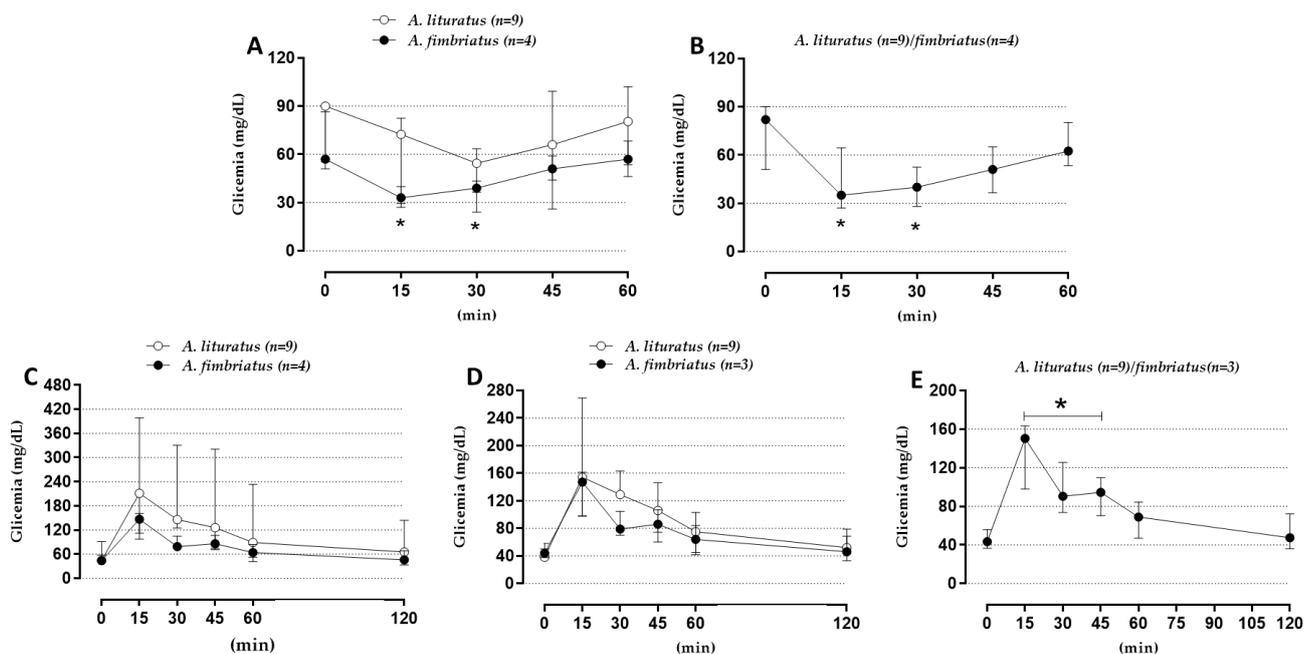


Figura 7: Gráficos - ITTip (0,33 IU/kg p.c.) e GTT (3g/kg p.c.): Gênero *Artibeus* (frugívoros):
A – ITT (0-60min): Redução dos valores de glicose com retorno gradual da glicemia após 60 min. **n= 13** (Anova 2 vias com RM, pós teste Dunn) *significa diferença significativa em relação ao min 0. **B – ITT (0-60min):** Considerando o gênero: Redução dos valores de glicose com retorno gradual da glicemia após 60 min. **n= 13** (Anova 2 vias com RM Friedman e Dunn's pós teste) *significa diferença significativa em relação ao min 0. **C, D e E - GTT(0-120min):** Aumento dos valores de glicose nos min. 15, 30 e 45 com normalização dos valores glicêmicos 2h após. **C: n = 13 e D e E: n = 12** (Anova 2 vias com RM Friedman (excluindo 1 indivíduo *A. fimbriatus* em D e E). *significa diferença em relação ao min 0.

Triglicerídeos: Foram observados valores menores estatisticamente significantes nos morcegos do gênero *Artibeus* (frugívoro) em relação aos grupos *Desmodus* (hematófago), *Molossus* (insetívoro) e *Anoura* (nectarívoro) com média e desvio padrão resultante do gênero *Artibeus* de 9 ± 4 mg/dL em relação aos 42 ± 16 , 46 ± 13 e 51 ± 9 mg/dL ($p < 0,0001$), respectivamente. Não houve diferenças entre os grupos *Desmodus*, *Molossus* e *Anoura* (**Figura 8A**).

Colesterol: Na análise comparativa do colesterol plasmático total foram observados valores maiores no grupo *Molossus* em relação aos morcegos do gênero *Artibeus*, *Anoura* e *Desmodus* com média e desvio padrão resultante da espécie *Molossus molossus* de 231 ± 74 mg/dL em relação aos 99 ± 30 , 46 ± 8 e 114 ± 26 mg/dL ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ e $p < 0,01$), respectivamente. Também foram observados valores maiores dos grupos *Artibeus* e *Desmodus* em relação ao grupo *Anoura* ($p < 0,001$). Não houve diferenças entre os grupos *Artibeus* e *Desmodus* (**Figura 8B**).

HDL (Lipoproteína de alta densidade): Foram observados valores menores entre os animais do grupo *Desmodus* em relação aos grupos *Artibeus*, *Molossus* e *Anoura* com média e desvio padrão resultante do grupo *Desmodus* em 4 ± 3 mg/dL em relação aos 40 ± 15 , 33 ± 8 e 23 ± 6 mg/dL ($p < 0,0001$)

respectivamente. Também foi observado valores maiores do grupo *Artibeus* em relação ao grupo *Anoura* ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos *Artibeus* e *Molossus* (**Figura 8C**).

LDL (Lipoproteína de baixa densidade): Foram observados valores maiores no grupo *Molossus* em relação aos grupos *Artibeus* e *Anoura* com média e desvio padrão resultante do grupo *Molossus* em 189 ± 80 mg/dL em relação aos 57 ± 23 e 14 ± 2 mg/dL ($p < 0,0001$), respectivamente. Também observou valores menores no grupo *Anoura* em relação aos grupos *Artibeus* e *Desmodus* com média e desvio padrão resultante do grupo *Anoura* em 14 ± 2 mg/dL em relação aos 57 ± 23 e 93 ± 31 mg/dL ($p < 0,0001$), respectivamente e valores maiores do grupo *Desmodus* em relação ao grupo *Artibeus* ($p < 0,05$) (**Figura 8D**).

VLDL (Lipoproteína de densidade muito baixa): Foram observados valores menores entre os animais do grupo *Artibeus* em relação aos grupos *Desmodus*, *Molossus* e *Anoura* com média e desvio padrão resultante do grupo *Artibeus* em $1,7 \pm 0,7$ mg/dL em relação aos $8,5 \pm 3,1$, $9,3 \pm 2,6$ e $10,3 \pm 1,8$ mg/dL ($p < 0,0001$), respectivamente. Não houve diferenças entre os grupos *Desmodus*, *Molossus* e *Anoura* (**Figura 8E**).

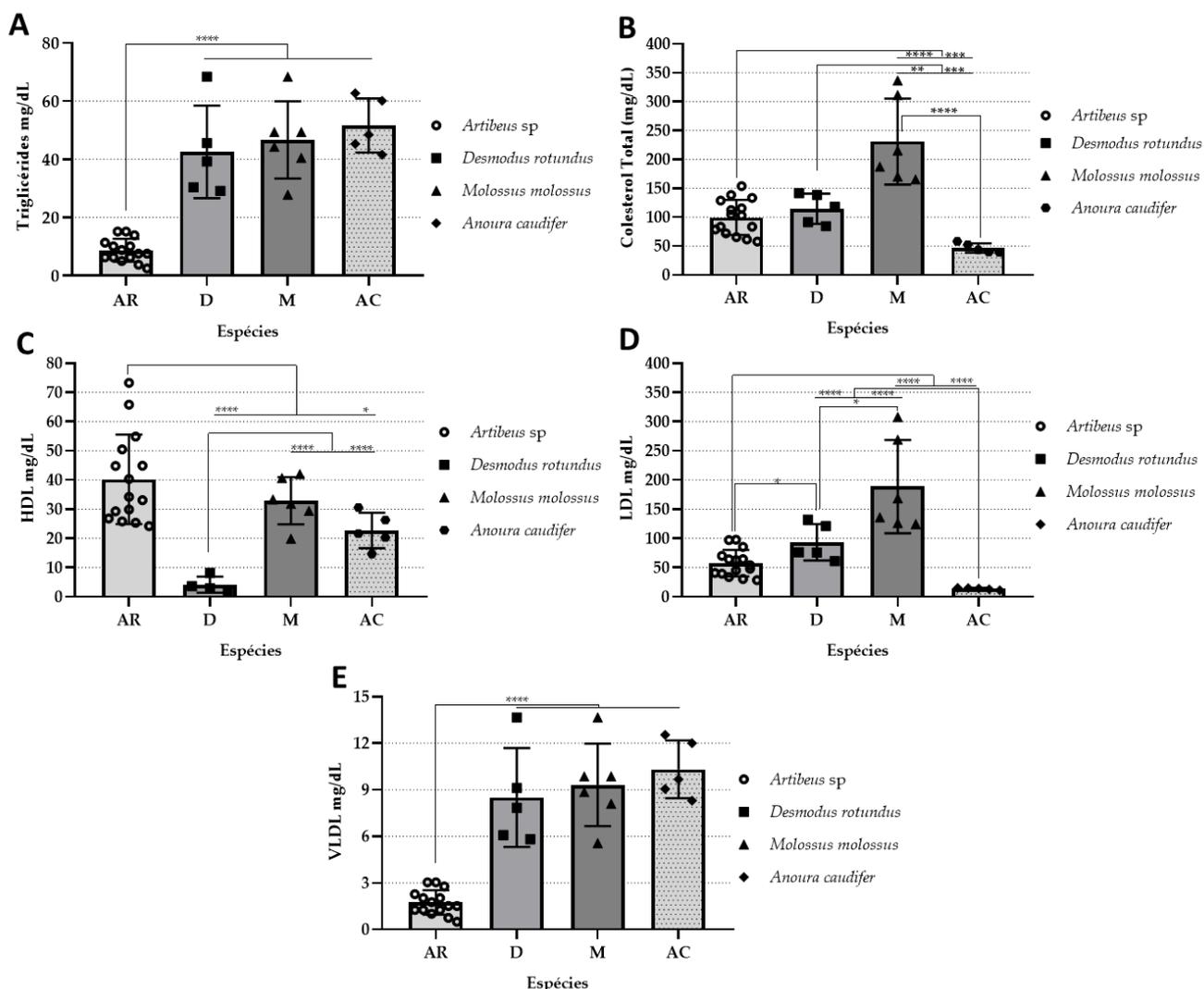


Figura 8: Gráficos - Perfil Lipídico. A – Triglicérides: Valores menores nos morcegos do gênero *Artibeus* (frugívoro) em relação aos grupos *Desmodus* (hematófago), *Molossus* (insetívoro) e *Anoura* (nectarívoro). Anova de 1 via com média e desvio padrão. **B - Colesterol Total:** Valores maiores nos morcegos da espécie *Molossus* em relação aos morcegos do gênero *Artibeus*, *Anoura* e *Desmodus*. Após a transformação para Log os resultados se apresentaram homocedásticos e paramétricos. Anova de 1 via com média e desvio padrão. **C - HDL:** Valores menores entre os animais do grupo *Desmodus* em relação aos grupos *Artibeus*, *Molossus* e *Anoura*. Retirado 1 outlier do grupo *Desmodus*. Anova de 1 via com média e desvio padrão. **D - LDL:** Valores maiores no grupo *Molossus* em relação aos grupos *Artibeus* e *Anoura*. Valores menores no grupo *Anoura* em relação aos grupos *Artibeus* e *Desmodus*. Anova de 1 via com média e desvio padrão. **E - VLDL:** Valores menores entre os animais do grupo *Artibeus* em relação aos grupos *Desmodus*, *Molossus* e *Anoura*. Anova de 1 via com média e desvio padrão. *Artibeus* (AR) n=15; *Desmodus* (D) n = 5; *Molossus* (M) n=6; *Anoura* (AC) n=5.

7.3 – Glicogênio hepático e muscular

Na análise comparativa do glicogênio hepático foram observados valores menores estatisticamente significantes nos morcegos *Desmodus* (hematófago) em relação aos morcegos *Artibeus* (frugívoro) ($p < 0,05$) e *Molossus* (insetívoro) ($p < 0,001$) com mediana resultante do grupo

Desmodus de 0,2 mg/100mg em relação aos 1,1 mg/100mg e 1,6 mg/100mg respectivamente. Não houve diferenças entre o grupo *Artibeus* e *Molossus* (**Figura 9A**). Para o glicogênio muscular não houve diferença de valores estatisticamente significantes (**Figura 9B**).

Na análise comparativa dos glicogênios por espécie, no grupo *Artibeus* foi observado valor menor ($p < 0,05$) do glicogênio muscular em relação ao hepático com médias e desvio padrão de $0,9 \pm 0,2$ e $1,1 \pm 0,2$ mg/100mg, respectivamente (**Figura 9C**). No grupo *Desmodus* foi observado valor menor ($p < 0,0001$) do glicogênio hepático em relação ao muscular com médias de $0,2 \pm 0,05$ e $1,1 \pm 0,1$ mg/100mg, respectivamente (**Figura 9D**). No grupo *Molossus* foi observado valor menor ($p < 0,001$) do glicogênio hepático em relação ao muscular com médias de $1,5 \pm 0,2$ e $1,0 \pm 0,04$ mg/100mg, respectivamente (**Figura 9E**). Os resultados dos glicogênios hepático e muscular dos **morcegos nectarívoros** *Anoura caudifer* não foram incluídos com motivos explicados no tópico “9 - Dificuldades encontradas”.

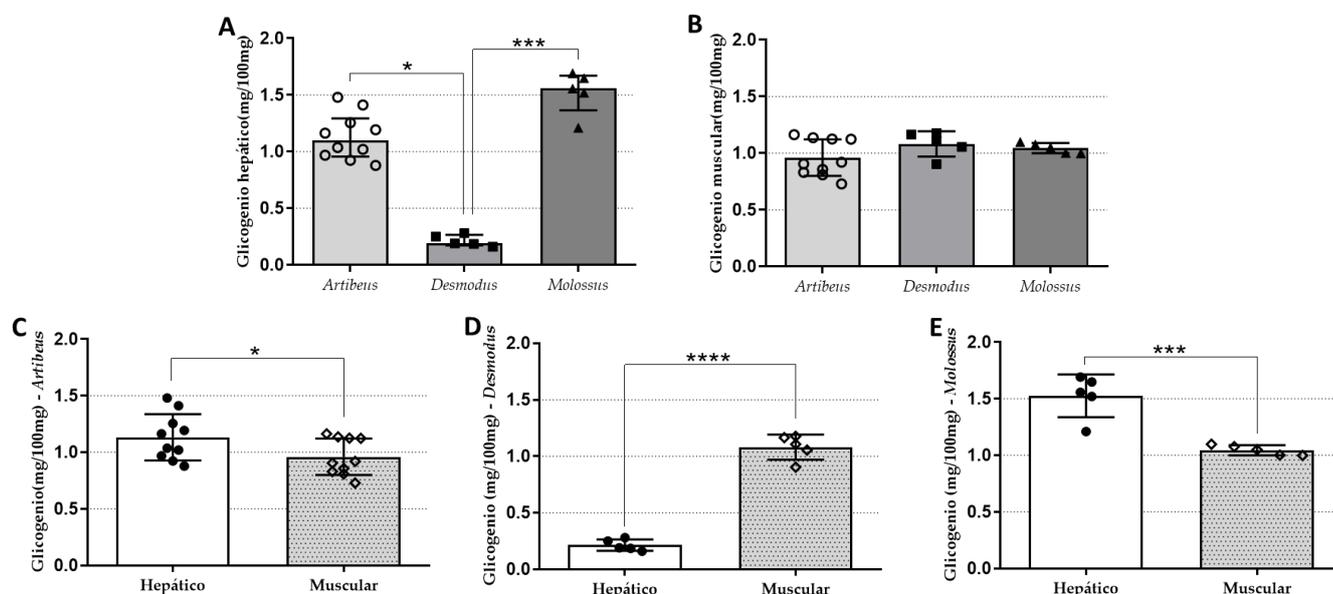


Figura 9: Gráficos - Glicogênios **A - Glicogênio hepático:** Valores menores nos morcegos *Desmodus* (hematófago) em relação aos morcegos *Artibeus* (frugívoro) ($p < 0,05$) e *Molossus* (insetívoro) ($p < 0,001$). Dado simétrico (KS), porém heterocedástico pelo Bartlett's. Gráfico não-paramétrico (Kruskal Wallis) com mediana e intervalo interquartil. **B - Glicogênio muscular:** Não houve diferença estatisticamente significativa. **C - Glicogênio - *Artibeus*:** Valores menores do glicogênio muscular em relação ao hepático ($p < 0,05$). Teste t não pareado em média e desvio padrão. **D - Glicogênio - *Desmodus*:** Valores menores do glicogênio hepático em relação ao muscular ($p < 0,0001$). Teste t não pareado em média e desvio padrão. **E - Glicogênio - *Molossus*:** Valores menores do glicogênio hepático em relação ao muscular ($p < 0,001$). Teste t não pareado em média e desvio padrão. *Artibeus* ($n=10$); *Desmodus* ($n=5$); *Molossus* ($n=5$).

7.4 – Massa de órgãos/peso corporal e comprimento intestinal

Nas **massas corpóreas** foram encontrados maiores valores no grupo dos morcegos *Artibeus* (frugívoros) com média de 72 g em relação ao grupo *Desmodus* (hematófago) com média de 38 g, ao grupo *Molossus* (insetívoro) com média de 21 g e ao grupo *Anoura* (nectarívoro) com média de 11 g. Valores maiores estatisticamente significantes foram observados do grupo *Artibeus* em relação ao grupo *Molossus* ($p < 0,01$) e do grupo *Artibeus* em relação ao grupo *Anoura* ($p < 0,001$). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos *Artibeus* e *Desmodus*, *Molossus* e *Anoura*, *Desmodus* e *Molossus* (**Figura 10A**).

Na **massa hepática** foram observados valores menores entre os animais do grupo *Molossus* em relação aos grupos *Artibeus* e *Desmodus* com mediana resultante do grupo *Molossus* em 2,46 mg/100mg p.c em relação aos 3,08 e 3,76 mg/100mg p.c ($p < 0,05$), respectivamente. E, também, valores menores do grupo *Anoura* (2,2 mg/100mg p.c) em relação aos grupos *Artibeus* e *Desmodus* ($p < 0,01$) (**Figura 10B**).

E em relação a **massa pancreática** foram observados valores menores entre os animais do grupo *Artibeus* em relação aos grupos *Desmodus*, *Molossus* e *Anoura* com média e desvio padrão resultante do grupo *Artibeus* em $0,14 \pm 0,01$ mg/100mg p.c em relação aos $0,66 \pm 0,07$, $0,35 \pm 0,03$ e $0,22 \pm 0,03$ mg/100mg p.c ($p < 0,0001$), respectivamente. Valores maiores do grupo *Desmodus* em relação aos grupos *Artibeus*, *Molossus* e *Anoura* ($p < 0,0001$) e valores maiores do grupo *Molossus* em relação ao grupo *Anoura* ($p < 0,0001$) (**Figura 10C**).

Na **massa esplênica** foram observados valores menores entre os animais do grupo *Artibeus* em relação aos grupos *Desmodus*, *Molossus* e *Anoura* com média e desvio padrão resultante do grupo *Artibeus* em $0,14 \pm 0,02$ mg/100mg p.c em relação aos $0,45 \pm 0,08$, $0,45 \pm 0,06$ e $0,22 \pm 0,03$ mg/100mg p.c ($p < 0,0001$) respectivamente. E também valores menores do grupo *Anoura* em relação aos grupos *Desmodus* e *Molossus* ($p < 0,0001$) (**Figura 10D**).

Na **massa renal**, foram observados valores menores entre os animais do grupo *Molossus* em relação aos grupos *Artibeus*, *Desmodus* e *Anoura* com média e desvio padrão resultante do grupo *Molossus* em $0,64 \pm 0,12$ mg/100mg p.c em relação aos $1,02 \pm 0,09$, $1,01 \pm 0,07$ e $0,96 \pm 0,08$ mg/100mg p.c ($p < 0,0001$), respectivamente (**Figura 10E**).

Quanto ao **comprimento intestinal**, foram observados valores menores entre os animais do grupo *Artibeus* ($0,87 \pm 0,07$ cm/g p.c) e *Anoura* ($0,88 \pm 0,08$ cm/g p.c) em relação aos grupos *Desmodus* ($1,98 \pm 0,32$ cm/g p.c) e *Molossus* ($2,51 \pm 0,61$ cm/g p.c) ($p < 0,0001$) (**Figura 10F**).

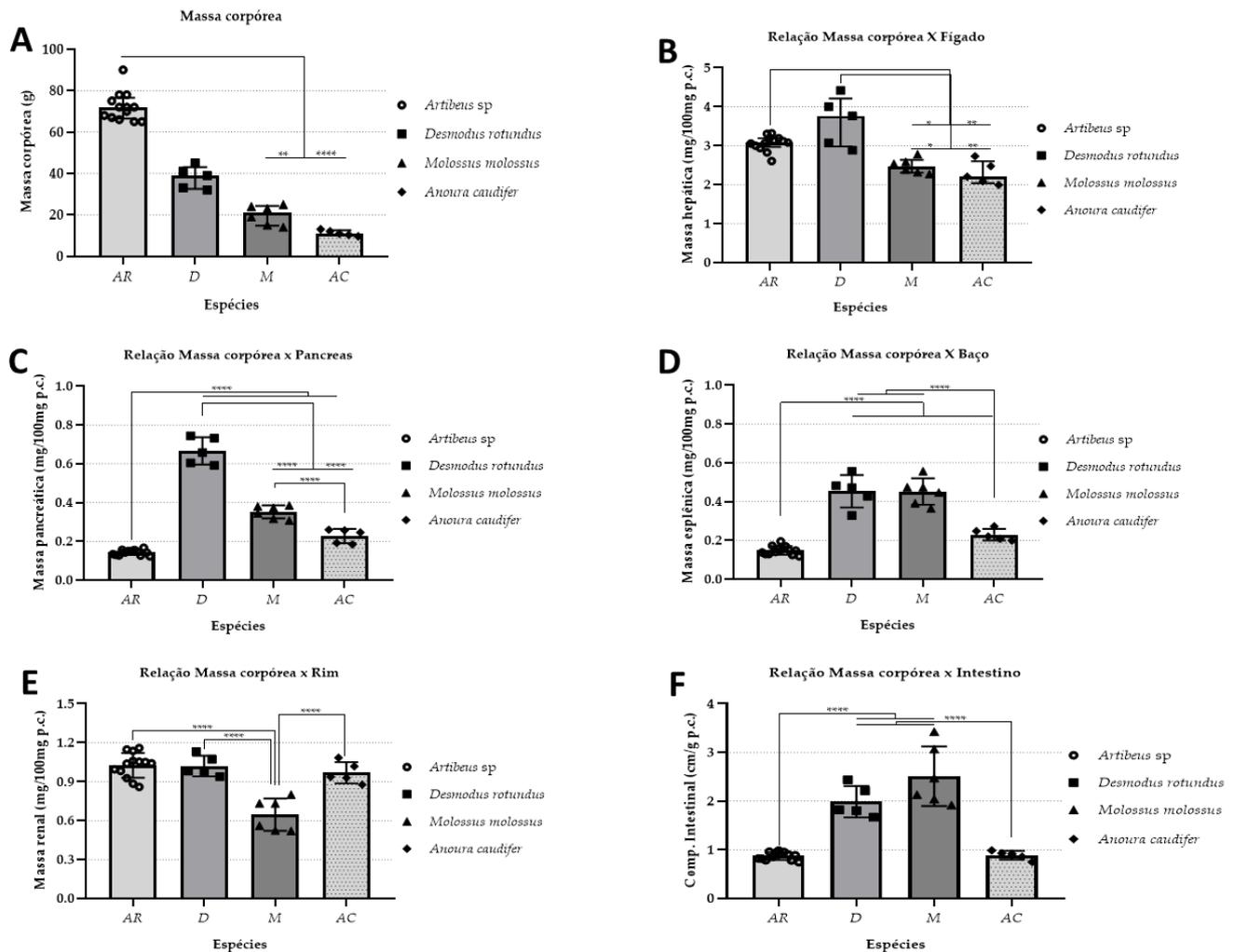


Figura 10: Gráficos - Massa de órgãos/peso corporal e comprimento intestinal. **A – Massa corpórea:** Maiores valores de massas corpóreas no grupo *Artibeus* (frugívoro) seguido pelo grupo *Desmodus* (hematófago), *Molossus* (insetívoro) e *Anoura* (nectarívoro) este grupo com o menor valor de massa corpórea. Valores maiores foram observados do grupo *Artibeus* em relação ao grupo *Molossus* ($p < 0,01$) e do grupo *Artibeus* em relação ao grupo *Anoura* ($p < 0,001$). **B - Massa hepática:** Valores menores entre os animais do grupo *Molossus* em relação aos grupos *Artibeus* e *Desmodus* ($p < 0,05$). Valores menores do grupo *Anoura* em relação aos grupos *Desmodus* e *Artibeus* ($p < 0,01$). Após a transformação para Log os resultados se apresentaram heterocedásticos e não paramétricos e então foi analisado por Kruskal Wallis com mediana e intervalo interquartil. Não houve diferença de valores entre os grupos *Artibeus* e *Desmodus* e entre *Molossus* e *Anoura*. **C - Massa pancreática:** Valores menores entre os animais do grupo *Artibeus* em relação aos grupos *Desmodus*, *Molossus* e *Anoura* ($p < 0,0001$). Valores maiores do grupo *Desmodus* em relação aos grupos *Artibeus*, *Molossus* e *Anoura* ($p < 0,0001$) e valores maiores do grupo *Molossus* em relação ao grupo *Anoura* ($p < 0,0001$). Após a transformação para Log os resultados se apresentaram homocedásticos e paramétricos com resultados em média e desvio padrão. **D - Massa esplênica:** Valores menores os animais do grupo *Artibeus* em relação aos grupos *Desmodus*, *Molossus* e *Anoura* ($p < 0,0001$). Valores menores do grupo *Anoura* em relação aos grupos *Desmodus* e *Molossus* ($p < 0,0001$). Não houve diferença de valores entre os grupos *Artibeus* e *Anoura* e entre *Desmodus* e *Molossus*. Após a transformação para Log os resultados se apresentaram homocedásticos e paramétricos. Anova de 1 via com média e desvio padrão. **E – Massa renal:** Valores menores entre os animais do grupo *Molossus* em relação aos grupos *Artibeus*, *Desmodus* e *Anoura* ($p < 0,0001$). Não houve diferenças entre os valores dos grupos *Artibeus*,

Desmodus e *Anoura*. Após a transformação para Log os resultados se apresentaram homocedásticos e paramétricos. Anova de 1 via com média e desvio padrão. **F - Comprimento intestinal:** Valores menores entre os animais do grupo *Artibeus* e *Anoura* em relação aos grupos *Desmodus* e *Molossus* ($p < 0,0001$). Não houve diferenças entre os valores de *Artibeus* e *Anoura* e entre *Desmodus* e *Molossus*. Após a transformação para Log os resultados se apresentaram homocedásticos e paramétricos. Anova de 1 via com média e desvio padrão.

***Artibeus* (AR) n=13; *Desmodus* (D) n = 5; *Molossus* (M) n=6; *Anoura* (AC) n=5.**

7.5 – Morfologia e histomorfometria do pâncreas endócrino

Foi realizada uma **avaliação histológica** do pâncreas onde notou-se em todas as espécies, órgão constituído por porção exócrina e endócrina. No gênero *Artibeus* sp (frugívoro) e na espécie *Anoura caudifer* (nectarívoro), parece haver maior densidade de ilhotas por área de pâncreas, em maior tamanho e com variação no diâmetro das ilhotas. Por vezes foi possível observar nas ilhotas maiores e células beta em padrão linear. Na espécie *Desmodus rotundus* (hematófago) parece haver menor densidade de ilhotas por área de pâncreas e em tamanho intermediário se comparadas as ilhotas de *Artibeus*, *Anoura caudifer* e *Molossus molossus* (insetívoro). Na espécie *Molossus molossus*, pequenas ilhotas (as menores) foram também identificadas e, assim como em *Desmodus rotundus*, em pouca densidade por área de pâncreas (**Figura 11**).

Em relação a **massa pancreática (mg)** foram observados valores maiores estatisticamente significantes entre os animais do grupo *Desmodus* em relação aos grupos *Artibeus*, *Molossus* e *Anoura* com média e desvio padrão de 251 ± 34 mg em relação a 100 ± 10 , 69 ± 11 e 25 ± 4 mg, respectivamente ($p < 0,0001$). Valores maiores do grupo *Artibeus* em relação ao grupo *Anoura* ($p < 0,0001$). Também valores maiores do grupo *Molossus* em relação ao grupo *Anoura* ($p < 0,001$) e valores maiores do grupo *Artibeus* em relação ao grupo *Molossus* ($p < 0,01$) (**Figura 12A**).

Em relação a **massa relativa de ilhotas** foram observados valores menores entre os animais do grupo *Desmodus* em relação aos grupos *Artibeus* e *Anoura* com mediana resultante do grupo *Desmodus* em 1,9% em relação aos 4,8 e 5,8% ($p < 0,05$ e $p < 0,01$), respectivamente. Valores menores do grupo *Molossus* em relação ao grupo *Anoura* ($p < 0,05$) com mediana resultante do grupo *Molossus* em 2,7% em relação aos 5,8% do grupo *Anoura* (**Figura 12B**).

Em relação a **massa absoluta de ilhotas** foram observados valores menores entre os animais do grupo *Anoura* em relação aos grupos *Artibeus* e *Desmodus* com mediana resultante do grupo *Anoura* em 1,5 mg em relação aos 4,7 mg e 5,0 mg ($p < 0,05$ e $p < 0,01$), respectivamente (**Figura 12C**).

Em relação a **massa absoluta de ilhotas normalizadas pela massa corporal** foram observados valores menores entre os animais do grupo *Artibeus* em relação aos grupos *Desmodus* e *Anoura* com mediana resultante do grupo *Artibeus* em 6,3 mg/100g p.c em relação aos 13,2 e 13,9 mg/100g p.c ($p < 0,01$), respectivamente (**Figura 12D**).

Em relação a **densidade de ilhotas/pâncreas**, foram observados valores maiores estatisticamente significantes entre os animais do grupo *Artibeus* (frugívoro) e *Anoura* (nectarívoro) em relação ao grupo *Molossus* (insetívoro), com medianas resultantes de 52 e 56 ilhotas por área fracional, respectivamente, em relação a mediana de 23 ilhotas por área fracional ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Não houve diferenças entre os grupos *Desmodus* (hematófago), com 30 ilhotas e *Molossus* e entre os grupos *Artibeus* e *Anoura* (**Figura 12E**).

Em relação ao **% de células alfa/ilhota** foram observados valores menores entre os animais do grupo *Artibeus* e *Anoura* em relação ao grupo *Desmodus* com medianas resultantes de 29% e 24%, respectivamente em relação aos 53% ($p < 0,05$ e $p < 0,01$), respectivamente. Não houve diferenças entre *Artibeus* e *Anoura* e entre os grupos *Desmodus* e *Molossus* (com 32%) (**Figura 12F**). Em relação a **% de células beta/ilhota** foram observados valores menores entre os animais do grupo *Desmodus* em relação ao grupo *Anoura* com mediana resultante do grupo *Desmodus* em 40% em relação aos 70% ($p < 0,01$). Não houve diferenças de valores entre *Artibeus* (com 66%), *Molossus* (com 64%) e *Anoura* bem como não houve diferenças entre o grupo *Desmodus*, *Artibeus* e *Anoura* (**Figura 12G**). Em relação ao **percentual (%) celular de alfa e beta/ilhota e distribuição celular** a **Figura 12H** compara o **% de células alfa e beta/ilhota** entre todos os grupos. Neste gráfico observa-se que o único grupo com valores de células alfa maiores aos valores de células beta foi no grupo *Desmodus*.

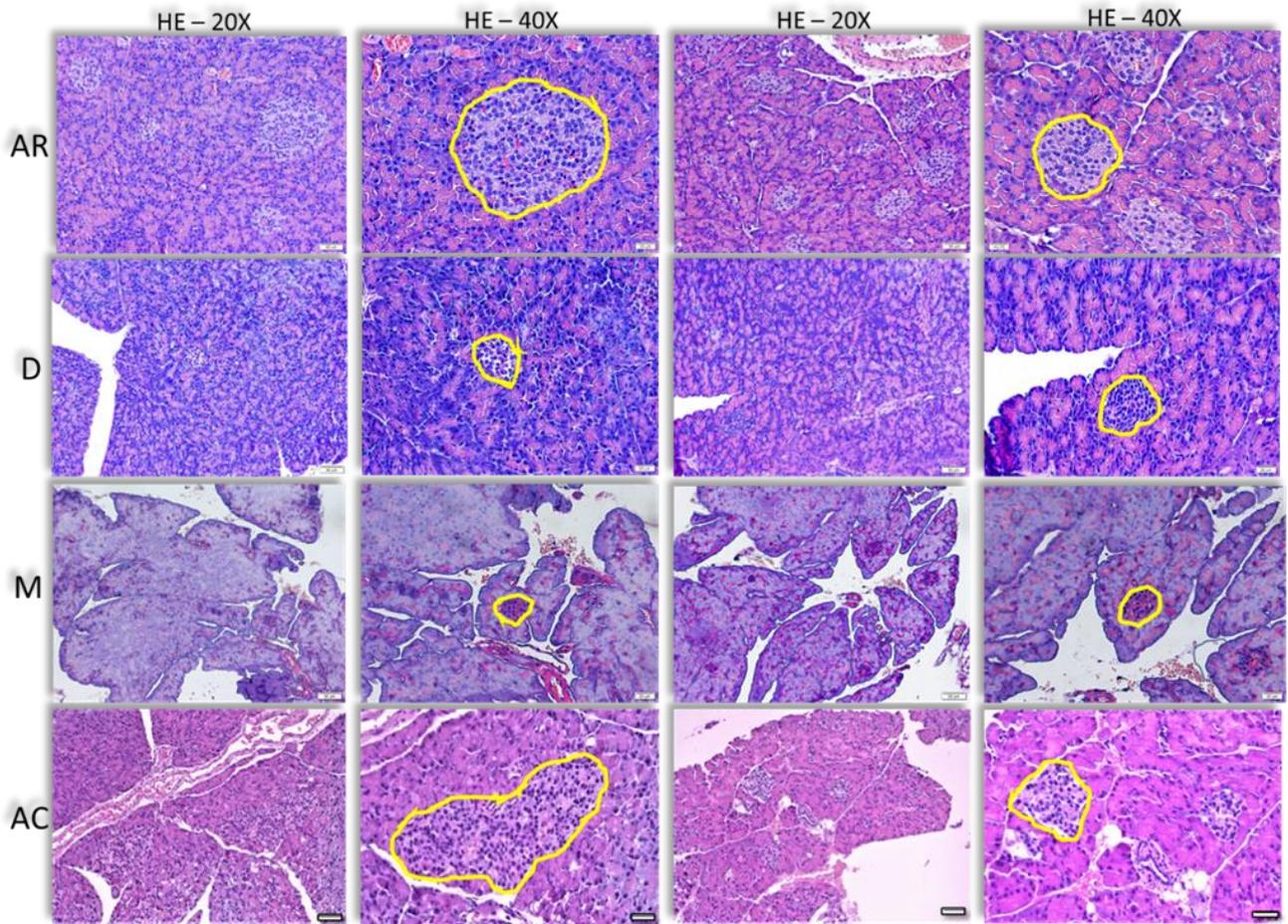


Figura 11: Pâncreas – Histologia Imagens representativas. Em círculo são destacadas Ilhotas Pancreáticas para comparação. Aparentemente maiores e mais numerosas em **AR** e **AC**. Em **D** e **M** aparentemente são menores e menos numerosas. HE: hematoxilina e eosina. Escalas: 20x = 50µm; 40x = 20µm. **AR** – *Artibeus* (frugívoro); **D** – *Desmodus rotundus* (hematófago); **M** – *Molossus molossus* (insetívoro); **AC** – *Anoura caudifer* (nectarívoro).

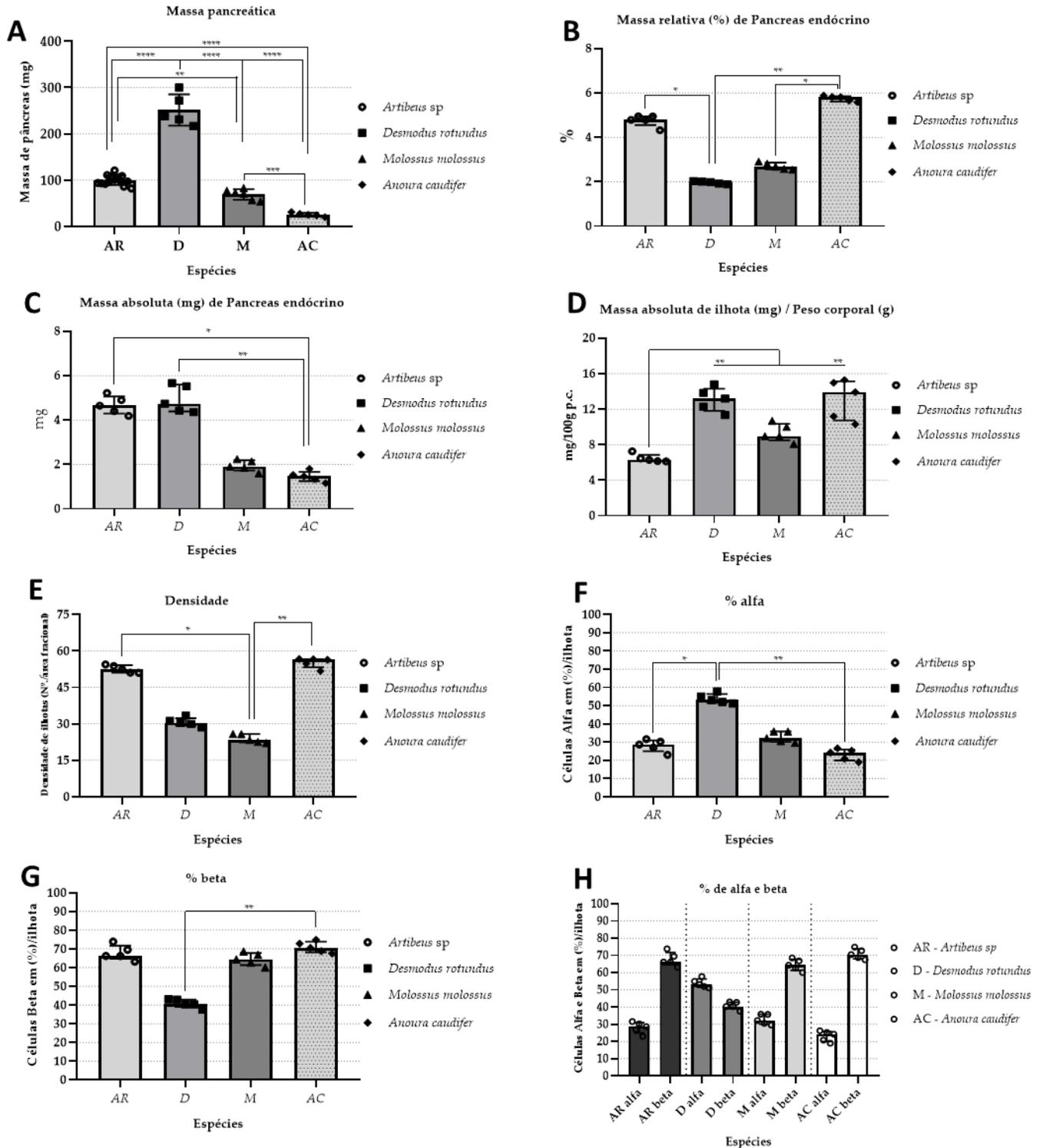


Figura 12: Histomorfometria do pâncreas endócrino A – **Massa pancreática:** Valores maiores entre os animais do grupo *Desmodus* em relação aos grupos *Artibeus*, *Molossus* e *Anoura*, ($p < 0,0001$). Valores maiores do grupo *Artibeus* em relação ao grupo *Anoura* ($p < 0,0001$). Valores maiores do grupo *Molossus* em relação ao grupo *Anoura* ($p < 0,001$) e valores maiores do grupo *Artibeus* em relação ao grupo *Molossus* ($p < 0,01$). Após a transformação para Log os resultados se apresentaram homocedásticos e paramétricos. Anova de 1 via com média e desvio padrão. B - **Massa relativa de ilhotas:** Valores menores entre os animais do grupo *Desmodus* em relação aos grupos *Artibeus* e *Anoura* ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) respectivamente. Valores menores do grupo *Molossus* em relação ao grupo

Anoura ($p < 0,05$). Após a transformação para Log os resultados se apresentaram heterocedásticos e não paramétricos e então foi analisado por Kruskal Wallis com mediana e intervalo interquartil. **C - Massa absoluta de ilhotas:** Valores menores entre os animais do grupo *Anoura* em relação aos grupos *Artibeus* e *Desmodus*, ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) respectivamente. Após a transformação para Log os resultados se apresentaram heterocedásticos e não paramétricos e então foi analisado por Kruskal Wallis com mediana e intervalo interquartil. Não houve diferenças entre os grupos *Molossus* e *Anoura* e entre *Artibeus* e *Desmodus*. **D - Massa absoluta de ilhota por massa corporal:** Valores menores entre os animais do grupo *Artibeus* em relação aos grupos *Desmodus* e *Anoura* ($p < 0,01$). Não houve diferenças entre *Artibeus* e *Molossus* e entre *Desmodus* e *Anoura*. Após a transformação para Log os resultados se apresentaram heterocedásticos e não paramétricos e então foi analisado por Kruskal Wallis com mediana e intervalo interquartil. **E - Densidade de ilhotas/pâncreas (n°./área fracional):** Valores maiores entre os animais do grupo *Artibeus* (frugívoro) e *Anoura* (nectarívoro) em relação ao grupo *Molossus* (insetívoro), ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) respectivamente. Não houve diferenças entre os grupos *Desmodus* (hematófago) e *Molossus* e *Artibeus* e *Anoura*. Após a transformação para Log os resultados se apresentaram heterocedásticos e não paramétricos e então foi analisado por Kruskal Wallis com mediana e intervalo interquartil. **F – Células Alfa/ilhota (%):** Valores menores entre os animais do grupo *Artibeus* e *Anoura* em relação ao grupo *Desmodus* ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) respectivamente. Não houve diferenças entre *Artibeus* e *Anoura* e entre *Desmodus* e *Molossus*. Após a transformação para Log os resultados se apresentaram heterocedásticos e não paramétricos e então foi analisado por Kruskal Wallis com mediana e intervalo interquartil. **G - Células Beta/ilhota (%):** Valores menores entre os animais do grupo *Desmodus* em relação ao grupo *Anoura* ($p < 0,01$). Não houve diferenças entre *Artibeus*, *Molossus* e *Anoura*. Após a transformação para Log os resultados se apresentaram heterocedásticos e não paramétricos e então foi analisado por Kruskal Wallis com mediana e intervalo interquartil. **H – Células Alfa e Beta/ilhota % nos grupos:** Comparativo de grupos com células alfa e beta. Grupo *Desmodus* com valores de células alfa superiores ao de células beta. **A = *Artibeus* (AR) n=13; *Desmodus* (D) n = 5; *Molossus* (M) n=6; *Anoura* (AC) n=5. B, C, D, E, F, G e H = *Artibeus* (AR) n=5; *Desmodus* (D) n = 5; *Molossus* (M) n=5; *Anoura* (AC) n=5.**

Os percentuais supracitados derivaram das imagens obtidas após imunomarcção pelo método de imunofluorescência (**Figuras 13 e 14**). Pelas análises qualitativas das ilhotas pancreáticas pudemos observar um predomínio de distribuição central para células beta (insulina) e periférica para as células alfa (glucagon). Embora em menor frequência, também foi possível identificar as células alfa localizadas em áreas mais centrais da ilhota tanto em *Artibeus lituratus* quanto em *Desmodus rotundus*.

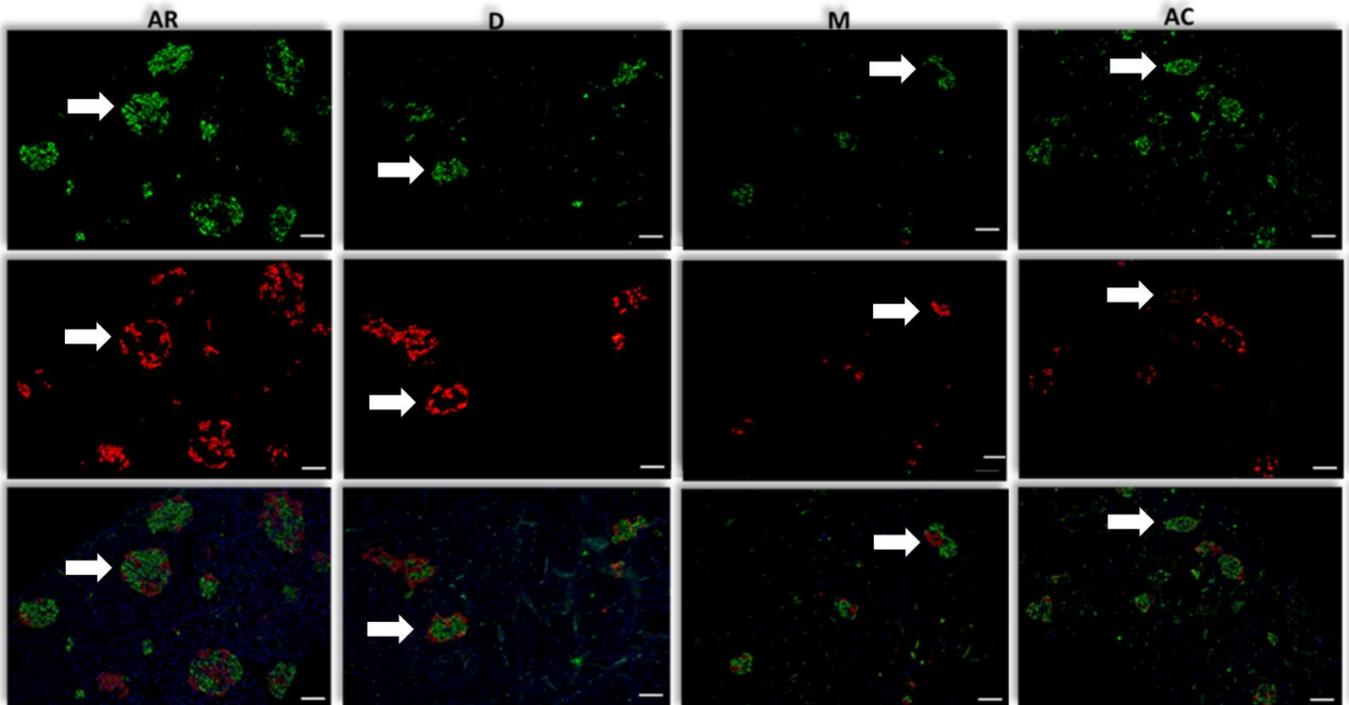


Figura 13: Pâncreas – Imunofluorescência - 20x com imunomarcção para ilhotas pancreáticas. Aparente maior densidade de ilhotas em AC e AR. Verde = insulina; Vermelho = glucagon; Azul = DAPI. Aumento em 20x; Escala = 50 μ m. AC – *Anoura caudifer* (nectarívoro); AR – *Artibeus* (frugívoro); D – *Desmodus rotundus* (hematófago); M – *Molossus molossus* (insetívoro). Setas: Ilhotas pancreáticas.

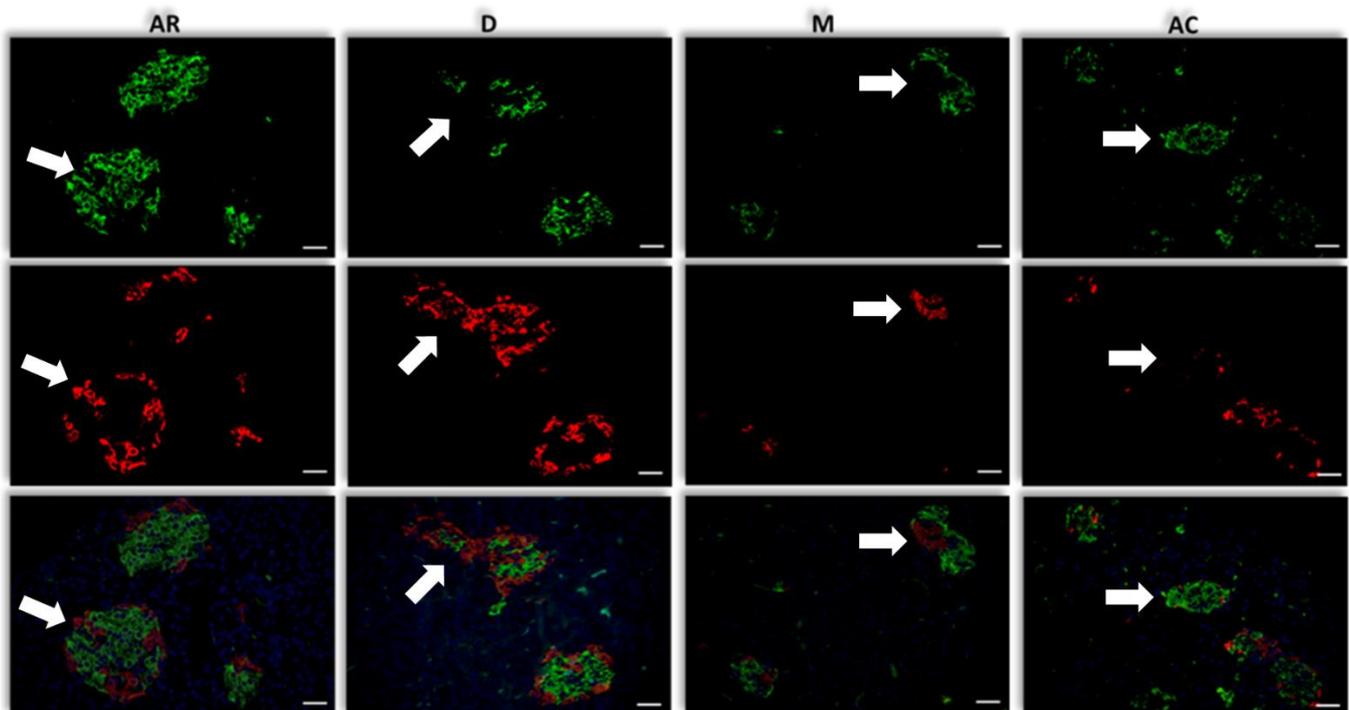


Figura 14: Pâncreas – Imunofluorescência - 40x com imunomarcção para ilhotas pancreáticas. Aparente maiores ilhotas em AR e menores em M. Verde = insulina; Vermelho = glucagon; Azul = DAPI. Aumento em 40x; Escala = 20 μ m. AC – *Anoura caudifer* (nectarívoro); AR – *Artibeus*

(frugívoro); D – *Desmodus rotundus* (hematófago); M – *Molossus molossus* (insetívoro). Setas: Ilhotas pancreáticas.

7.6 – Análises morfológicas: Histologia (HE e PAS), MET e MEV

7.6.1 – Histologia comparada: Fígado, Intestino e Musculo esquelético

Fígado (Figura 15): No geral, observou-se arquitetura padrão em todas as espécies apresentando disposição em paliçada de hepatócitos com sinusóides por vezes evidentes e pouca congestão. O padrão de lóbulo hepático é pouco definido com escassa quantidade de tecido conjuntivo. As tríades portais foram evidentes, com pouca deposição colagenosa.

Nos animais do gênero *Artibeus* (n = 15) ficou bastante evidente o padrão denominado “degeneração” glicogênica com áreas irregulares, caracterizadas pela presença difusa de conteúdo hídrico intracelular. Na coloração de PAS, pôde-se confirmar esse acúmulo de glicogênio.

Na espécie *Desmodus rotundus* (n = 9) essa característica foi pouco observada, com hepatócitos mais pálidos, sendo de modo mais sutil e de característica mais difusa. Ainda, em *Desmodus rotundus* notou-se discreto acúmulo de gotículas lipídicas também de padrão difuso, ora micro ora macrogoticular.

Na espécie *Molossus molossus* (n = 5) a característica notada em *Artibeus lituratus* também foi evidente, entretanto com localização preferencialmente multifocal e periportal, enquanto nos animais do gênero *Artibeus* esta mostrou-se com distribuição mais difusa no parênquima hepático. Na coloração de PAS, pôde-se confirmar este acúmulo de glicogênio periportal em *Molossus molossus*.

Em *Anoura caudifer* (n = 5) não foi realizada a coloração PAS mas nota-se semelhança de padrão em HE com *Artibeus lituratus*, principalmente ao que se refere ao padrão pálido e difuso de conteúdo hídrico intracelular, denominado de “degeneração” glicogênica.

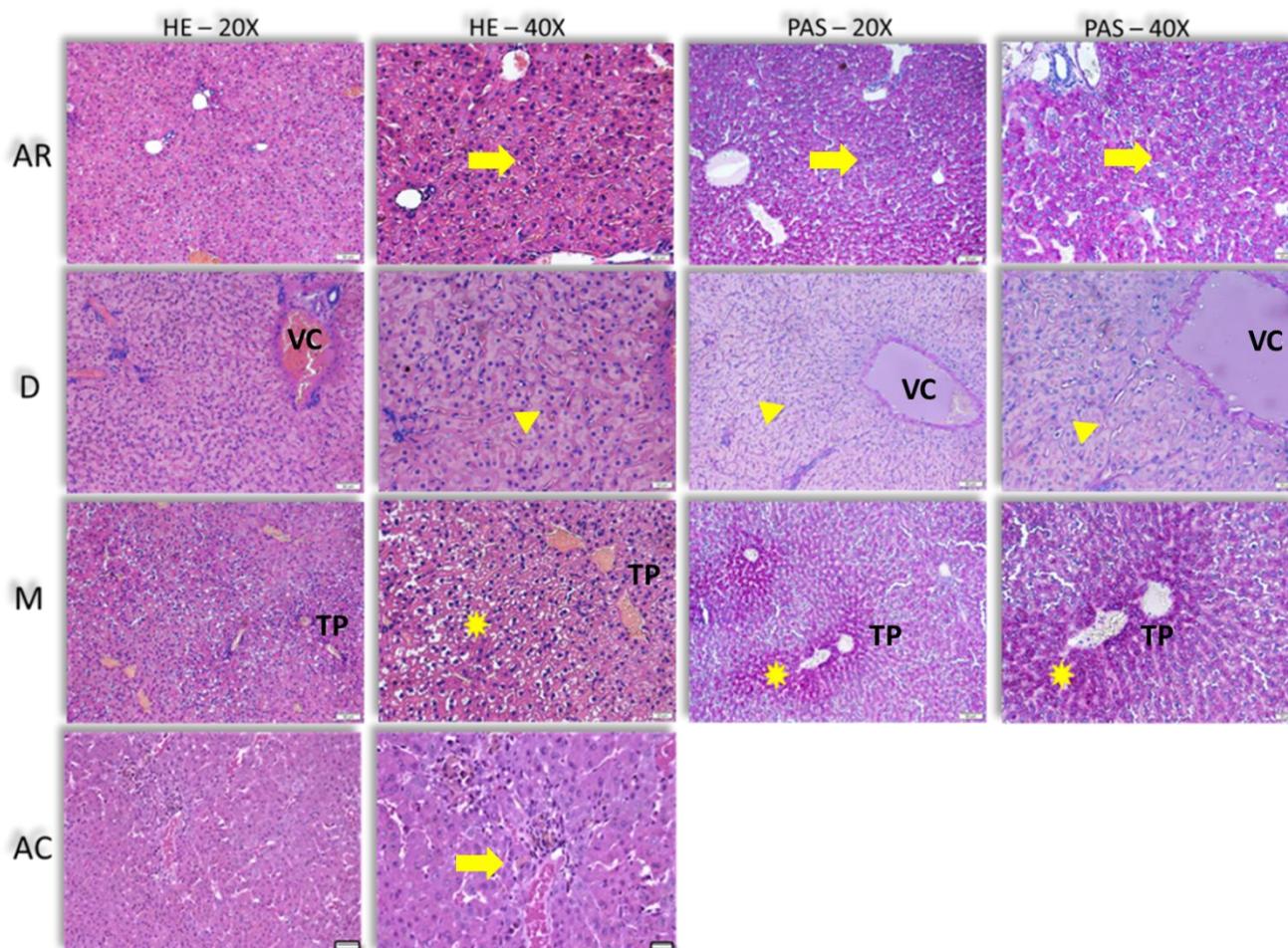


Figura 15: Fígado – Histologia. Imagens representativas. Em **M** nota-se, principalmente em PAS, acúmulo de glicogênio (área eosinofílica) periportal. Em **AR** o padrão em PAS é mais difuso. Em **D** cora-se fraca e difusamente. Em **AC** observa-se padrão semelhante (HE) ao grupo dos *Artibeus* com distribuição glicogênica difusa. PAS não realizado para espécie *Anoura*. HE: hematoxilina e eosina, PAS (Ácido periódico-Schiff). Escalas: 20x = 50µm; 40x = 20µm. **AR** – *Artibeus* (frugívoro); **D** – *Desmodus rotundus* (hematófago); **M** – *Molossus molossus* (insetívoro); **AC** – *Anoura caudifer* (nectarívoro). **Asterisco** = degeneração glicogênica focalmente intensas em HE e PAS. **Seta** = áreas difusas de degeneração glicogênica em HE e PAS. **Cabeça de seta** = áreas fracas ou ausentes de degeneração glicogênica. **TP** = Triáde portal; **VC** = Veia centrolobular

Intestino proximal (Figura 16): Em *Artibeus* sp, observou-se longas, delgadas e irregulares vilosidades, em aspecto de “zigue zague” com moderada quantidade de células caliciformes e epitélio simples em vilosidades, formado por células cilíndricas altas com núcleo basal e revestidas por camada evidente de glicocálice. Ductos lactíferos pouco evidentes. A mucosa se revelou estreita, com glândulas intestinais tipo mucosas presentes entremeio a esparsos leucócitos. Criptas intestinais não foram avaliadas.

Em *Desmodus rotundus*, verificou-se longas e irregulares vilosidades, mas diferentemente do que foi observado em *Artibeus*, estas apresentaram-se qualitativamente mais largas, com ductos

lactíferos por vezes dilatados (congestão sanguínea). Raras células caliciformes foram encontradas em epitélio de vilosidades. O epitélio se revelou do tipo simples cilíndrico, com células altas e núcleo basal. Folículos linfóides foram notados. Não foram analisadas criptas intestinais.

Em *Molossus molossus*, notou-se vilosidades qualitativamente mais curtas e mais regulares de aspecto digitiforme. O epitélio se revelou simples cilíndrico com abundante quantidade de células caliciformes em vilosidades. Notou-se, qualitativamente, mucosa mais espessa, com leucócitos e glândulas intestinais difusas. Não foram avaliadas criptas intestinais.

Em *Anoura caudifer* observou-se longas, muito delgadas e irregulares vilosidades, com epitélio simples cilíndrico de revestimento. Há menos tecido conjuntivo em lâmina própria de mucosa e submucosa, com aspecto apresentando deposição colagenosa mais frouxa.

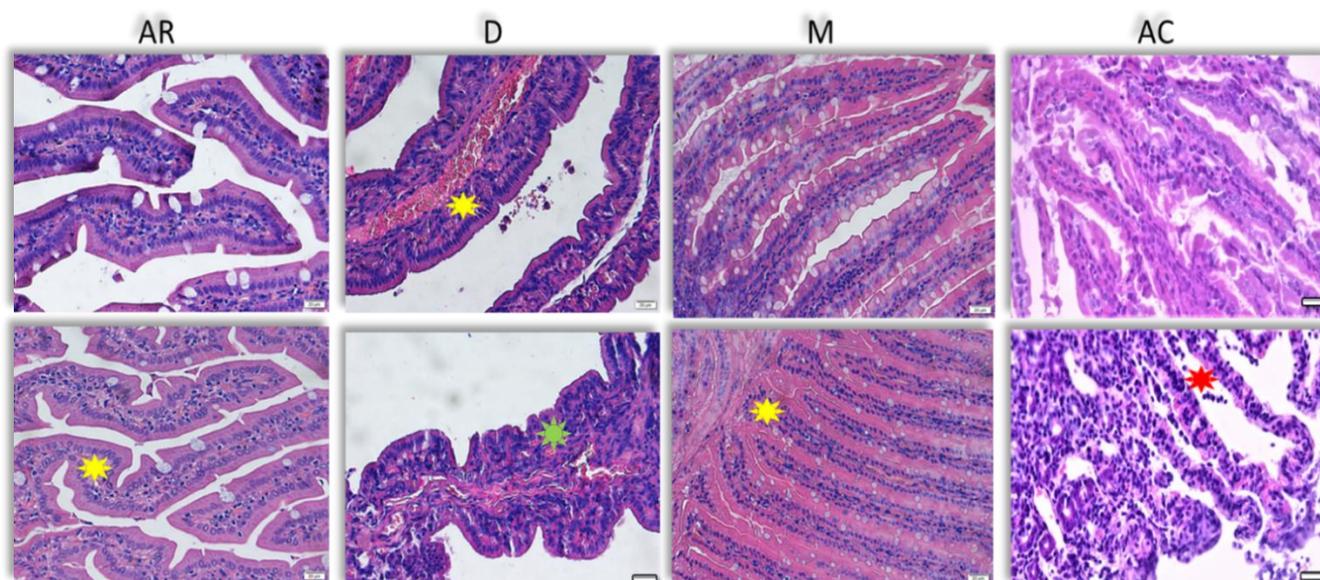


Figura 16: Intestino proximal – Histologia. Imagens representativas. Em **AR** observar padrão longo e delgado, em zigue zague com células caliciformes entre epitélio de vilosidades. Em **D** notam-se vilosidades longas e mais largas com ausência de células caliciformes em vilosidades. Em **M** observar vilosidades mais curtas, retilíneas e regulares. Em **AC** notam-se vilosidades com tecido conjuntivo muito frouxo. HE: Hematoxilina e eosina. Escala: 40x = 20 μ m. **AR** – *Artibeus* (frugívoro); **D** – *Desmodus rotundus* (hematófago); **M** – *Molossus molossus* (insetívoro); **AC** – *Anoura caudifer* (nectarívoro). **Asterisco amarelo** = Vilosidades intestinais. **Asterisco vermelho** = Vilosidade intestinais com pouco tecido conjuntivo. **Asterisco verde** = Vilosidades intestinais com escassas células caliciformes

Musculo esquelético (Figura 17): Notou-se padrão histológico semelhante entre as 4 espécies, caracterizado pela representação de miócitos multinucleados, com núcleos elipsóides e celularidade coesa. O tecido conjuntivo foi escasso. Entretanto, em comparação direta, em *Artibeus* sp, observou-se presença frequente, mas discreta, de tecido adiposo intramuscular (intermiocelular) em permeio as

fibras musculares. Esse fenótipo ocorreu de maneira similar em *Anoura caudifer* e *Molossus molossus*, entretanto não sendo observado em *Desmodus rotundus*.

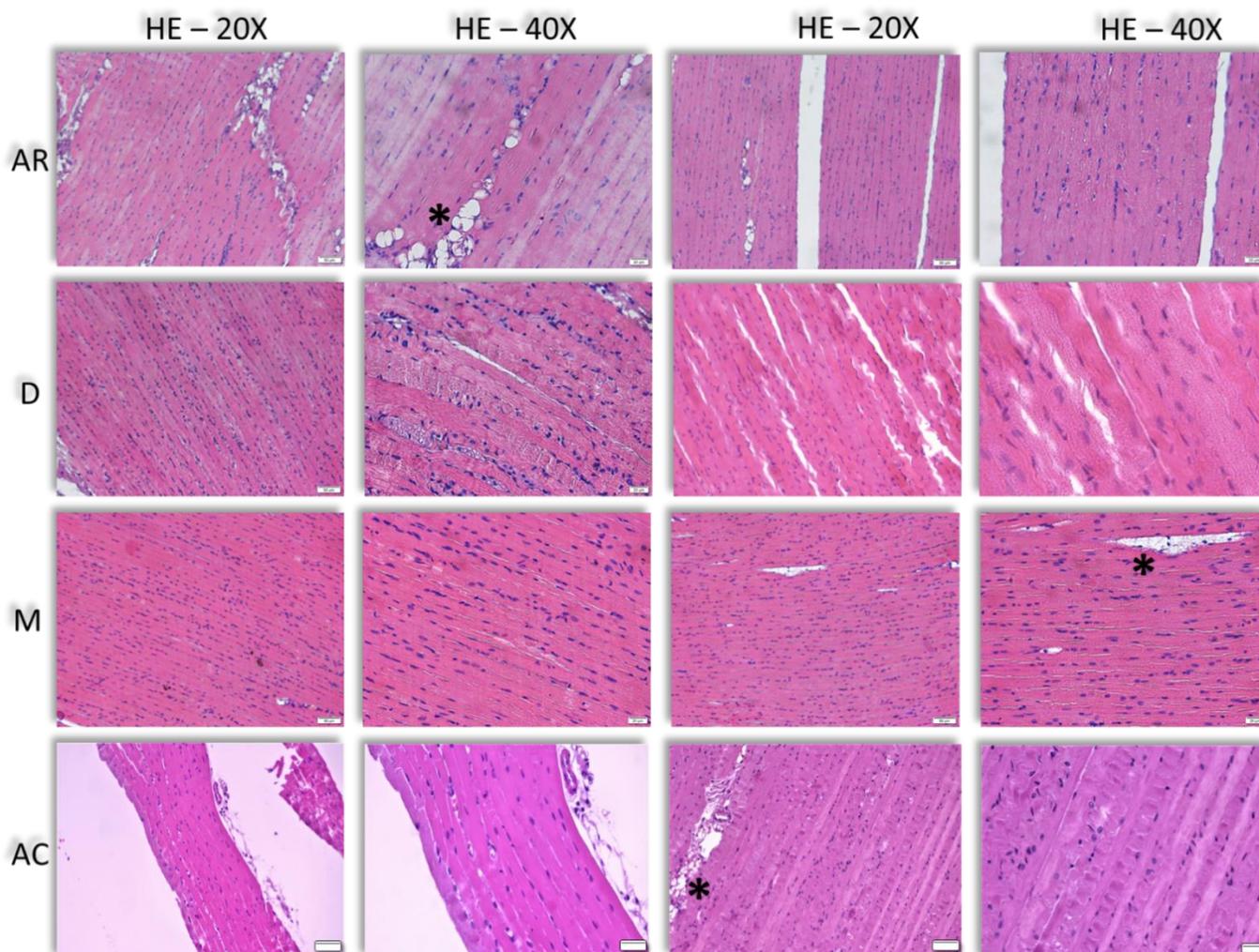


Figura 17: Musculo esquelético - Histologia Imagens representativas. Em AR e AC e M observar adipócitos em agrupados. Ausência de adipócitos em D. HE: hematoxilina e eosina. Escalas: 20x = 50µm; 40x = 20µm

AR – *Artibeus* (frugívoro); D – *Desmodus rotundus* (hematófago); M – *Molossus molossus* (insetívoro); AC – *Anoura caudifer* (nectarívoro). Asteriscos = Tecido adiposo intramuscular

7.6.2 - Microscopia Eletrônica por Transmissão (MET) comparada

Fígado (Figura 18): Amostras de fígado dos morcegos *Artibeus lituratus*, *Desmodus rotundus*, *Molossus molossus* e *Anoura caudifer* foram coletadas para análise em MET.

Em *Artibeus lituratus* (frugívoro) e *Anoura caudifer* (nectarívoro) e os hepatócitos foram compostos de inúmeras mitocôndrias, com citosol rico em ribossomos livres ou aderidos em retículo

endoplasmático rugoso. Foi identificado **intensos agregados de grânulos de glicogênio** (muito eletrodensos) distribuídos multifocalmente bastante compatíveis com partículas de **glicogênio do tipo alfa (α)**.

Em *Desmodus rotundus* (hematófago) foi identificado hepatócitos ricos em mitocôndrias, principalmente em posição perinuclear. No citosol foram identificados inúmeros ribossomos ora livres (maioria) ora aderidos a reticulo endoplasmático rugoso. Também pôde-se verificar pequenos e **moderados agregados de grânulos de glicogênio** (eletrodensos), distribuídos multifocalmente, sugestivo de partículas de **glicogênio do tipo alfa (α)**.

Em *Molossus molossus* (insetívoro) os hepatócitos também se revelaram ricos em mitocôndrias, entretanto em distribuição mais difusa e periférica ao núcleo. Ribossomos livres foram notados bem como telolisossomos (corpos residuais) eletrodensos contendo pigmentos de lipofuscina e/ou gotículas lipídicas. Gotas lipídicas livres também foram encontradas. Inúmeros **grânulos de glicogênio foram observados em citosol com distribuição bem difusa** e com menor densidade do que os observados em *Anoura caudifer*, *Artibeus lituratus* e *Desmodus rotundus*, sugerindo serem partículas de **glicogênio do tipo beta (β)**.

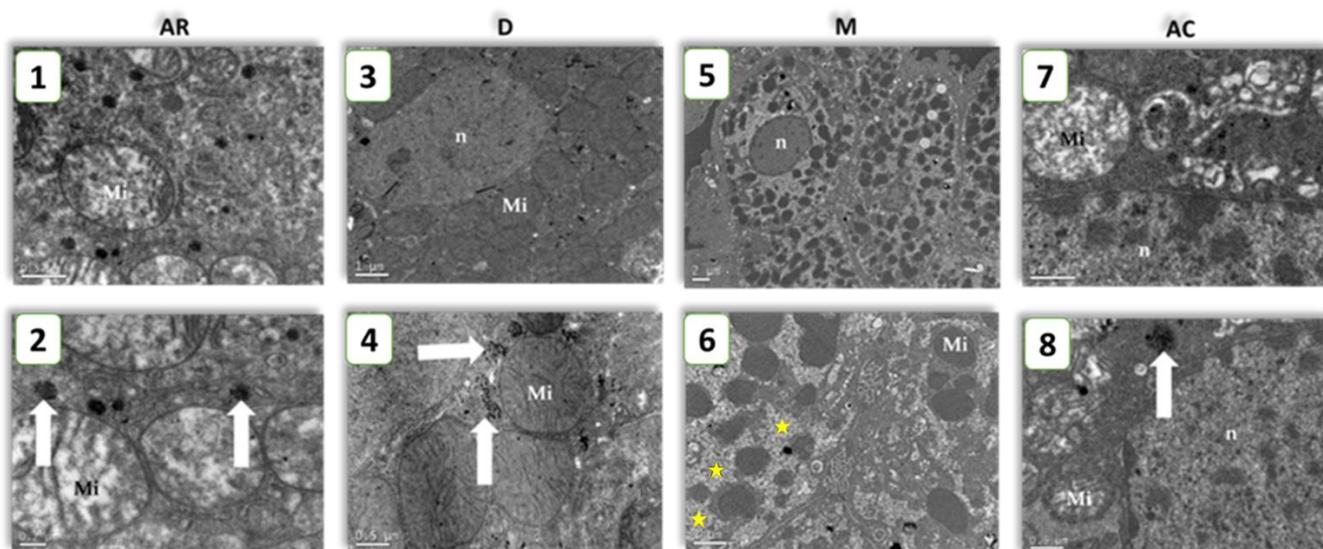


Figura 18: Fígado – MET Imagens representativas. **Setas:** Grânulos de glicogênio em agregados tipo α em **AR, D** e **AC** (2, 4 e 8). **Estrelas:** Grânulos de glicogênio difusos tipo β em **M** (6). Mitocôndrias (Mi); Núcleo (n). Escalas em 0,2, 0,5, 1 e 2 μ m. **AR** – *Artibeus* (frugívoro); **D** – *Desmodus rotundus* (hematófago); **M** – *Molossus molossus* (insetívoro); **AC** – *Anoura caudifer* (nectarívoro).

Pâncreas (Figura 19): Amostras de pâncreas dos morcegos *Artibeus lituratus*, *Desmodus rotundus*, *Molossus molossus* e *Anoura caudifer* foram coletadas para análise em MET. Em todas as amostras foram avaliadas porções do pâncreas exócrino.

Na espécie *Artibeus lituratus* (frugívoro) notou-se células acinares com inúmeras formações de grânulos de zimogênio **eletrodensos**, com grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, por vezes com cisternas dilatadas. Desmossomos foram flagrados em regiões laterais intercelulares. Mitocôndrias foram pouco comuns. Observou-se também células do endotélio vascular com ausência de grânulos de zimogênio, acúmulo mitocondrial em regiões perinucleares e lâmina basal (anexos).

Em *Desmodus rotundus* (hematófago) observou-se células acinares com inúmeros grânulos de zimogênio **eletrodensos** e elevada quantidade de retículo endoplasmático rugoso, por vezes com cisternas dilatadas. Mitocôndrias também foram notadas em posição perinuclear em pequenos grupos.

Em *Molossus molossus* (insetívoro) foi verificado uma posição mais basal dos grânulos de zimogênio, estes **fortemente eletrodensos**. Houve abundância de retículos endoplasmáticos rugosos e visualmente menor quantidade menor de mitocôndrias. Observou-se ainda espaços intercelulares com interdigitações. Também foram notadas esférulas bastante eletrodensas, com halo pálido, estas localizadas livres e entre os grânulos de zimogênio, sendo compatíveis com grânulos livres de origem endócrina. Esta co-localização de **grânulos “hormone-like”** e grânulos de zimogênio em célula acinar não foi observada em *Artibeus lituratus*, *Desmodus rotundus* e *Anoura caudifer*.

Na espécie *Anoura caudifer* (nectarívoro) nas células acinares observou-se grande quantidade de grânulos de zimogênio, porém com grande **variação de eletrodensidade** e **menores**, apresentando halo periférico menos eletrodenso e região central mais eletrodensa. Por vez vezes há deslocamento periférico nuclear. Também mitocôndrias foram notadas em maior número em posição perinuclear em médios a grandes grupos. Eram comuns os retículos endoplasmáticos rugosos em citosol.

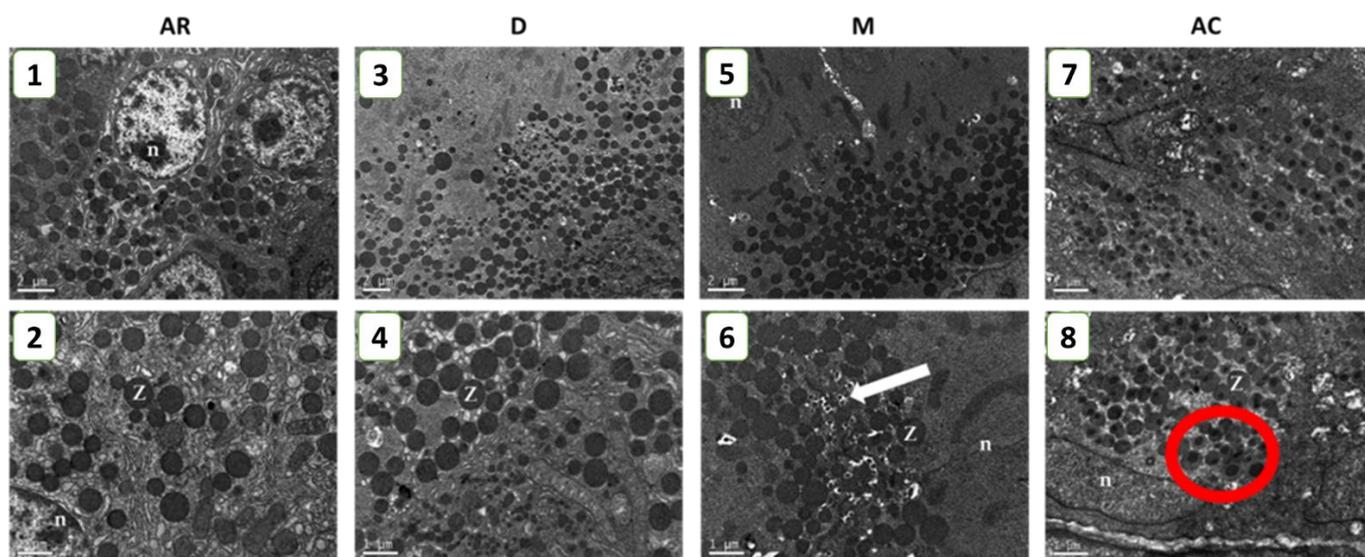


Figura 19: Pâncreas - MET Imagens representativas. Células pancreáticas exócrinas com inúmeros grânulos de zimogênio. Em **M** há presença de estruturas compatíveis com grânulos de “hormone-like”

(Seta, foto 6). Em AC notam-se grânulos de zimogênio com variação na eletrodensidade com menores diâmetros (Círculo, foto 8). Grânulos de zimogênio (Z); Núcleo (n). Escalas em 1 e 2µm. AR – *Artibeus* (frugívoro); D – *Desmodus rotundus* (hematófago); M – *Molossus molossus* (insetívoro); AC – *Anoura caudifer* (nectarívoro).

Intestino proximal (Figura 20): Amostras de intestino proximal dos morcegos, *Artibeus lituratus*, *Desmodus rotundus*, *Molossus molossus* e *Anoura caudifer* foram coletadas para análise em MET.

Em *Artibeus lituratus* (frugívoro) observou-se enterócitos coesos com **junções intercelulares evidentes (eletrodensas)**. As mitocôndrias foram notadas com frequência nas proximidades destas junções bem como em áreas mais perinucleares. As **microvilosidades se revelaram longas e delgadas** apresentando, visualmente, o maior comprimento dentre as 4 espécies estudadas.

Na espécie *Desmodus rotundus* (hematófago) observou-se enterócitos coesos com **junções intercelulares moderadamente evidentes**. As mitocôndrias foram numerosas, localizadas principalmente em região mais apical de citosol. As **microvilosidades se revelaram, visualmente, as mais curtas** apresentando menor comprimento dentre as 4 espécies estudadas.

Em *Molossus molossus* (insetívoro) observou-se enterócitos também coesos com **junções intercelulares menos evidentes (pouco eletrodensas)**. Mitocôndrias presentes em regiões mais apicais do citosol, bem como retículo endoplasmático rugoso. Vesículas de endocitose pouco eletrodensas e livres no citosol foram encontradas com frequência, por vezes, atingindo grandes dimensões. As **microvilosidades se revelaram intermediárias** apresentando, visualmente, o terceiro maior comprimento dentre as 4 espécies estudadas.

Em *Anoura caudifer* (nectarívoro), observou-se **junções intercelulares bem evidentes e destacadas (muito eletrodensas)**, notadas mesmo em menor aumento quando em comparação com outras espécies. As **microvilosidades se revelaram intermediárias e delgadas** em relação as demais espécies, apresentando, visualmente, o segundo maior comprimento dentre as 4 espécies estudadas.

De um modo geral, é importante frisar que a **maior eletrodensidade observada não significa necessariamente maior espessura** de membrana ou junções intercelulares intestinais.

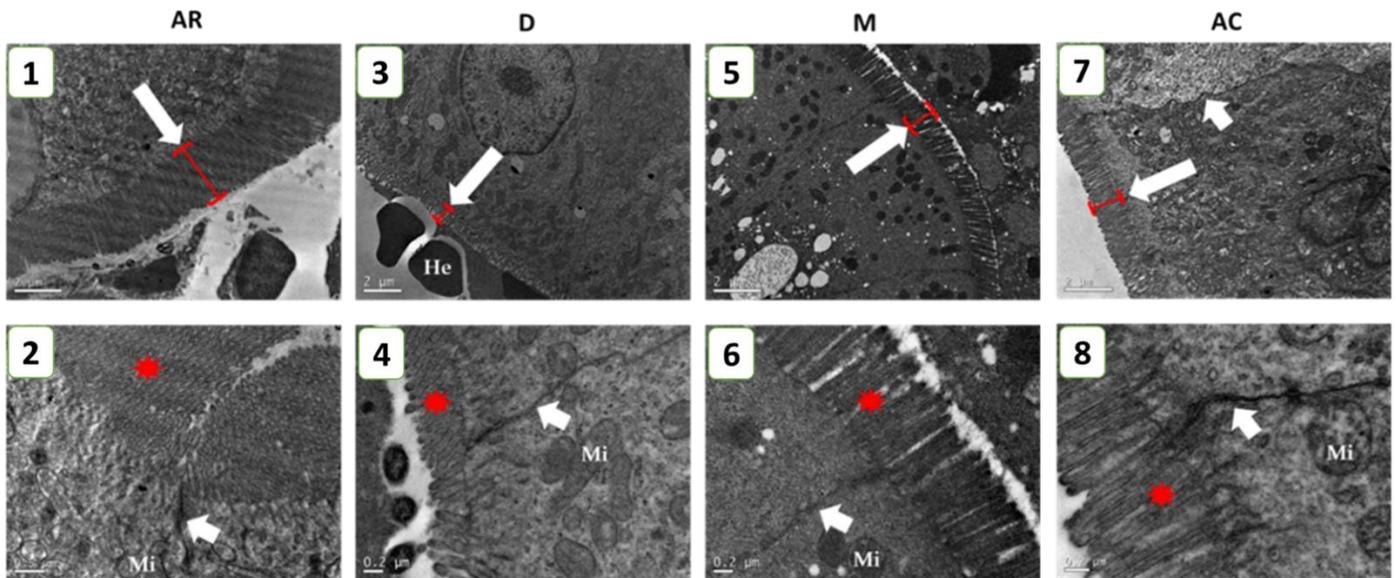


Figura 20: Intestino proximal - MET Imagens representativas. Em **AR** notam-se as mais longas microvilosidades (1 e 2), e em **D** as mais curtas microvilosidades (3 e 4). Em **AC** observa-se mesmo no menor aumento (7) junções intercelulares mais largas, eletrodensas ** e evidentes (8). Escalas em 0,2, 0,5 e 2 μm .

* maior eletrodensidade não significa necessariamente maior espessura. **Setas longas com barra e asteriscos** = Microvilosidades. **Setas curtas** = Junções intercelulares.

Hemácias (He); Mitocôndria (Mi). **AR** – *Artibeus* (frugívoro); **D** – *Desmodus rotundus* (hematófago); **M** – *Molossus molossus* (insetívoro); **AC** – *Anoura caudifer* (nectarívoro).

Musculo esquelético (Figura 21): Amostras de músculo esquelético do músculo peitoral dos morcegos *Artibeus lituratus*, *Desmodus rotundus*, *Molossus molossus* e *Anoura caudifer*, foram coletadas para análise em MET. Em todas as espécies foram caracterizadas miofibrilas formadas por sarcômeros típicos.

Em *Artibeus lituratus* (frugívoro) e *Anoura caudifer* (nectarívoro), verificou-se **elevada quantidade de mitocôndrias**, mas **rara quantidade de vacúolos lipídicos**. Há em ambos, **grânulos de glicogênio em agregados** (muito eletrodensos) distribuídos multifocalmente compatíveis com partículas de **glicogênio do tipo alfa (α)**.

Na espécie *Desmodus rotundus* (hematófago) observou-se **elevada quantidade de mitocôndrias** entre as miofibrilas musculares com **moderada quantidade de vacúolos lipídicos** em adjacências. Notou-se também **grânulos de glicogênio difusos inter e intramiofibrilares** dispostos multifocalmente, sugerindo serem partículas de **glicogênio tipo beta (β)**.

Em *Molossus molossus* (insetívoro) verificou-se **elevada quantidade de mitocôndrias** e também **elevada quantidade de vacúolos lipídicos**, estes por vezes dispostos entre as mitocôndrias. Observou-se **grânulos de glicogênio difusos intermiofibrilares** compatíveis com partículas de **glicogênio tipo beta (β)**.

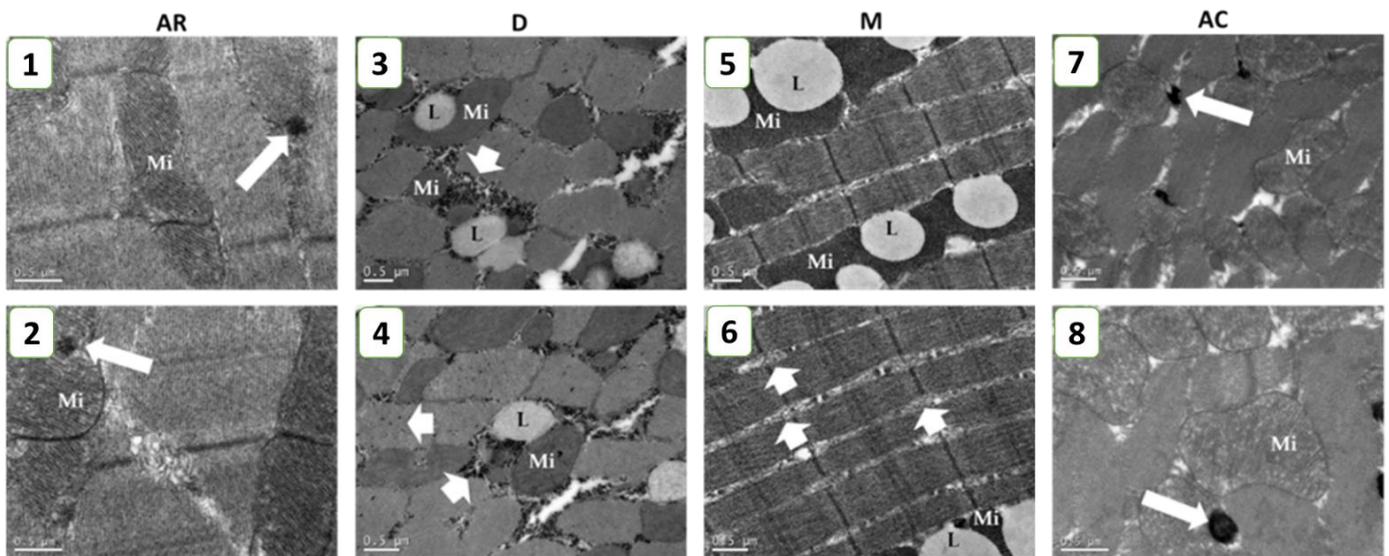


Figura 21: Musculo esquelético – MET Imagens representativas. **Setas longas:** Em AR e AC notam-se grânulos de glicogênio em agregados tipo α (1, 2, 7 e 8). Em D é difuso inter e intramiofibrilar (3 e 4). Em M é difuso intermiofibrilar (6). **Setas curtas:** Grânulos de glicogênio difuso tipo β (3, 4 e 6). Associação entre Vacúolos lipídicos (L) e Mitocôndrias (Mi) apenas em D e M (3, 4, 5 e 6). Escalas em 0,5 μ m. AR – *Artibeus* (frugívoro); D – *Desmodus rotundus* (hematófago); M – *Molossus molossus* (insetívoro); AC – *Anoura caudifer* (nectarívoro).

7.6.3 - Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV) comparada

Na análise por Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV) em intestino proximal, foram observadas as seguintes características nas espécies *Artibeus lituratus*, *Desmodus rotundus* e *Molossus molossus* (Figuras 22 e 23):

Em *Artibeus lituratus* (frugívoro) notou-se vilosidades projetando-se em direção ao lúmen intestinal com células caliciformes bem salientes entre epitélio de revestimento. Também se verificou uma ampla luz intestinal, demonstrando que as vilosidades ainda que longas, não alcançam regiões centrais do lúmen do órgão.

Em *Desmodus rotundus* (hematófago) observou-se vilosidades com superfície mais irregular, com pequenas e raras células caliciformes entre epitélio de revestimento, projetando-se em direção ao lúmen intestinal formando uma rede, de modo a tornar a luz do intestino mais estreita e menos visível.

Em *Molossus molossus* (insetívoro) notou-se disposição de vilosidades em posição intermediária entre *Desmodus rotundus* e *Artibeus lituratus*, ou seja, com o lúmen do intestino moderadamente amplo.

Não foi realizada Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) na espécie *Anoura caudifer* (nectarívora).

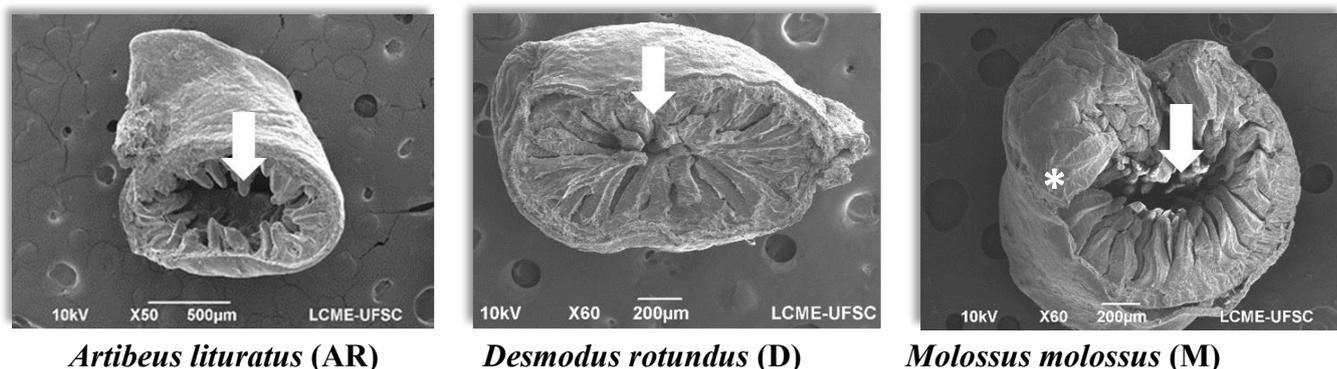


Figura 22: Intestino proximal transversal – MEV: Imagens representativas. **Setas:** **AR** – Amplo lumem; **D** – Lumem estreito; **M** – Lumem de moderada amplitude

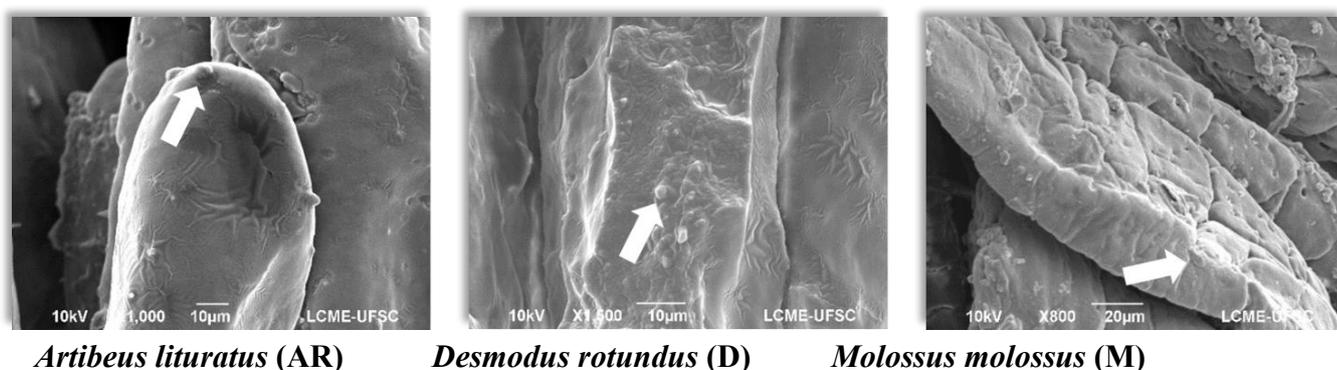


Figura 23: Intestino proximal longitudinal - MEV: Imagens representativas de vilosidades. **Setas:** Células caliciformes com aparente maior dimensão em **AR**.

7.7 – Sumarização dos Resultados obtidos

Os principais resultados obtidos estão representados nas Tabelas 3, 4 e 5 abaixo.

	Colesterol total	Triglicérides	HDL	LDL	Glicogênio hepático	Massa pâncreas	Massa fígado	Compr. Intestinal**
<i>Artibeus</i>	-	Menor	Maior	-	-	Menor	-	Menor
<i>Desmodus</i>	-	-	Menor	-	Menor	Maior	Maior	-
<i>Molossus</i>	Maior	-	-	Maior	Maior	-	-	Maior
<i>Anoura</i>	Menor	Maior	-	Menor	*	-	Menor	-

Tabela 3: Resumo dos principais resultados bioquímicos e de massa de órgãos.

* Não realizado ** Relação massa corporal/comprimento intestinal

	F Glic.	M Glic.	M Vacúolos Lipídicos e Mitocôndria associados	I Junção intercelular (eletrod.)	I Microvilosidade	P Eletrod. grânulos de zimogênio	P Co- localização end x exo
<i>Artibeus</i>	Alfa	Alfa	Não	Forte	Maiores: longas e delgadas	Forte	Não
<i>Desmodus</i>	Alfa *	Beta	Sim	Moderada	Menores: curtas e largas	Forte	Não
<i>Molossus</i>	Beta	Beta	Sim	Fraca	Intermediárias e largas	Muito forte	Sim
<i>Anoura</i>	Alfa	Alfa	Não	Muito forte	Intermediárias e delgadas	Heterogênea	Não

Tabela 4: Resumo dos principais resultados morfológicos (MET). F = Fígado, M = Musculo, I = Intestino, P = Pâncreas. Glic. = glicogênio; Eletrod. = eletrodensidade; end = endógeno; exo = exógeno *provável

	Pâncreas/mc (mg/100mg p.c.)	Ilhota/panc. (mg)	Ilhota/panc. (%)	Ilhota/mc (mg/100g p.c.)	Densidade *	Alfa/ilhota (%)	Beta/ilhota (%)
<i>Artibeus</i>	Menor	-	-	Menor	-	-	Maior
<i>Desmodus</i>	Maior	Maior	Menor	-	-	Maior	Menor
<i>Molossus</i>	-	-	-	-	Menor	-	-
<i>Anoura</i>	-	Menor	Maior	Maior	Maior	Menor	-

Tabela 5: Resumo dos principais resultados em ilhotas pancreáticas. mc = massa corporal; panc. = pâncreas * por 10000 pontos estereológicos contados.

1) Colesterol Total: No comparativo, os valores foram menores na espécie nectarívora (*Anoura caudifer*) e maiores na espécie insetívora (*Molossus molossus*).

2) Triglicérides: No comparativo, os valores foram menores na espécie frugívora (*Artibeus* sp.) e maiores na espécie nectarívora (*Anoura caudifer*).

3) Glicogênio muscular: No comparativo interespecie: não houve diferenças interespecíes. No comparativo intraespecie: os valores foram maiores que o glicogênio hepático na espécie hematófaga (*Desmodus rotundus*). Não houve mensuração do glicogênio muscular na espécie nectarívora (*Anoura caudifer*).

4) Glicogênio hepático: No comparativo interespecie: os valores foram maiores nos insetívoros (*Molossus molossus*) e menores nos hematófagos (*Desmodus rotundus*). Intraespecie: Nos frugívoros (*Artibeus lituratus*) e insetívoros estes valores foram maiores que o glicogênio muscular. Não houve mensuração do glicogênio hepático na espécie nectarívora (*Anoura caudifer*).

5) Massa pancreática relativa: Valores maiores nos hematófagos (*Desmodus rotundus*) e menores nos frugívoros (*Artibeus lituratus*).

6) Massa hepática relativa: Valores maiores nos hematófagos (*Desmodus rotundus*) e menores nos nectarívoros (*Anoura caudifer*).

7) Comprimento intestinal relativo: Valores maiores nos insetívoros (*Molossus molossus*) e menores nos frugívoros (*Artibeus lituratus*).

8) Grânulos de glicogênio – músculo e fígado (MET): Em ambos os órgãos é tipo alfa (α) nos frugívoros (*Artibeus lituratus*) e nectarívoros (*Anoura caudifer*). E tipo beta (β) em ambos os órgãos dos insetívoros (*Molossus molossus*). No grupo hematófago (*Desmodus rotundus*) é tipo beta (β) no músculo e provavelmente tipo alfa (α) no fígado, apresentando uma distribuição mais intermediária.

9) Vacúolos lipídicos x Mitocôndrias - músculo (MET): Não associados nos frugívoros (*Artibeus lituratus*) e nectarívoros (*Anoura caudifer*) e associados nos hematófagos (*Desmodus rotundus*) e insetívoros (*Molossus molossus*).

10) Grânulos de zimogênio - pâncreas (MET): Menos eletrodensos e menores na espécie nectarívora (*Anoura caudifer*).

11) Ilhotas pancreáticas (Histologia e Imunofluorescência): Ilhotas maiores na espécie frugívora (*Artibeus lituratus*), com a menor relação massa pancreática/massa corporal. Ilhotas menores na espécie insetívora (*Molossus molossus*) e hematófaga (*Desmodus rotundus*), esta última com a maior relação massa pancreática/peso corporal.

12) Junções intercelulares - intestino (MET): Mais eletrodensas nos frugívoros (*Artibeus lituratus*) e nectarívoros (*Anoura caudifer*).

13) Microvilosidades - intestino (MET): Maiores nos frugívoros (*Artibeus lituratus* - 1º) e nectarívoros (*Anoura caudifer* - 2º) e menores nos hematófagos (*Desmodus rotundus*).

14) Vilosidades – intestino (HE): Mais longas nos frugívoros (*Artibeus lituratus* - com o menor comprimento intestinal) e mais curtas no insetívoro (*Molossus molossus* - com o maior comprimento intestinal).

15) Co-localização de grânulos endócrinos em célula acinar – pâncreas (MET): Presente nos insetívoros (*Molossus molossus*).

16) Massa de ilhotas/pâncreas: Os hematófagos (*Desmodus rotundus*) apresentam não somente o maior valor de massa de pâncreas/massa corporal, mas também maior massa de ilhotas em valores absolutos (mg). Em contrapartida o % de massa de ilhotas/pâncreas é o menor nesta espécie.

Os morcegos com dietas ricas em carboidratos (*Artibeus lituratus* e *Anoura caudifer*) são o oposto, com os menores valores de pâncreas/massa corporal e também os com menores valores de massa de ilhotas em valores absolutos (mg). Em contrapartida o % de massa de ilhotas/pâncreas são os maiores, bem como as relações ilhota/massa corporal.

17) Densidade de ilhotas: Maiores nos morcegos com dieta rica em carboidratos (*Artibeus lituratus* e *Anoura caudifer*). Menores nos morcegos com dieta rica em proteína (*Desmodus rotundus* e *Molossus molossus*)

18) Proporção de células alfa e beta/ilhota: Células beta mais abundantes nas espécies com dieta rica em carboidrato (*Artibeus lituratus* e *Anoura caudifer*), inclusive no morcego insetívoro (*Molossus molossus*). Células alfa mais abundantes somente nos hematófagos (*Desmodus rotundus*).

8 – Discussão

Em todas as espécies os animais foram submetidos a um jejum de curta duração de aproximadamente 8 h, mimetizando uma situação de repouso diurno (semi-torpor) que estes animais apresentam fisiologicamente durante o dia. Portanto, **não** consideramos aqui que os resultados foram consequências de testes de jejum forçado e sim de repouso diurno fisiológico.

Dada a complexidade para discutir os dados numa única plataforma, optamos por fazer uma discussão em 4 tópicos.

8.1 - Perfil lipídico

Em nosso estudo, observamos os maiores valores de colesterol circulante nos morcegos da espécie *M. molossus* (insetívoros) em relação aos morcegos do gênero *Artibeus* (frugívoros), *Anoura* (nectarívoros) e *Desmodus* (hematófago), enquanto a espécie *A. caudifer* (nectarívoros) apresentou os maiores valores de triglicerídeos circulantes em relação as outras 3 espécies avaliadas.

É de conhecimento que a dieta de **morcegos insetívoros** é rica em lipídeos e proteínas sendo considerada uma dieta complexa, com importante valor energético (Kunz, T.H, *et al.*, 1995). Esse padrão de colesterolemia elevado foi demonstrado previamente em morcegos insetívoros (*Tadarida brasiliensis*) (Widmaier *et al.*, 1996). Os valores de colesterol total entre os morcegos insetívoros podem também ser variáveis dependendo da época do ano (Redford K.H., *et al.* 1984). Em épocas de abundância de insetos esses animais sintetizam mais colesterol HDL o que os protegeria contra eventuais processos aterogênicos (Ross, *et al.*, 1993). Em nosso estudo os morcegos insetívoros de fato obtiveram o maior valor de colesterol, o maior de LDL e o segundo maior de HDL corroborando com

os dados de literatura. Existem algumas explicações potenciais para a aparente resistência aos efeitos da hipercolesterolemia como a presença de fatores circulantes não identificados que inibem a fixação do LDL ao endotélio ou previnem a oxidação das partículas de LDL (Ross, et al., 1993). Não se sabe exatamente qual o mecanismo pelo qual o colesterol plasmático nos morcegos insetívoros se dá, mas especulamos que se deva a maior fonte deste lipídeo na sua alimentação, colocando essa espécie num patamar superior para valores de colesterol. Vale ressaltar que num estudo conduzido por Gillett e col., 1985 os autores encontraram maiores concentrações de lipídeos plasmáticos em *Molossus molossus* que estariam relacionadas a composição atípica e elevada de colesterol e fosfolipídios na composição da membrana das hemácias destes animais insetívoros. Assim, os valores para colesterol total e frações podem ainda estar superestimados para *Molossus molossus*.

Num estudo conduzido por Widmaier e col. (1996) os autores observaram valores de triglicérides em morcegos insetívoros inferiores aos valores encontrados em morcegos frugívoros, nectarívoros e hematófagos por outros autores. Uma das explicações dadas pelos autores é de que os triglicérides estariam sendo direcionados para a formação de conteúdo oleaginoso por glândulas sebáceas que revestem as asas dos morcegos por meio de maior ativação da lipase lipoproteica. A outra explicação e de maior relevância é de que os autores utilizaram apenas fêmeas nas análises, onde algumas estavam gestantes, outras em fase pós-gestacional e outras em lactogênese, processos esses que claramente ativam a lipase lipoproteica com consumo de triglicerídeos na produção de leite (Widmaier *et al.*, 1996). Em nosso estudo o grupo dos insetívoros era formado apenas por machos e apresentaram o segundo maior valor médio de triglicerídeos entre os grupos.

Fator também importante a ser considerado é que o ato de forrageamento dos morcegos insetívoros é mais custoso energeticamente em relação ao dos frugívoros e hematófagos, pois eles precisam alcançar suas presas (que também voam) e consumi-las em grande quantidade. Adiciona-se a migração sazonal de insetos, particularmente em épocas secas e/ou frias, e com a escassez alimentar acaba-se sendo necessária uma boa reserva energética para os morcegos insetívoros, visto que estes têm dieta exclusiva de insetos.

Os **morcegos nectarívoros**, por exemplo, possuem menores reservas de gordura ao longo do ano, enquanto morcegos insetívoros apresentam maior variação anual (sazonal), quando comparados a animais com diferentes hábitos alimentares (Redford K.H., *et al.* 1984). Em nosso estudo observamos os maiores valores de triglicerídeos na espécie nectarívora. Uma das possíveis explicações pode estar relacionada ao elevado custo energético de voo, em particular nesta espécie que é única em realizar voos pairados ou librados para se alimentar, principalmente na época de floração (exatamente o período que os animais foram coletados). Amaral e col (2019) por exemplo, observaram menores

reservas lipídicas em morcegos nectarívoros após 18 h de jejum indicando que eles possuem boa capacidade de oxidação de lipídeos para atender as elevadas demandas energéticas. Não sabemos se estes animais possuem um bom aparato hepático lipogênico *de novo* (LDN), haja vista que a fonte de açúcares presente em néctar (ex, sacarose, frutose e glicose) serviria de substratos energéticos para a LDN. Contudo, é interessante notar que a faixa dos triglicerídeos plasmáticos esteve no mesmo patamar dos morcegos hematófago (*D. rotundus*) e insetívoro (*M. molossus*) e, todos, em valores bem superiores a espécie frugívora (*A. lituratus*).

Vale destacar que voos pairados ou librados, como os executados por morcegos nectarívoros, exigem enorme trabalho cardiovascular durante o momento da obtenção do néctar, tornando a fonte de lipídeos importantes não apenas como substratos energéticos, mas também como possível componente cardioprotetores dependendo do perfil de insaturação dos ácidos graxos.

Além disso, com a menor massa corporal do grupo (± 11 g) e sendo considerado um dos menores mamíferos do mundo, nos nectarívoros há maior perda de calor por convecção e irradiação térmica em relação aos outros grupos, onde a gordura atuaria como um importante isolante térmico (tecido adiposo não foi avaliado neste estudo). Assim, e como pronta fonte energética, o elevado nível de triglicérides que encontramos nos nectarívoros pode ter relação com a abundância de flores na época que os animais foram coletados quando estes animais apresentam elevado custo energético de voo. Nessa linha, os valores de triglicerídeos dos insetívoros, com massa corporal média também de apenas ± 17 g, se revelou em patamares próximos aos encontrados nos nectarívoros.

Assim, sugere-se que os morcegos nectarívoros tenham um elevado fluxo de lipídeos circulantes durante épocas de fartura alimentar (verão e primavera), quando o suporte energético para manter os voos pairados para buscar alimento é mais relevante que o isolamento térmico. Nas épocas de menor floração (outono/inverno), parece ocorrer o oposto, com diminuição dos valores de triglicerídeos plasmáticos e maior armazenamento de lipídeos em tecido adiposo (para o isolamento térmico). Redford e col. (1984) já afirmavam sobre a variação de reservas lipídicas em morcegos insetívoros e nectarívoros ao longo do ano por razões sazonais.

Nos **morcegos frugívoros**, que tem a maior massa corporal (± 72 g) dos grupos, cerca de quase 7 vezes maior que a massa corporal dos nectarívoros (± 11 g) e quase 4 vezes maior insetívoros (± 17 g), apresentou os menores valores de triglicérides. Há décadas sabe-se que a relação entre a taxa metabólica basal dos mamíferos endotérmicos (TMB, ml de O_2/h) e a massa corporal (M em g) é normalmente expressa como uma equação alométrica na forma $BMR = aM^b$, onde $b = 2/3$, e que de um modo geral demonstra que quanto maior a massa corporal menor a taxa metabólica basal (White, C. R., et al., 2003). Essa pode ser uma explicação dos baixos níveis plasmáticos de colesterol total,

triglicerídeos, LDL e VLDL encontrados nos morcegos frugívoros, apesar desse argumento poder se valer para as demais espécies também. Em nosso estudo, esta espécie apresentou os maiores valores de HDL. Cabe salientar que no caso dos morcegos frugívoros (*Artibeus* sp), na possível escassez sazonal de frutos para se alimentarem, estes podem ter sua dieta baseada em insetos também (diferentemente de *M. molossus* que é estritamente insetívoro). Por isso, os frugívoros são mais flexíveis em relação a dieta, assim como a disponibilidade de lipídeos circulantes. Ao encontro dessas informações metabólicas, Keegan e col. (1977) obtiveram resultados no morcego frugívoro *Rousettus aegyptiacus* em que demonstraram assimilação de glicose e frutose tão eficiente quanto em ratos Sprague-Dawley, sendo a assimilação da frutose antecedendo a de glicose.

Nessa linha de sustentação de que o custo energético pode estar relacionado com o perfil lipídico o **morcego hematófago** (*Desmodus rotundus*), forrageia principalmente mamíferos de grande porte. Das espécies estudadas, é a única que não depende apenas do voo para alcançar seu alvo, pois também tem a habilidade de rastejar no solo antes de fazer contato com a presa (por vezes a única durante uma noite) (Reis *et al.*, 2006). Com esta característica, e com a menor necessidade de precisão de voo para encontrar sua presa, é de se esperar que o custo energético para o voo dos hematófagos seja menor se comparado as espécies, que por exemplo, forrageiam insetos alados que dependem não só da precisão, mas também necessitam caçar dezenas de insetos em uma noite.

MacNab e col., 1973, avaliaram que vários fatores influenciam o armazenamento de gordura em morcegos hematófagos e relaciona-os principalmente aos seus hábitos alimentares. E da mesma forma, o custo energético de voo dos hematófagos também é menor se comparado aos voos pairados dos nectarívoros. Assim, sugerimos que os morcegos insetívoros (caça de insetos durante o voo, escassez de insetos em certas épocas do ano, sem flexibilidade dietética e composição das hemácias) e nectarívoros (manutenção de voo pairado/librado, grande exigência cardiorrespiratória e menor massa corporal,) tenham tido respectivamente os maiores valores colesterol total e triglicérides.

Há algumas evidências de que os hematófagos possuem baixa eficiência em promoção de lipólise, o que resultaria em menor abundância de substratos (ácidos graxos livres) seja para a beta-oxidação ou para a lipogênese hepática e posterior secreção de VLDL (Freitas *et al.*, 2003, 2005). A despeito dos morcegos hematófagos serem pouco adaptados ao jejum prolongado, vale ressaltar que nosso estudo impôs um jejum curto (previamente fartados com sangue *ad lib*), que talvez explique por que esses animais conseguiram apresentar um valor de triglicerídeos equivalente ao de outras espécies. Corroborando essa opinião, vale destacar que os morcegos hematófagos possuem estômagos capazes de distender e armazenar grandes quantidades de sangue; característica que aparentemente mascara o fato de que esses animais possam retardar a absorção e, portanto, não estão verdadeiramente em jejum

(Freitas e col. 2003 e Rouk e Glass, 1970). Isso é corroborado pelo maior valor glicêmico médio entre as 4 espécies estudadas. Além disso, *D. rotundus* tem uma adaptação comportamental única para lidar com o jejum onde morcegos do mesmo grupo participam da partilha recíproca de alimentos através da regurgitação do sangue entre si, permitindo que as forrageadoras mal-sucedidas sobrevivam a noite (Wilkinson, 1984).

Nossas análises ultraestruturais revelaram a presença de vacúolos lipídicos (VL) e mitocôndrias (M) em maior número em células de musculo esquelético (peitoral) nos animais com dieta proteica (insetívoros e hematófagos). Como estes dois grupos possuem dietas exclusivas, a presença desses complexos VL-M nos miócitos podem ser muito úteis como estoque e fornecimento de energia diante da inflexibilidade alimentar associada a eventual escassez de alimento ao longo do ano.

8.2 - Glicogênio hepático e muscular

Sabe-se que os animais que se alimentam de dietas com alto teor de proteína geralmente armazenam grandes quantidades de glicogênio hepático, mas os **morcegos hematófagos** são aparentemente uma exceção a essa regra (Freitas *et al.*, 2003, 2005). Esse resultado foi compatível com o presente estudo, com valores bem menores de glicogênio hepático dos hematófagos em relação aos insetívoros (cuja dieta é também rica em proteína) e em relação aos frugívoros. Estes morcegos hematófagos em geral quando não comem, não conseguem sobreviver por mais de 3 dias de jejum, não mantendo níveis adequados de glicose no sangue, com seus estoques hepáticos de glicogênio sendo de partida pelo menos 40% menores do que os de outras espécies de mamíferos (Botion *et al.*, 1992; Ben-Hamo *et al.*, 2012). Ben-Hamo e col., (2012) afirmaram também que estes animais possuem baixa eficácia na mobilização energética a partir de estoques lipídicos ou proteicos durante o jejum e que, portanto, o escasso armazenamento de glicogênio hepático seria prontamente utilizado.

Nos morcegos hematófagos a biologia e a busca por alimento são completamente diferentes das outras espécies. Eles costumam se aproximam de áreas rurais com criação de animais ou se alojam em áreas com mamíferos nas proximidades. A sazonalidade não tem grande interferência na população e/ou presença destes mamíferos, ao contrário do que ocorre com frutos, insetos ou até florações. Por isso, naturalmente os hematófagos convivem com pequenos períodos de jejum na natureza, o que justificaria ao menos em parte os limitados valores de glicogênio hepático. Neste caso, vai de encontro ao entendimento pelos biólogos de que animais que se alimentam com alto teor proteico na dieta possuem grandes estoques de glicogênio hepático (Karasov et al., 2007 e 2011). Mas o morcego hematófago é uma exceção a essa regra e que foi confirmada em nosso estudo. Portanto este menor glicogênio hepático observado no morcego hematófago em nosso estudo pode ter relação

com uma menor insulinemia e maior glucagonemia. É válido mencionar que as concentrações de insulina muito abaixo da encontrada nos *Artibeus sp.* podem indicar que a via anabólica dessa espécie é também menos robusta.

Aliado ao fator oferta de alimento supracitado, outra explicação para a falta de habilidade dos hematófagos em suportar jejuns mais longos é que o estômago destes é capaz de distender e armazenar grandes quantidades de sangue, ocorrendo absorção gradual, inclusive nos momentos de jejum (descanso), não necessitando de gliconeogênese imediata (Freitas e col. 2003 e Rouk e Glass, 1970). Após elevados tempos de jejum parece ser claro que o glicogênio muscular se torna a principal fonte de energia para manutenção do voo como no caso de *D. rotundus* (Ben-Hamo *et al.*, 2012). Além disso, como já mencionado, há uma adaptação comportamental única para lidar com o jejum onde morcegos do mesmo grupo participam da partilha recíproca de alimentos através da regurgitação do sangue entre si, permitindo que as forrageadoras mal-sucedidas sobrevivam a noite (Wilkinson, 1984).

No planeta, aproximadamente **70% de todas as espécies de morcegos são insetívoras** (Neuweiler, 2000), e eles provavelmente possuem a melhor resiliência entre os quirópteros frente aos jejuns prolongados. Freitas e col., 2010 demonstraram que o morcego insetívoro *Molossus molossus* mantém a glicemia constante durante 48 h de jejum, enquanto as concentrações de ácidos graxos livres permanecem inalteradas na circulação. Acredita-se que esses morcegos insetívoros mantenham as concentrações normais de glicose no sangue nas primeiras 48 h de jejum pela gliconeogênese provida pelo lactato (Freitas *et al.*, 2010).

Nos morcegos insetívoros o conteúdo de glicogênio hepático foi o maior dentre todas as espécies, onde parece que a grande capacidade de jejuns prolongados se relaciona com esta característica fisiológica (Ben-Hamo *et al.*, 2012). Em nosso estudo também observamos uma disposição mais acentuada e concentrada de glicogênio hepático em áreas periportais na espécie insetívora *Molossus molossus* (**Figura 15**) demonstrando maior proximidade com regiões vasculares, e assim um rápido fornecimento a circulação sanguínea.

Nossos dados revelaram que os insetívoros (e frugívoros também) possuem maior depósito de glicogênio hepático em relação aos depósitos musculares, e como já dito, apenas no hematófago ocorre o inverso. Essa capacidade dos insetívoros de armazenarem glicogênio hepático parece ser uma adaptação de sobrevivência aos momentos de escassez alimentar durante certas épocas do ano. Eles estão entre as espécies animais com a maior resistência a períodos de jejum prolongados, fato este já mencionado e comprovado por literatura (Freitas *et al.*, 2005; Ben-Hamo *et al.*, 2012). Por isso, possuem boa capacidade de estocagem de energia na forma de glicogênio hepático, com eficaz gliconeogênese durante os períodos de jejuns.

Os **morcegos frugívoros** armazenam quantidades relativamente grandes de glicogênio hepático em relação aos demais mamíferos (Protzek *et al.* 2010). Gonçalves-Neto e col., (2014) encontraram valores de glicogênio hepático de *Artibeus lituratus*, algo 4 vezes acima do que se observa em roedores como ratos Wistar. Pinheiro e col., (2006), concluíram que duas espécies de morcegos frugívoros, (*A. lituratus* e *A. jamaicensis*), mantiveram níveis relativamente estáveis de glicose no sangue após jejum de médio/longo prazo (2 a 6 dias), uma habilidade raramente vista entre os mamíferos. Esse desfecho parece estar relacionado aos grandes estoques de glicogênio hepático que desempenham um papel na manutenção da glicemia quando há escassez pelo alimento (Pinheiro *et al.* 2006). E em nosso estudo, os frugívoros tiveram o segundo maior nível de glicogênio hepático, atrás apenas dos insetívoros.

Os resultados dos glicogênios hepático e muscular dos morcegos nectarívoros *Anoura caudifer* não foram incluídos com motivos explicados no tópico “9 - Dificuldades encontradas”. Amaral e col., 2019 em estudo com o **morcego nectarívoro** *Glossophaga soricina* observaram que estes animais têm pouca reserva adiposa e de glicogênio hepático e muscular, obtendo energia principalmente de carboidratos diretos da dieta, com redução dos valores glicêmicos em até 40% em apenas 18 h de jejum. Sabe-se que nectarívoros, assim como beija-flores, possuem menor produção endógena de glicose e maior captação periférica de glicose pela dieta com uma das taxas metabólicas específicas de massa mais altas conhecidas (Suarez et al., 2011).

Em nosso estudo, observou-se ausência de diferenças estatísticas em relação ao **glicogênio muscular** entre as 3 espécies. Portanto o conteúdo de glicogênio muscular entre as 3 diferentes espécies evidencia que há uma faixa de reserva que independe da dieta, mas que no caso dos hematófagos os valores maiores de glicogênio muscular podem fazer a diferença visto que estes têm baixa eficiência na mobilização de glicogênio hepático.

Para complementar a avaliação dos glicogênios hepáticos e musculares dos grupos, realizamos de modo inédito uma análise (**Microscopia eletrônica de transmissão - MET**), das características ultraestruturais dos depósitos de glicogênio hepático e muscular nos **4 grupos** de morcegos (frugívoros, hematófagos, insetívoros e nectarívoros (**Figuras 18 e 21**)). Um **grânulo de alfa-glicogênio** é uma agregação semelhante a uma roseta de 5 a mais de 40 partículas de glicogênio com diâmetros resultantes de 90 a até mais de 200 nm. Um **grânulo de beta-glicogênio** é muito menor e se assemelha a um único ribossomo (15 a 20 nm), e um pouco menos denso em elétrons. Os diâmetros dos grânulos beta são de cerca de 30 nm (De Bruijn, W.C., 1973; Revel, J.P., 1960; Sullivan, M.A., 2010). Enquanto os **grânulos alfa** são mais comumente vistos em hepatócitos, e para armazenamento de curto prazo de grandes quantidades de glicose durante as fases anabólicas, os **grânulos beta** são

típicos das células do músculo esquelético ou cardíaco, que também podem apresentar poucos grânulos alfa (De Bruijn, W.C., 1973; Revel, J.P., 1960; Sullivan, M.A., 2010).

Pudemos observar que nos **morcegos frugívoros** e **nectarívoros** houve predomínio de glicogênio hepático e muscular do **tipo alfa** sugerindo que há rápida e eficaz mobilização de glicogênio. E nos **morcegos insetívoros**, observamos predomínio de glicogênio **tipo beta** sugerindo que há uma lenta e gradual mobilização de estoques de glicogênio, achado este que é compatível e condizente com a capacidade destes em resistir a longos períodos de jejum, uma das maiores dentre todas as espécies de morcegos (Pinheiro *et al.*, 2006; Ben-Hamo *et al.*, 2012). Tudo indica que nos insetívoros a presença de glicogênio beta em fígado e músculo sugere que esta espécie não o utiliza como recurso principal (mobilização baixa) durante jejuns de curta duração (que neste experimento foi de 8 h). Neste estudo, essa característica coincide com o fato de que as maiores concentrações de glicogênio hepático foram exatamente nos insetívoros.

Nos **morcegos hematófagos** o padrão observado foi um predomínio de glicogênio do tipo α em fígado (rápida mobilização) e glicogênio do tipo β (lenta mobilização) em musculatura esquelética, padrão ultraestrutural este semelhante ao encontrado na espécie humana. Isto vai ao encontro de dados de literatura onde o escasso estoque de glicogênio hepático nessa espécie é rapidamente consumido e que posteriormente o glicogênio muscular se torna a principal fonte de energia (Ben-Hamo *et al.*, 2012).

8.3 - Análises histológicas, imunofluorescências, comprimento intestinal, MET e MEV

As evidências histológicas e ultraestruturais obtidas em nosso estudo deixam evidente que os **morcegos frugívoros** (*Artibeus lituratus*) e **nectarívoros** (*Anoura caudifer*) possuem um aparato robusto para digestão e absorção diante de dietas ricas em carboidratos. Nestas espécies, demonstramos a ocorrência de junções intercelulares mais largas com eletrodensidades mais intensas (**Figuras 20-2 e 20-8**) em intestino proximal, sugerindo a presença de partículas orgânicas com atividade local. Isso se coaduna com maior quantidade de vesículas de pinocitose, indicando atividade transmembrana lateral que sugere possível absorção paracelular comparativamente mais ativa, mas não necessariamente mais espessa. Em alguns estudos, tanto o morcego *Rousettus aegyptiacus* (frugívoro do Velho mundo) quanto o *Artibeus lituratus* (frugívoro do Novo mundo), por exemplo, apresentaram elevadas taxas de absorção paracelular de carboidratos. Isso parece compensar seu trato intestinal relativamente curto (Caviedes-Vidal *et al.*, 2008; Keegan, 1977; Tracy *et al.*, 2007). Nessa linha, Makanya *et al.*, 2001, relataram que os espaços intercelulares entre os enterócitos no morcego frugívoro *Epomophorus wahlbergi* são relativamente grandes, consistentes com a absorção

paracelular. Eles notaram que as membranas celulares laterais possuíam modificações com elaborados processos citoplasmáticos interdigitantes, longos e tortuosos que aumentariam significativamente a área de superfície. Demonstraram também uma abundância de mitocôndrias no citosol adjacente as membranas laterais, que permitiria maior capacidade para o transporte de sódio ou nutrientes para espaços intercelulares em morcegos frugívoros (Makanya *et al.*, 2001). Nessa linha, há evidência de que esse fenótipo celular geraria maior gradiente osmótico impulsionando a absorção paracelular (Pappenheimer e Reiss, 1987).

Nos exames histológicos, longas vilosidades em segmento pós antropilórico de intestino proximal associadas a elevada quantidade de células caliciformes sugerem grande superfície absorptiva e elevada produção mucoproteica, principalmente nos frugívoros (**Figura 16**). Pelas imagens de MET encontramos também as maiores microvilosidades na espécie frugívora *Artibeus* (**Figuras 20-1 e 20-2**) indicando grande superfície nominal absorptiva em intestino proximal.

Em relação ao comprimento intestinal pudemos observar que os frugívoros e os nectarívoros apresentam de fato a menor relação comprimento intestinal/peso corpóreo dentre as 4 espécies, resultados todos que corroboram com dados prévios apresentados pela literatura científica corrente (Makanya *et al.*, 1997 e 2001) (**Figura 10F**). Do ponto de vista evolutivo, a alta permeabilidade intestinal que é permitida pela absorção paracelular é provavelmente menos seletiva do que a absorção de nutrientes mediada por transportadores transcelulares. Isso resulta, inclusive, na absorção de toxinas de material vegetal ou animal no lúmen intestinal (Diamond *et al.*, 1991), que seria um ônus evolutivo. Por outro lado, Pappeneheimer e col. (1993) sugeriram que a absorção passiva é seletivamente vantajosa porque demanda menor custo energético.

Para estes morcegos com dietas ricas em carboidratos, a suscetibilidade a toxinas hidrossolúveis resultantes da alta permeabilidade intestinal aumentaria os custos metabólicos para a desintoxicação e, portanto, seria uma pressão seletiva que limita a amplitude de seu nicho alimentar (Karasov *et al.*, 2011). Nosso estudo demonstra que a possível absorção de nutrientes por via paracelular não é um padrão geral em morcegos, e que está relacionado tanto ao comprimento/peso do tecido intestinal, quanto ao hábito alimentar, como pôde ser observado especialmente entre os morcegos com dietas ricas em carboidratos.

A dieta rica em carboidratos entre os frugívoros e nectarívoros, associada a necessidade de rápida obtenção energética por glicose, reservas lipídicas limitadas e customização do peso corporal devido a menor massa intestinal e de bolo fecal, corroboram a hipótese de que esses animais dependem de boa capacidade de absorção paracelular. Também garantem maior eficiência energética, dado o

custo para o voo, fatores que são observados de forma similar por exemplo em muitas aves (Keegan and Mödinger, 1979).

Em nosso estudo também observamos que os grupos de **morcegos insetívoros** (*Molossus molossus*) e **morcegos hematófagos** (*Desmodus rotundus*) apresentaram algumas particularidades em comum entre eles estando relacionadas a dietas ricas em proteínas. Os morcegos insetívoros *Molossus molossus*, apresentaram a maior relação comprimento intestinal/peso corpóreo entre as 4 espécies estudadas. Esta espécie demonstrou ter maiores microvilosidades em relação ao hematófago *Desmodus rotundus* comparáveis em tamanho as microvilosidades dos nectarívoros (**Figura 20**). Isto sugere que o insetívoro possui uma dieta mais complexa/sólida (inclusive lipídica) que intuitivamente exige maior superfície para digestão e absorção em relação a uma dieta líquida (sangue) dos hematófagos. Ainda, esse fenótipo intestinal em *M. molossus* parece ser resultante de um equilíbrio evolutivo no sentido de diminuir o volume fecal e/ou massa intestinal sobrecarregando assim o peso do animal, dificultando o voo e a caça aos insetos.

Há de fato algumas evidências de que os morcegos têm uma proporção maior de área vilosa em relação a área de superfície intestinal nominal quando comparada a mamíferos não-voadores. Makanya e col. (1997) hipotetizaram que a maior área de superfície vilosa em morcegos em comparação com mamíferos não-voadores é devido a um maior número de enterócitos com um aumento correspondente no número de junções celulares explicando em parte a absorção paracelular relativamente elevada em *R. aegyptiacus* (frugívoro). Ou seja, com isso é possível que processos de absorção intestinal paracelular também ocorram nos grupos com dietas ricas em proteína (insetívoros e hematófagos) ainda que em menor intensidade. Ressaltamos que não observamos absorção paracelular e que os indícios para tal fenômeno são indiretos. Portanto em nosso estudo há apenas a sugestão de tal atividade.

Em nosso estudo pudemos também observar em MET a presença predominante de mitocôndrias ora em região apical de citosol (próxima as microvilosidades) em *D. rotundus* e em *M. molossus* (**Figuras 20-3 e 20-5**) ora em regiões laterais de citosol, anexas as junções intercelulares em *A. lituratus*, corroborando o estudo de Makanya e col., (2001) onde observaram as mitocôndrias adjacentes as membranas laterais no frugívoro *Epomophorus wahlbergi* (frugívoro).

Em complemento aos dados de MET em intestinos, pudemos demonstrar que nos morcegos frugívoros e nectarívoros há um menor tamanho e menor eletrodensidade dos grânulos de zimogênio em pâncreas exócrino, sugerindo que a atividade parece ser menos ativa comparativamente aos grupos insetívoros e hematófagos (**Figura 19**). Em nosso estudo, este aspecto foi principalmente notável na espécie nectarívora *Anoura caudifer* demonstrado por grânulos de zimogênio menos eletrodensos

(heterogêneos) e menores (**Fig 19-7 e 19-8**). Claramente esse resultado morfológico verificado em MET é compatível com o hábito alimentar do grupo de morcegos nectarívoros que é o que apresenta menores teores proteicos/lipídicos em sua dieta e, portanto, menor exigência proteolítica e lipolítica durante a digestão. Isso demonstra novamente que o hábito alimentar destes grupos puderam influenciar as adaptações biológicas. Por exemplo, os morcegos que são restritos a dietas com maiores teores proteicos/lipídicos demandam aparatos digestivos mais robustos. Corroborando este racional, os hematófagos apresentaram a maior relação massa pancreática/massa corporal, indicando que o pâncreas exócrino desta espécie é bastante exigida nos processos digestivos.

Outra importante observação em foi a co-localização de grânulos endócrinos em regiões exócrinas acinares de pâncreas, flagrada pela MET. Em nosso estudo essa co-localização só foi observada no grupo insetívoro. Kim e col., (2009) já observou outros exemplos de co-localização deste tipo, em especial no mamífero africano Pangolim (família *Manidae*) que também são exclusivamente insetívoros e possuem escassas ilhotas na composição pancreática. Esse é um dado relativamente inédito no sentido de que não se espera encontrar essa configuração granular (contendo insulina) entre ácinos e certamente é um tema, no mínimo, controverso.

8.4 – Pâncreas e ilhotas pancreáticas: Massas, densidades e percentual celular de alfa e beta

Massa corporal, massas de pâncreas e massas de ilhotas

Em nosso estudo observou-se que os grupos que apresentam dietas ricas em proteína como os **morcegos hematófagos** (*Desmodus rotundus*) e os **morcegos insetívoros** (*Molossus molossus*) são aqueles que apresentam maiores valores de relação massa pancreática/massa corporal, que como especulamos, pode estar associado a maior exigência na digestão proteica/lipídica. Os morcegos hematófagos apresentaram o maior valor de massa absoluta de ilhotas (mg) por apresentarem de longe a maior massa pancreática, embora com valores estatisticamente iguais a massa absoluta dos frugívoros. Por outro lado, em termos de massa relativa de ilhotas (%) foram os que exibiram os menores valores, revelando o peso da massa exócrina e um aparato de ilhotas aparentemente menos demandado nesta espécie (**Figura 12A-C**). Por outro lado, os **morcegos nectarívoros** (*Anoura caudifer*) e os **morcegos frugívoros** (*Artibeus lituratus*) apresentaram os maiores valores de massa relativa de ilhotas (%) (**Figura 12B**), indicando uma maior demanda por ilhotas pancreáticas, já que os **morcegos insetívoros** (*Molossus molossus*) possuem uma massa exócrina equivalente a destas duas espécies.

A despeito dos nectarívoros apresentarem a menor massa absoluta de ilhotas (mg), isso parece ser completamente suficiente para sua demanda, haja vista que ao ser normalizada pela massa corpórea,

eles atingem os maiores valores entre as 4 espécies, mas estatisticamente igual aos valores dos hematófagos (**Figura 12D**). Interessantemente os frugívoros apresentam o menor valor desta relação e isto pode sugerir que as células beta e alfa sejam muito responsivas as variações de glicose sanguínea.

Os **morcegos nectarívoros** e **frugívoros** apresentaram os maiores valores de densidade (número de ilhotas por uma determinada área seccional) (**Figura 12E**), que coincide com as maiores massas relativa de ilhotas entre as 4 espécies aqui estudadas (~6% e 5%, respectivamente), demonstrando claramente a relação entre dieta rica em carboidratos e proporção de ilhotas no pâncreas. Michelmore, Keegan e col., 1998 demonstraram que o pâncreas do morcego frugívoro *Rousettus aegyptiacus* possui uma massa relativa de cerca de 9% sendo este um dado interessante do ponto de vista metabólico, haja vista que em humanos, primatas e roedores não mais do que 2% do volume pancreático é formado por tecido endócrino.

Em estudos conduzidos por Machado e col., (2013 e 2017) e Freitas e col., (2013) os autores encontraram ~3,5% de massa relativa de ilhotas no morcego insetívoro *P. personatus*, ~6% no morcego nectarívoro *A. geoffroyi*, ~4% no morcego hematófago *D. ecaudata* e ~1,6% no hematófago *D. rotundus*. Nossos dados vão ao encontro desses valores onde os nectarívoros e frugívoros também obtiveram os dois maiores valores de densidade e massa relativa de ilhotas, ficando os **morcegos hematófagos** (*Desmodus rotundus*) em terceiro lugar e os **morcegos insetívoros** (*Molossus molossus*) por último, ambos com dietas ricas em proteína. Assim, parece haver uma relação entre a dieta predominante e a proporção de ilhotas pancreáticas como pôde ser observado por outros autores que revelaram ~3,5% e ~6% de massa relativa de ilhotas nas espécies *Pteronotus personatus* (insetívora) e *Anoura geoffroyi* (nectarívora) (Machado-Santos et al., 2017). Esta elevada massa relativa de ilhotas (%), em especial nos morcegos frugívoros e nectarívoros, comparada aos valores encontrados em humanos (1 a 2%) e murinos (2 a 3%), pode ser entendida como uma adaptação biológica essencial para o manejo dos altos influxos de glicose durante absorção (maior nos morcegos frugívoros e nectarívoros e menor nos insetívoros e hematófagos) (Steiner et al., 2010).

Embora não tenhamos avaliado a função das células beta e alfa, é de conhecimento que a glicose é o principal estímulo para a secreção de insulina, tendo os aminoácidos especial importância na potencialização da secreção de insulina (Beardsall K. et al., 2006; Tirone et al. 2001). Nossos dados revelaram uma maior proporção de células beta nos **morcegos nectarívoros** (*Anoura caudifer*) e **morcegos frugívoros** (*Artibeus lituratus*), indicando uma relação de reciprocidade entre a pressão ambiental exercida pelo consumo de alimentos ricos em carboidrato e o aparato de células beta (**Figura 12G**). Ao encontro de nossa hipótese, os morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) apresentaram a menor distribuição percentual de células beta por ilhota (~40% vs. -65-70% nas demais espécies).

Essa menor proporção de células beta nos morcegos hematófagos (e maior de células alfa) talvez seja apenas resultado da pressão evolutiva causada pelo perfil dietético até porque os hematófagos apresentam uma menor capacidade a jejuns prolongados e menores valores de glicogênio hepático, dados estes encontrados em nosso estudo e que vão ao encontro dos dados de literatura. Quando comparamos por exemplo o teor da dieta de um insetívoro e um hematófago, sabe-se que o segundo apresenta dieta mais puramente proteica, tendo em vista que os insetívoros consomem concomitantemente maior carga lipídica oriunda do inseto. Ramos-Elorduy e col. (1997) observaram em estudo com valores nutricionais em insetos que em 78 espécies a média o teor de proteína foi de 71%, com 24% de lipídeos. Em sangue bovino o teor proteico é de cerca de 93,1% (Freitas et al., 2003).

Já o maior peso de células beta na composição das ilhotas pancreáticas foi demonstrada em morcegos frugívoros (*Rousettus aegyptiacus*) por Michelmore e col., (1998). Os autores encontraram 51% de células beta e 31% de células alfa, valores que encontram consonância em nosso estudo.

Em alguns marsupiais, a exemplo de alguns cangurus (*Macropus* sp. e *Megaleia* sp.), as células beta correspondem a apenas 10% do total das células dispostas nas ilhotas pancreáticas, e em alguns gambas sul americanos (*Didelphis* sp.) as células alfa também compõem a maior parte das células endócrinas no pâncreas, ultrapassando 50% (Steiner *et al.* 2010). Em aves granívoras, tal característica também parece se reproduzir (Palmieri *et al.*, 2014). Steiner *et al.*, 2010, ainda concluíram que diferenças nos requisitos metabólicos (vias e reservas corporais) e estados metabólicos (ex., jejum vs. alimentado) são mais determinantes para a composição celular (plasticidade) de uma ilhota pancreática do que condições intrínsecas no desenvolvimento das ilhotas entre as espécies.

De acordo com um estudo conduzido por Machado Santos e col., (2017) o **morcego insetívoro** *Pteronotus personatus* em análise de densidades de volume comparativas de ilhotas (%) de células imunorreativas à insulina (IR), células de glucagon-IR e células de somatostatina-IR observou-se ~35% de células beta e 26% de células alfa. Embora nossa espécie insetívora investigada (*Molossus molossus*) seja outra espécie, a proporção de células beta e alfa estão relativamente conservadas e equiparáveis (~65% de células beta e 32% de células alfa encontrado no *M. molossus*). É interessante notar que mesmo em espécies com dieta rica em proteínas o percentual de células beta/ilhota foi mais elevado em relação as células alfa em ambas as espécies, sugerindo maior complexidade na dieta insetívora, indicando que há também importante ingestão de carboidratos e gorduras, possivelmente devido a composição corpórea destes invertebrados.

Ainda no contexto da associação entre o hábito alimentar e o perfil de distribuição celular nas ilhotas pancreáticas, Palmieri *et al.*, 2014, observaram uma elevada variação na composição e

distribuição celular das ilhotas pancreáticas interespécies de aves rapinas com alimentação rica em proteína. Os autores relataram que tanto em aves rapinantes como em urubus, aves estas com dieta carnívora, há maior predomínio de células beta, principalmente de localização central, enquanto em aves granívoras foi observado maior predomínio de células alfa. Em galinhas, que são aves granívoras, por exemplo, as ilhotas pancreáticas em média são compostas de 80% de células alfa (Palmieri *et al.*, 2014). Ou seja, o perfil de distribuição de células endócrinas no pâncreas parece não estar sujeito apenas a influências dietéticas, mas acredita-se também que o estado metabólico exerça alguma influência na plasticidade celular.

Encontramos uma divergência em nossos achados com os achados produzidos por Machado Santos e col., (2017). Enquanto encontramos ~70% de células beta e ~24% de células alfa no *Anoura caudifer* (nectarívoro), o grupo supracitado encontraram maior percentual de células alfa na composição das ilhotas em outra espécie insetívora. Essa contradição exemplifica a complexidade da citoarquitetura das ilhotas pancreáticas no reino animal.

A despeito das variações no padrão de distribuição celular e da massa de ilhotas pancreáticas entre as espécies, é importante enfatizar que não avaliamos a função secretória das ilhotas frente aos substratos (ex., glicose, aminoácidos). Assim, não podemos afirmar categoricamente que as espécies frugívoras e nectarívoras são mais responsivas a glicose do que as demais espécies avaliadas aqui. Questões que merecem mais investigações.

9 – Conclusão

Os grupos de morcegos com dietas ricas em proteína como os hematófagos (*Desmodus rotundus*) e insetívoros (*Molossus molossus*) apresentaram não só maiores valores percentuais de células alfa (e menores de beta), como também as menores massas relativas de pâncreas endócrino e as menores densidade de ilhotas pancreáticas. Já os grupos com morcegos com dietas ricas em carboidratos como os frugívoros (*Artibeus lituratus*) e nectarívoros (*Anoura caudifer*) obtiveram os menores valores percentuais de células alfa (e maiores de beta) as maiores massas relativas de pâncreas endócrino e as maiores densidades de ilhotas pancreáticas. Todos esses indicativos **concordam com nossa hipótese inicial** de que a contribuição de ilhotas pancreáticas e células beta é menor nos grupos com dietas ricas em proteína e de que a contribuição de ilhotas pancreáticas e células beta é maior nos grupos com dietas ricas em carboidratos.

Os grupos de morcegos com dietas ricas em proteína como os hematófagos (*Desmodus rotundus*) e insetívoros (*Molossus molossus*) não apresentaram valores equiparáveis. Enquanto os

insetívoros possuem os maiores estoques de glicogênio hepático, os hematófagos apresentam os menores valores entre todos os grupos. Entretanto, os hematófagos compõem o único grupo que apresenta os maiores valores de glicogênio muscular em relação ao hepático. Os resultados relacionados a tipificação em MET dos grânulos de glicogênio são inéditos em morcegos. Os grupos de morcegos com dietas ricas em carboidrato (*Artibeus lituratus* e *Anoura caudifer*) dispõem de grânulos de glicogênio do tipo α sugerindo rápida mobilização e, portanto, menor capacidade de estoque com maior dependência de glicose exógena. Os morcegos com dietas ricas em proteína (*Desmodus rotundus* e *Molossus molossus*) dispõem de grânulos de glicogênio do tipo β , sugerindo lenta mobilização e, portanto, maior capacidade de estoque (com exceção do glicogênio hepático no hematófago que é tipo α). Esses resultados **concordam parcialmente com nossa hipótese inicial** de que animais com dietas mais ricas em proteína teriam abundantes reservas de glicogênio sendo mais aptos e jejuns prolongados.

Os grupos de morcegos com dietas ricas em carboidratos como os frugívoros (*Artibeus lituratus*) e nectarívoros (*Anoura caudifer*) apresentam grandes semelhanças em relação a morfologia intestinal. Ambos possuem os menores comprimentos intestinais relativos e as maiores eletrodensidades em junções intercelulares entre enterócitos. Também apresentaram robustas microvilosidades, principalmente o frugívoro. Já os grupos com dietas ricas em proteína como os hematófagos (*Desmodus rotundus*) e insetívoros (*Molossus molossus*) dispõem dos maiores comprimentos intestinais. Os hematófagos dispõem das menores microvilosidades e os insetívoros as mais curtas vilosidades. Todos esses resultados demonstram e sugerem que os morcegos com dietas ricas em carboidrato apresentam adaptações microscópicas e ultraestruturais (vilosidades, microvilosidades e junções intercelulares mais largas) que compensam o curto comprimento intestinal adequando-se a uma absorção intestinal mais eficiente para obtenção de energia. Os morcegos com dietas ricas em proteína apresentam comprimentos intestinais relativos maiores com adaptações microscópicas e ultraestruturais diferentes, como por exemplo as menores microvilosidades em hematófagos e as menores vilosidades em insetívoros. Esses resultados **não concordam com nossa hipótese inicial** de que animais com dietas mais ricas em proteína teriam maior complexidade intestinal.

Durante todo o processo evolutivo das espécies de morcegos que se iniciou há cerca de cinquenta milhões de anos, não somente a dieta, mas também o modo de se obter o alimento, a privação alimentar, a pressão ambiental e as características peculiares de cada ecossistema resultaram em adaptações morfológicas e bioquímicas únicas e diferentes dentro de cada grupo, ainda que estes sejam tão próximos filogeneticamente. Os morcegos frugívoros, nectarívoros, hematófagos e insetívoros

concentram e agregam adaptações morfofisiológicas ideais para cada hábito alimentar de modo que esse *imprint* alimentar de milhões de anos tornou-os tão distintos mesmo pertencendo a um ancestral em comum, gerando por isso uma divergência evolutiva natural. Animais com dietas ricas em carboidratos ou ricas em proteínas apresentam adaptações biológicas estruturais e funcionais que devem ser analisadas com cuidado e em conjunto com tecidos relacionados ao metabolismo e homeostase glicêmica como ilhotas pancreáticas, intestino, fígado e musculatura esquelética. Pressões seletivas diferentes gerando características estruturais e funcionais diferentes.

10 - Dificuldades Encontradas

1 - No projeto inicial, pensávamos em trabalhar com 5 espécies a fim de aprimorar as comparações. Entretanto houve dificuldades na obtenção de uma espécie piscívora. Essas dificuldades relacionaram-se não só pela quantidade mínima de indivíduos que seriam necessários, mas também por ser uma espécie que forma colônias de difícil localização (normalmente são encontrados indivíduos solitários ocasionais). E também por dificuldades técnicas. O piscívoro por exemplo seria necessário a instalação de redes de neblina sobre rios ou lagos.

2 – A coleta de sangue foi outra dificuldade encontrada. Em *Artibeus* sp. pudemos realizar sem problemas as punções em veias da asa para os testes de ITTip e GTTip, porque estas espécies além de uma maior massa corporal foram menos agitadas, se adaptando bem em gaiolas e ao cativeiro. Em compensação não conseguimos realizar os testes de ITTip e GTTip em *Desmodus rotundus*, *Anoura caudifer* e *Molossus molossus* devido não somente a massa corporal muito reduzida e, portanto, dificuldade de encontrar os vasos nas asas, mas também, e principalmente, pelo fator estresse (particularmente em *D. rotundus*). Foram espécies mais agitadas, que se adaptaram menos em gaiolas e que na manipulação mostraram-se menos confortáveis.

3 – Tivemos dificuldades técnicas também na execução dos glicogênios na espécie *Anoura caudifer*. Esta espécie foi capturada e os experimentos realizados em outra Universidade (UFV – Universidade Federal de Viçosa) onde o protocolo de análise e determinação do glicogênio diferiu do protocolo realizado por nós no LiDoc – UFSC, sendo, portanto, inviável a equiparação e comparação dos resultados

4 – Inicialmente, a intenção era realizar a determinação de massa de células alfa e beta a partir das imunofluorescências. Infelizmente, houve muita marcação inespecífica em pâncreas exócrino, tendo em vista que não tínhamos conhecimento prévio de titulações adequadas para os anticorpos utilizados para estas espécies (nosso anticorpo detecta insulina e glucagon de ratos). Além disso, experimentos em animas piloto seriam inviáveis pois são espécies capturadas com dificuldade na

natureza, em momentos, datas e locais diferentes. Entretanto essa dificuldade foi superada substituindo-se as análises de massa das células beta e alfa pela massa do pâncreas endócrino e estimativas da proporção de células beta e alfa por ilhota.

11 – Referências bibliográficas

1. ALENCAR, A. O.; SILVA, G. A. P.; DA ARRUDA M. M.; SOARES, A. J.; GUERRA, D. Q. Aspectos biológicos e ecológicos de *Desmodus rotundus* (Chiroptera) no nordeste do Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira. v.14, n.4. Rio de Janeiro: 1994, p.95-103.
2. ALTRINGHAM JD (1996) Bats: biology and behaviour. Oxford University Press, New York
Arevalo F, Burgos MJ, Delhoyo N, Lopezluna P (1990) Seasonal-variations in the lipidcomposition of white and brown tissues in the bat *Pipistrellus pipistrellus*. Comp Biochem Physiol B 95:535–539
3. AMARAL, T. S., PINHEIRO, E. C., FREITAS, M. B., & AGUIAR, L. M. S. (2019). Low energy reserves are associated with fasting susceptibility in neotropical nectar bats *Glossophaga soricina*. Brazilian Journal of Biology.
4. AMITAI, O., HOLTZE, S., BARKAN, S., AMICHAJ, E., KORINE, C., PINSHOW, B., & VOIGT, C. C. (2010). Fruit bats (Pteropodidae) fuel their metabolism rapidly and directly with exogenous sugars. Journal of Experimental Biology, 213(15), 2693–2699.
5. AUSTAD SN, FISCHER KE (1991) Mammalian aging, metabolism, and ecology—evidence from the bats and marsupials. J Gernotol 46:B47–B53
6. BARQUEZ, R.M., BRAUN, J. K. The bats of Argentina. Special Publications Museum of Texas Tech University. v.42, Lubbock: 1999, p.1-275.
7. BEARDSALL, K., YUEN, K., WILLIAMS, R., DUNGER, D. Applied physiology of glucose control. Curr. Paediatr., 2006; 56: 127-156.
8. BEN-HAMO, M., MUÑOZ-GARCIA, A. and PINSHOW, B. 2012. Physiological responses to fasting in bats. In: M. D. McCue, ed. Comparative physiology of fasting, starvation, and food limitation. Berlin: Springer Berlin Heidelberg
9. BERNARD, E. Morcegos vampiros: sangue, raiva e preconceito. Ciência Hoje. v.36, n.214. Rio de Janeiro: 2005, p.44-49.

10. BONNER-WEIR, S., SULLIVAN, B.A., WEIR. G.C. Human islet morphology revisited: Human and rodent islets are not so different after all. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2015; 63(8): 604-612.
11. BOTION, LM., KETTELHUT, IC. and MIGLIORINI, RH., 1992. Reduced lipogenesis in rats fed a high-protein, carbohydrate-free diet: participation of liver and four adipose depots. *Brazilian Journal of. Medical and Biological Research*, vol. 25, no. 4, p. 419-428.
12. BRASS, D. (1994) *Rabies in Bats: Natural History and Public Health Implications*. Ridgefield, Livia Press. pp 275-299
13. BREDT, A.; UIEDA, W. Bats from urban and rural environments of the Distrito Federal, mid-western Brazil. *Chiroptera Neotropical*. v.2, n.2. Brasília: 1996, p.54-57.
14. BREIDENSTEIN CP (1982) Digestion and assimilation of bovine blood by a vampire bat (*Desmodus rotundus*). *J Mammal* 63:482–484
15. BRERETON, M.F., VERGARI, E., ZHANG, Q., CLARK, A. Alpha-, Delta- and PP-cells: Are they the architectural cornerstones of islet structure and co-ordination? *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2015; 63(8): 575-591.
16. CAVIEDES-VIDAL E, KARASOV WH, CHEDIACK JG, FASULO V, CRUZ-NETO AP, OTANIL (2008) Paracellular Absorption: A Bat Breaks the Mammal Paradigm. 3: Article No.: e1425
17. CRAIK, J.D., MARKOVICH, D. Rapid GLUT-1 mediated glucose transport in erythrocytes from grey headed fruit bat (*Pteropus poliocephalus*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol*, 2000; 126: 45-55.
18. DE BRUIJN, W. C. (1973). Glycogen, its chemistry and morphologic appearance in the electron microscope. *Journal of Ultrastructure Research*, 42(1-2), 29–50.
19. DE LIMA, I.P. Espécies de morcegos (*Mammalia, Chiroptera*) registradas em parques nas áreas urbanas do Brasil e suas implicações no uso deste ambiente. *Em Ecologia de Morcegos*. Technical Books Editora. 2008; 71-85.
20. DIAMOND, J. Evolutionary design of intestinal nutrient absorption: enough but not too much. *News Physiol. Sci.* 6: 92-96, 1991.
21. DOWNS, C. T., JORDAAN, L. A., JOHNSON, S. D., (2011). Wahlberg's epauletted fruit bat (*Epomophorus wahlbergi*) as a potential dispersal agent for fleshy-fruited invasive alien plants: effects of handling behaviour on seed germination. *Biological Invasions*, 14(5), 959–968.
22. EMMONS, L. H.; FEER, F. *Neotropical Rainforest Mammals: A field guide*. Chicago: University of Chicago Press, 1990, 281p.

23. ESBÉRARD, C. E. L.; MOREIRA, S. C. Second record of *Lasiurus ega* (Gervais) (Mammalia, Chiroptera, Vespertilionidae) over the South Atlantic. *Brazilian Journal of Biology*. v. 66, 1A. São Carlos: 2006, p.185- 186.
24. FABIAN, M.E., MARQUES, R.V. Contribuição ao conhecimento da biologia reprodutiva de *Molossus molossus* (Pallas, 1766) (Chiroptera, Molossidae). *Revista Brasileira de Zoologia*. v.6, n.4. Curitiba:1989, p.603-610.
25. FAZZOLARI-CORREA, S. Aspectos sistemáticos, ecológicos e reprodutivos de morcegos na Mata Atlântica. 168 p.Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.
26. FENTON, M.B.; ACHARYA, L.; AUDET, D.; HICKEY, M.B.C.; MERRIMAN, C.; OBRIST, M.K. & SYME, D.M. 1992. Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the Neotropics. *Biotropica*, 24: 440-446.
27. FREITAS, M.B., WELKER A.F., MILLAN, S.F., PINHEIRO, E.C. Metabolic responses induced by fasting in the common vampire bat *Desmodus rotundus*, *Journal. Comp. Physiol B*, 2003; 173: 703–707.
28. FREITAS, M.B., PASSOS, C.B.C., VASCONCELOS, B.R., PINHEIRO, E.C. Effects of short-term fasting on energy reserves vampire bats (*Desmodus rotundus*), *Comp. Biochem. Physiol B*, 2005; 140: 59–62.
29. FREITAS, M.B., GOULART, L.S., BARROS, M.S., MORAIS, D.B., AMARAL, T.S., MATTA, S.L.P. Energy metabolism and fasting in male and female insectivorous bats *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Brazilian Journal of Biology*, 2010; 70 (3): 617-621.
30. FREITAS, M.B., QUEIROZ, J.F., GOMES, C.I.D., COLLARES-BUZATO, C.B., BARBOSA, H.C., BOSCHERO, A.C., GONÇALVES, C.A., PINHEIRO, E.C. Reduced insulin secretion and glucose intolerance are involved in the fasting susceptibility of common vampire bats. *General and Comparative Endocrinology*, 2013; 183: 1-6.
31. GADELHA-ALVES, R., ROCHA-BARBOSA, O. Comparative Intestinal Histomorphology of Five Species of Phyllostomid Bats (Phyllostomidae, Microchiroptera): Ecomorphological Relations with Alimentary Habits. *Int. J. Morphol.*, 26(3):591-602, 2008.
32. GALINDO-GONZÁLEZ, J. Dispersión de semillas por murciélagos: su importancia en la conservación y regeneración del bosque tropical. *Acta Zoologica Mexicana, Nueva Serie*. v.73. Ciudad del Mexico: 1998, p.57-74.

33. GEISER, F., STAWSKI, C. Hibernation and Torpor in Tropical and Subtropical Bats in Relation to Energetics, Extinctions, and the Evolution of Endothermy. *Integrative and Comparative Biology*, volume 51, number 3, pp. 337–348, 2011.
34. GILLETT, M. P., WILSON, R. B. (1985). Unusual lipid composition of erythrocytes from the insectivorous bat *Molossus molossus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 80(2), 149–150.
35. GARBINO, G.S.T.; GREGORIN, R.; LIMA, I.P.; LOUREIRO, L.; MORAS, L.M.; MORATELLI, R.; NOGUEIRA, M.R.; PAVAN, A.C.; TAVARES, V.C.; NASCIMENTO, M.C. DO; PERACCHI, A.L. 2020. Updated checklist of Brazilian bats: version 2020. Com. da List. Morcegos do Brasil – CLMB. Soc. Bras. para o Estud. Quirópteros (Sbeq). <<https://www.sbeq.net/lista-de-especies>>
36. GONÇALVES, F.C. e PENNA, K.G.B.D., *Resbcal Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, v5, n2, p99, 2017
37. GONÇALVES-NETO, L.M., FERREIRA, F.B.D., SOUZA, L., SANTOS, C., BOSCHERO, A.C., FACUNTO, V., SANTOS, A. R. S., NUNES, E.A., RAFACHO, A. Disruption of glucose tolerance caused by glucocorticoid excess in rats is partially prevented, but not attenuated, by arjunolic acid. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2014; 52: 972-982.
38. GOODWIN, G.G., GREENHALL, A. M. A review of the bats of Trinidad and Tobago: descriptions, rabies infection and ecology. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. v.122, n.3. New York: 1961, p.187-302.
39. GREENHALL, A. M.; PARADISO, J. L. Bats and bat banding. *Bureau of Sport Fisheries and Wildlife*, v. 72, n. 4, p. 1-48, 1968.
40. GREENHALL, A. M.; JOERMANN, G SCHMIDT, U.; SEIDEL, M. R. *Desmodus rotundus*. *Mammalian Species*. v.202. New York: 1983, p.1-6.
41. GRIFFIN, D. R.; WEBSTER, F. A.; MICHAEL, C. R. The echolocation of flying insects by bats. *Animal Behavior*, v.8, Washington: 1960, p.141-154.
42. HANDLEY, J.R. New species of mammals from northern South America: fruit-eating bats, genus *Artibeus* Leach. In: PATTERSON, B. D.; TIMM, R. M. (eds.). *Studies in neotropical mammalogy: essays in honor of Philip Hershkovitz*. *Fieldiana Zoology*. v.39, Chicago: 1989 p.163–172.
43. HARRISON JF, ROBERTS SP (2000) Flight respiration and energetics. *Annu Rev Physiol* 62:179–205 Heldmaier G, Ortman S, Elvert R (2004) Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. *Respir Physiol Neurobiol* 141:317–329

44. HELMSTAEDTER, V., FEURLE, G. E., & FORSSMANN, W. G. (1976). Insulin-, glucagon-, and somatostatin-immunoreactive endocrine cells in the equine pancreas. *Cell and Tissue Research*, 172(4).
45. HULL, R. L., & KAHN, S. E. (2015). Pancreatic morphology in normal and diabetic states. *International Textbook of Diabetes Mellitus*, 69–81.
46. IN'T VELD, P., & MARICHAL, M. (2010). Microscopic Anatomy of the Human Islet of Langerhans. *The Islets of Langerhans*, 1–19. doi:10.1007/978-90-481-3271-3_1
47. KARASOV WH, PINSHOW B (2000) Test for physiological limitation to nutrient assimilation in a long-distance passerine migrant at a springtime stopover site. *Physiol Biochem Zool* 73: 335–343
48. KARASOV, W. H., MARTÍNEZ DEL RIO, C., & CAVIEDES-VIDAL, E. (2011). Ecological Physiology of Diet and Digestive Systems. *Annual Review of Physiology*, 73(1), 69–93.
49. KEEGAN D.J (1977) Aspects of assimilation of sugars by *Rousettus aegyptiacus*. *Comp Biochem Physiol A* 58:349–352
50. KEEGAN, D. J. AND MÖDINGER, R. (1979). Microvilli of the intestinal mucosal cells of *Rousettus aegyptiacus*. *S. Afr. J. Zool.* 14, 220-223.
51. KELM, D.H., SIMON, R., KUHLOW, D., VOIGT, C.C. and RISTOW, M., 2011. High activity enables life on a high-sugar diet: blood glucose regulation in nectar-feeding bats. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, vol. 278, no. 1724, pp. 3490-3496.
52. KETTELHUT, I.C., FOSS, M.C. and MIGLIORINI, R.H., 1980. Glucose homeostasis in a carnivorous animal (cat) and in rats fed a high protein diet. *American Journal of Physiology*, vol. 239, no. 5, p.437- R444.
53. KIM, A., MILLER, K.J.O.J., KILIMNIK, G., WOJCIK, P., & HARA, M. (2009). Islet architecture: A comparative study. *Islets*, 1(2), 129–136.
54. KOOPMAN, K.F. Order Chiroptera. In: WILSON. D. E.; REEDER, D. M. (Eds.). *Mammal species of the World, a taxonomic and geographic reference*. 2 ed. Washington: Smithsonian Institution Press, 1993, p.137-241.
55. KRONFELD-SCHOR, N., RICHARDSON, C., SILVIA, B. A., KUNZ, T. H., & WIDMAIER, E. P. (2000). Dissociation of leptin secretion and adiposity during prehibernatory fattening in little brown bats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279(4), R1277–R1281.
56. KUNZ, T. H. *Ecology of Bats*. New York: Plenum Press, 1982. 425p.

57. KUNZ, T.H., J.O. WHITAKER, JR. & M.D. WADANOLI. 1995. Dietary energetics of the insectivorous Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*) during pregnancy and lactation. *Oecologia* 101: 407–415
58. LORD GM, MATARESE G, HOWARD LK, BAKER RJ, BLOOM SR, LECHLER RI (1998) Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394:897–901 Lyman CP
59. MACHADO-SANTOS, C., AQUINO, J.C.F., MIKALAUKA, J.F., ABIDU-FIGUEIREDO, M., MENDES, R.M.M., SALES, A. What difference exists in the pâncreas of mammals with sanguivorous diet? A morphological, stereological and immunohistochemical study of the pancreatic islets of the hematophagous bat *Diphylla ecaudata*. *Regulatory Peptides*, 2013; 183: 62–68.
60. MACHADO-SANTOS, C., AQUINO, J. C. F., DA ROCHA, P. A., ABIDU-FIGUEIREDO, M., DE BRITO-GITIRANA, L., SALES, A. (2017). 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*, 49(1), 1–7.
61. MACNAB, B. K. Energetics and the distribution of vampire bats. *Journal of Mammalogy*. v.31. Lawrence: 1973, p.227- 268.
62. MAKANYA, A. N., MAINA, J. N., MAYHEW, T. M., TSCHANZ, S. A. AND BURRI, P. H. (1997). A stereological comparison of villous and microvillous surfaces in small intestines of frugivorous and entomophagous bats: Species, inter-individual and craniocaudal differences. *J. Exp. Biol.* 200, 2415-2423.
63. MAKANYA, A. N., SELF, T. J., WARUI, C. N. AND MWANGI, D. K. (2001). Gut morphology and morphometry in the epauletted Wahlberg's fruit bat (*Epomophorus wahlbergi*, Sundevall, 1846). *Acta Biol. Hung.* 52, 75-89.
64. MELO, B.E.S., BARROS, M.S., CARVALHO, T.F., AMARAL, T.S. and FREITAS, M.B., 2012. Energy reserves of *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae) in two areas with different degrees of conservation in Minas Gerais. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 72, pp. 181-187
65. MICHELMORE, J.A., KEEGAN, D.J., KRAMER, B. Immunocytochemical Identification of Endocrine Cells in the Pancreas of the Fruit Bat, *Rousettus aegyptiacus*. *General and Comparative Endocrinology*, 1998; 110: 319–325.

66. MOTTA, K; BARBOSA, A.B.; BOBINSKI, F.; BOSCHERO, A.C.; RAFACHO, A. JNK and IKK β phosphorylation is reduced by glucocorticoids in adipose tissue from insulin-resistant rats. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 145, p. 1-12, 2014
67. MQOKELI, B.R., DOWNS, C.T. Blood plasma glucose regulation in Wahlberg's epauletted fruit bat. *African Zoology*, 2012; 47(2): 348-352.
68. MUNSHI-SOUTH J, WILKINSON GS (2010) Bats and birds: exceptional longevity despite high metabolic rates. *Ageing Res Rev* 9:12–19
69. MURPHY, W. J. (2001). Resolution of the Early Placental Mammal Radiation Using Bayesian Phylogenetics. *Science*, 294(5550), 2348–2351
70. NEUWEILER G (2000) Heat and water balance. In: Neuweiler G (ed) *The biology of bats*. Oxford University Press, New York
71. NOGUEIRA, M. R., DE LIMA, I. P., MORATELLI, R., TAVARES, V. D. C., GREGORIN, R., & PERACCHI, A. L. (2014). Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. *Check List*, 10(4), 808–821. doi:10.15560/10.4.808
72. NOWAK, RM., 1944. *Walker's bats of the World*. 5 ed. London: Johns Hopkins University Press. 204 p.
73. OPAZO, J., SOTO-GAMBOA, M. and BOZINOVIC, F., 2004. Blood glucose concentration in caviomorph rodents. *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 137A, no. 1, p. 57-64.
74. OURIQUES, L. C., BOUZON, Z. L. 2003. Ultrastructure of germinating tetraspores of *Hypnea musciformis* (Gigartinales, Rhodophyta). *Plant Biosystems*, 137:193-202
75. PALMIERI, C., SHIVAPRASAD, H.L. An immunohistochemical study of the endocrine pâncreas in raptors. *Veterinary Science*, 2014; 97: 587-591.
76. PAPPENHEIMER, J. R. AND REISS, K. Z. (1987). Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. *J. Membr. Biol.* 100, 123-126
77. PASSOS, F. C; SILVA, W. R.; PEDRO, W. A.; BONIN, M. R. Frugivoria em morcegos (Mammalia: Chiroptera) no Parque Estadual Intervales, sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. v.20, n. Curitiba: 2003, p.511-517.
78. 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*. Londrina: 2006, p.153- 230.

79. PINHEIRO, E.C., TADDEI, V.A., MIGLIORINI, R.H., KETTELHUT, I.C. Effect of fasting on carbohydrate metabolism in frugivorous bats (*Artibeus lituratus* and *Artibeus jamaicensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 2006; 143: 279 – 284.
80. PROTZEK, A.O.P., RAFACHO, A., VISCELLI, B.A., BOSQUEIRO, J.R., CAPPELLI, A.P., PAULA, F.M.M., BOSCHERO, A.C., PINHEIRO, E.C. Insulin and glucose sensitivity, insulin secretion and β -cell distribution in endocrine pancreas of the fruit bat *Artibeus lituratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 2010; 157: 142–148.
81. PUESCHEL, C. M. 1979. Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 15: 409-424
82. RAFACHO, A., ROMA, L.P., TABOGA, S.R., BOSCHERO, A.C., BOSQUEIRO, J.R. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexins 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2007; 85: 536-545.
83. RAFACHO, A., CESTARI, T. M., TABOGA, S.R., BOSCHERO, A.C., BOSQUEIRO, J.R. High doses of dexamethasone induce increased-cell proliferation in pancreatic rat islets. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 2009; 296:681-689.
84. RAMOS-ELORDUY, J., MORENO, J. M. P., PRADO, E. E., PEREZ, M. A., OTERO, J. L., & DE GUEVARA, O. L. Nutritional Value of Edible Insects from the State of Oaxaca, Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10(2), 142–157, 1997.
85. REDFORD, K. H., & DOREA, J. G. The nutritional value of invertebrates with emphasis on ants and termites as food for mammals. *Journal of Zoology*, 1984; 203(3), 385–395.
86. REIS, N. R. Estudos ecológicos dos quirópteros de matas primárias e capoeiras da região de Manaus, Amazonas. 242 f. Tese (Doutorado), Universidade do Amazonas, INPA. 1981. Manaus.
87. REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Eds.). *Mamíferos do Brasil*. Londrina: 2006, 437p.
88. REIS, N.R., PERACCHI, A.L., PEDRO, W.A. & LIMA, I.P. (Org.). 2007. *Morcegos do Brasil*. EDUEL, Londrina, 252p.
89. REIS, N.R., PERACCHI, A.L., DOS SANTOS, G.A.S.D. Sobre a ecologia de Morcegos. Em *Ecologia de Morcegos*. Technical Books Editora, 2008; 13-16.
90. REUSENS, B. REMACLES, C. Programming of the endocrine pâncreas by the early nutritional environment. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2006; 38: 913-922.

91. REVEL, J. P. (1960). Identification of glycogen in electron micrographs of thin tissue sections. *The Journal of Cell Biology*, 8(3), 575–589.
92. ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s. *Nature Lond.*362:801-809, 1993.
93. ROUK CS, GLASS BP (1970) Comparative gastric histology of 5 north and central american bats. *J Mammal* 51:455–472
94. SAZIMA, I., MARINHO FILHO, J.S. Brazilian bats and conser vation biology: a first survey. In: KUNZ, T.H.; RACEY, P. A. (Eds.). *Bat Biology and Conservation*. Washington: Smithsonian Institution Press, 1998. p.282-294.
95. SEINO, S., BELL, G.I., *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*, Springer Edition, 2008; 3-11.
96. SHEN, B., HAN, X., ZHANG, J., ROSSITER, S. J., & ZHANG, S. (2012). Adaptive Evolution in the Glucose Transporter 4 Gene *Slc2a4* in Old World Fruit Bats (Family: Pteropodidae). *PLoS ONE*, 7(4), e33197.
97. SIMMONS, N. B., GEISLER, J. H. (1998). Phylogenetic relationships of Icaronycteris, Archaeonycteris, Hassianycteris, and Palaeochiropteryxto extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocationand foraging strategies in Microchiroptera. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*235:1.
98. SIMMONS, N. B. (2005). EVOLUTION: Enhanced: An Eocene Big Bang for Bats. *Science*, 307(5709), 527–528.
99. SIMMONS NB, CIRRANELLO AL (2020) Bat species of the world: A taxonomic and geographic database. <https://batnames.org>
100. SPEAKMAN JR (2001) The evolution of flight and echolocation in bats: another leap in the dark. *Mammal Rev* 31:111–130
101. SPEAKMAN JR, THOMAS DW (2003) Physiological ecology and energetics of bats. In: Kunz TH, Thomas DW (eds) *Bat ecology*. Chicago Press, Chicago
102. STEINER, D.J., KIM, A., MILLER, K., HARA, M. Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islet*, 2010; 2:3: 135-145.
103. SUAREZ, R.K., HERRERA M, L.G. and WELCH, K.C. Jr, 2011. The sugar oxidation cascade: aerial refueling in hummingbirds and nectar bats. *The Journal of Experimental Biology*, vol. 214, no. Pt 2, pp. 172-178.

104. SULLIVAN, M.A., VILAPLANA, F., CAVE, R.A., STAPLETON, D., GRAY-WEALE, A.A., & GILBERT, R.G. (2010). Nature of α and β Particles in Glycogen Using Molecular Size Distributions. *Biomacromolecules*, 11(4), 1094–1100.
105. SZEWCZAK JM (1997) Matching gas exchange in the bat from flight to torpor. *Amer Zool* 37: 92–100
106. TADDEI, V. A.; VIZOTTO, L. D.; MARTINS, M. Notas taxonômicas e biológicas sobre *Molossops brachymeles cerastes* (Thomas, 1901) (Chiroptera – Molossidae). *Naturalia*. v.2. São José do Rio Preto:1976, p.61-69.
107. TIRONE, T.A., BRUNICARDI, F.C., Overview of glucose regulation. *World J. Surg.*, 2001; 25(4): 461-467.
108. TRACY CR, MCWHORTER TJ, KORINE C, WOJCIECHOWSKI MS, PINSHOW B, KARASOV WH (2007) Absorption of sugars in the Egyptian fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*): a paradox explained. *J Exp Biol* 210:1726–1734
109. UIEDA, W. Comportamento alimentar do morcego hematófago, *Diaemus youngi*, em aves domésticas. *Revista Brasileira de Biologia*. v.53, n.4. São Carlos: 1993, p.529- 538.
110. VOIGT, C.C. and SPEAKMAN, J.R., 2007. Nectar-feeding bats fuel their high metabolism directly with exogenous carbohydrates. *Functional Ecology*, vol. 21, no. 5, pp. 913-921.
111. WEBER NS, FINDLEY JS , 1970. Warm-season changes in fat content of *Eptesicus fuscus*. *J Mammal* 51:160–162
112. WELCH, K.C. Jr., HERRERA M, L.G. and SUAREZ, R.K., (2008). Dietary sugar as a direct fuel for flight in the nectarivorous bat *Glossophaga soricina*. *The Journal of Experimental Biology*, vol. 211, no. Pt 3, pp. 310-316.
113. WIDMAIER, EP., GORNSTEIN, ER., HENNESSEY, JL., BLOSS, JM., GREENBERG, JA. and KUNZ, TH., (1996). High plasma cholesterol, but low triglycerides and plaque-free arteries in Mexican free-tailed bats. *American Journal of Physiology*, vol. 271, no. 5, p. R1101-R1106. (part 2)
114. WILKINSON GS (1984) Reciprocal food sharing in the vampire bat. *Nature* 308:181–184 Willis CKR, Lane JE, Liknes ET, Swanson DL, Brigham RM (2005) Thermal energetics of female big brown bats (*Eptesicus fuscus*). *Can J Zool* 83:71–879
115. WILSON, D.E. Reproductive patterns. In: BAKER, R.J.; JONES JR. J.K., CARTER, D.C. (Eds.). *Biology of bats of the New World Family Phyllostomatidae*.

- Part III. Special Publications Museum, Texas Tech University. v.16. Lubbock: 1979, p.317-378,
116. WILSON, D.E., REEDER, D.M. Mammal species of the world. Taxonomic and geographic reference, 4 Ed, v1. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005, 2181p.
117. YEO, R., SAWDON, M. (2007) Hormonal regulation of metabolism: regulation of plasma glucose. *Anesth Intens. Care. Med.*; 8(7): 295-298.
118. ZHANG, Q.Z., BRUN, A., CRUZ-NETO, A.P, KARASOV, W.H., CAVIEDES-VIDAL. E. (2015) A comparison of mucosal surface area and villous histology in small intestines of the brazilian free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*) and the mouse (*Mus musculus*). *Journal Of Morphology*. Hoboken: Wiley-blackwell, v. 276, n. 1, p. 102-108.
119. ZORTÉA, M.; CHIARELLO, A. G. Observations on the big fruit-eating bat, *Artibeus lituratus* in an urban reserve of south east Brazil. *Mammalia*. v.58, n.4. Paris: 1994, p.665-670.

12 – Anexos



Artibeus lituratus



Desmodus rotundus





Molossus molossus



Anoura caudifer



Artibeus lituratus - Pâncreas



Desmodus rotundus - Pâncreas

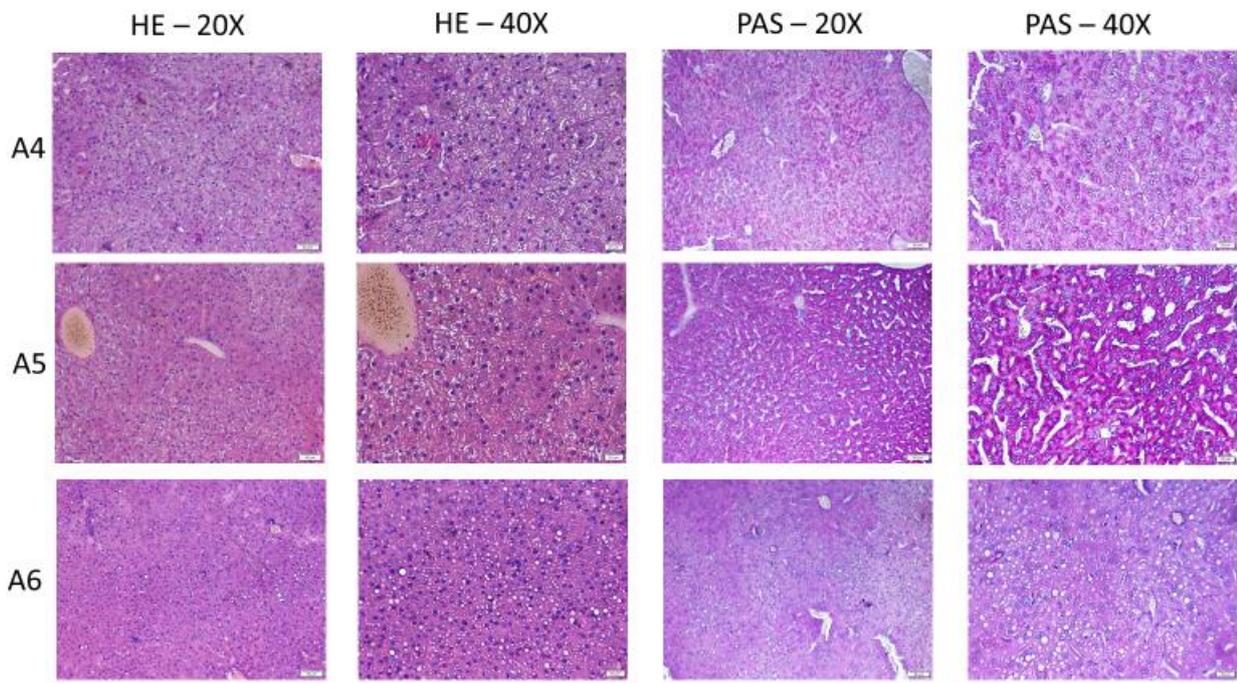
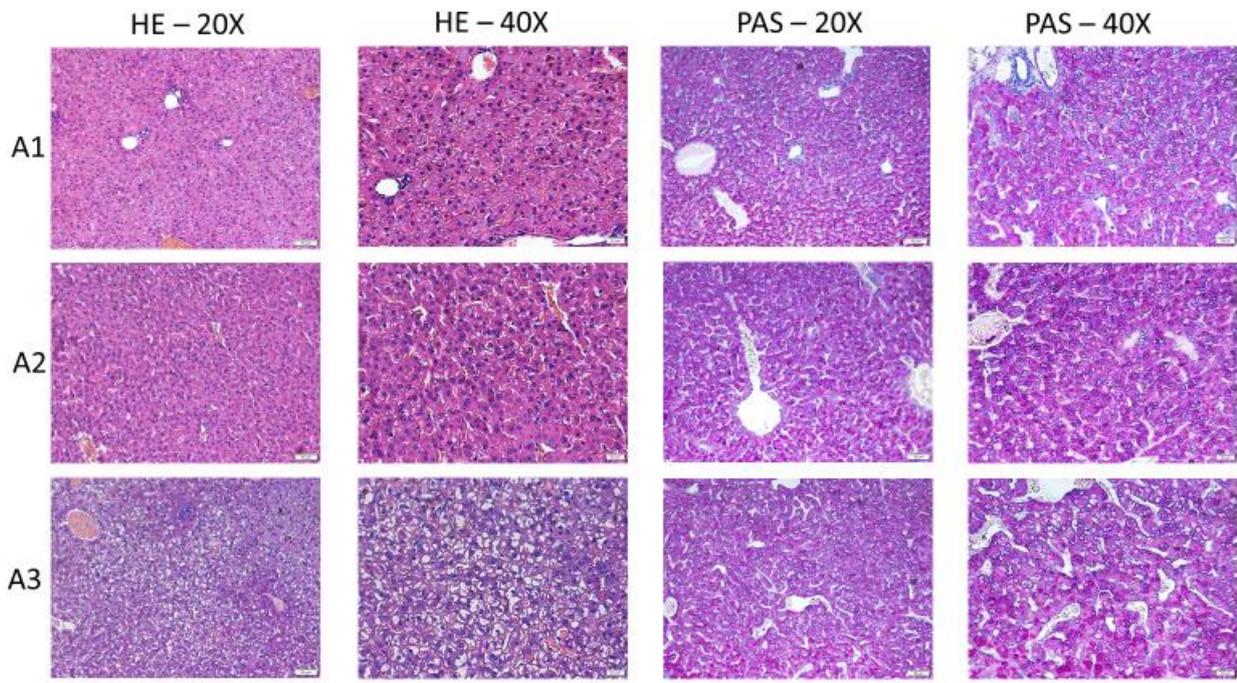


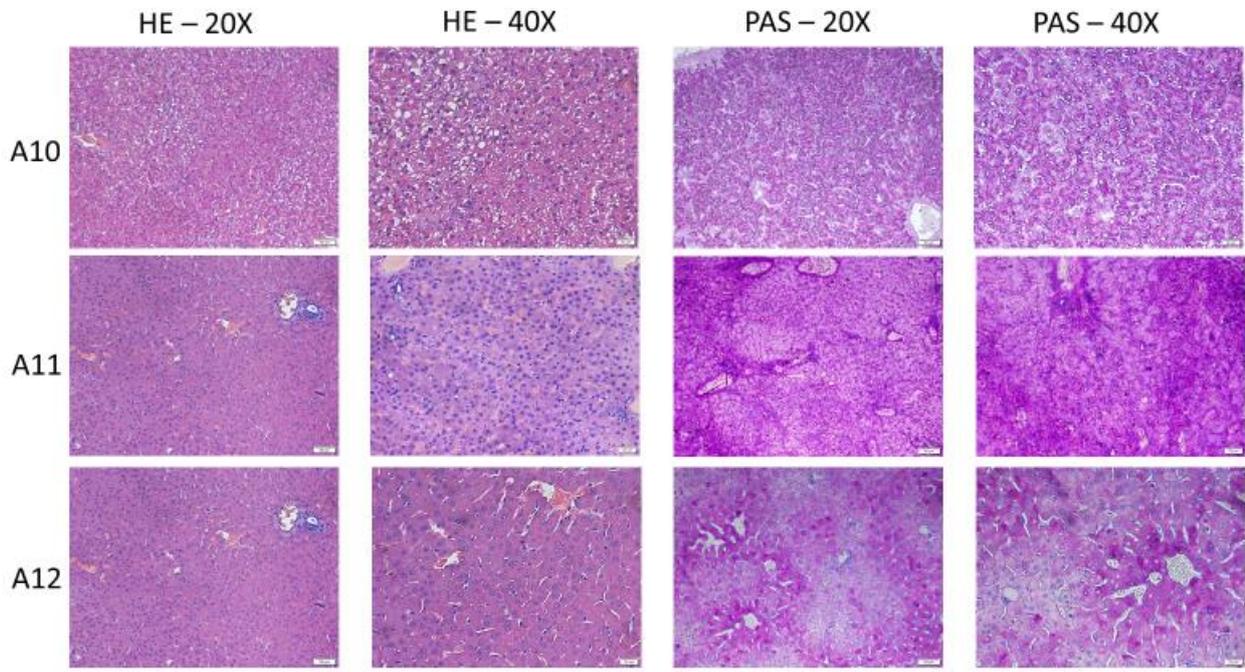
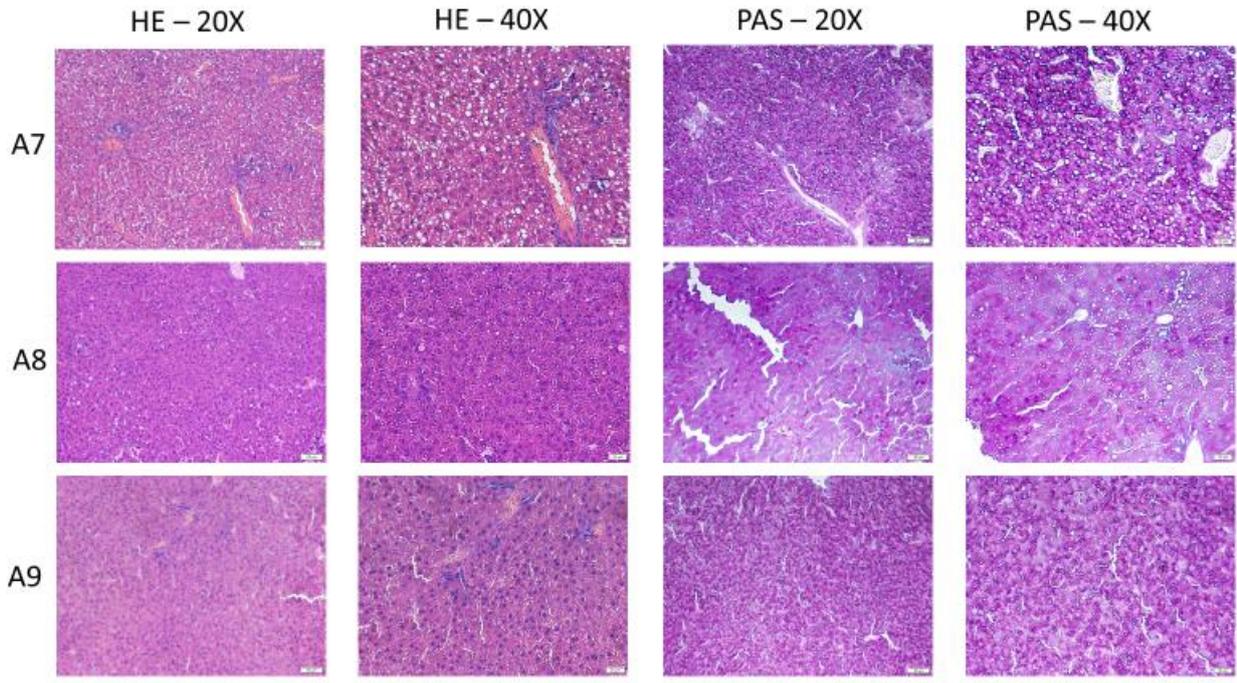
Molossus molossus - Pâncreas

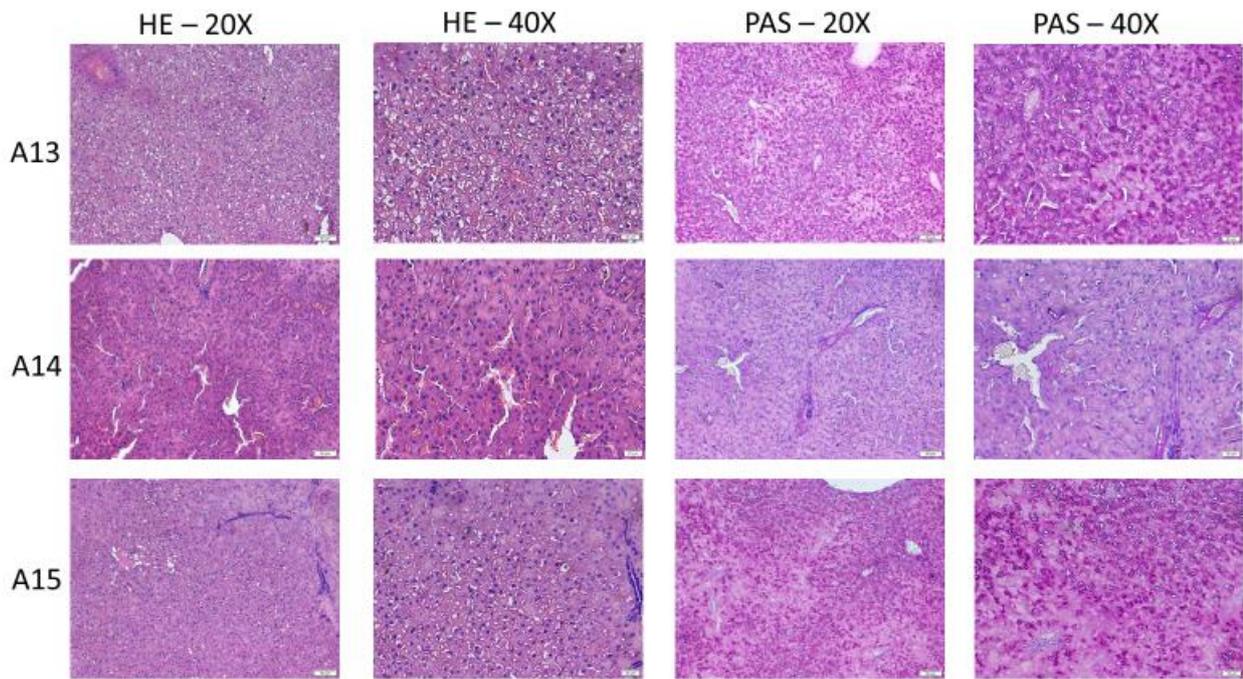


Anoura caudifer - Pâncreas

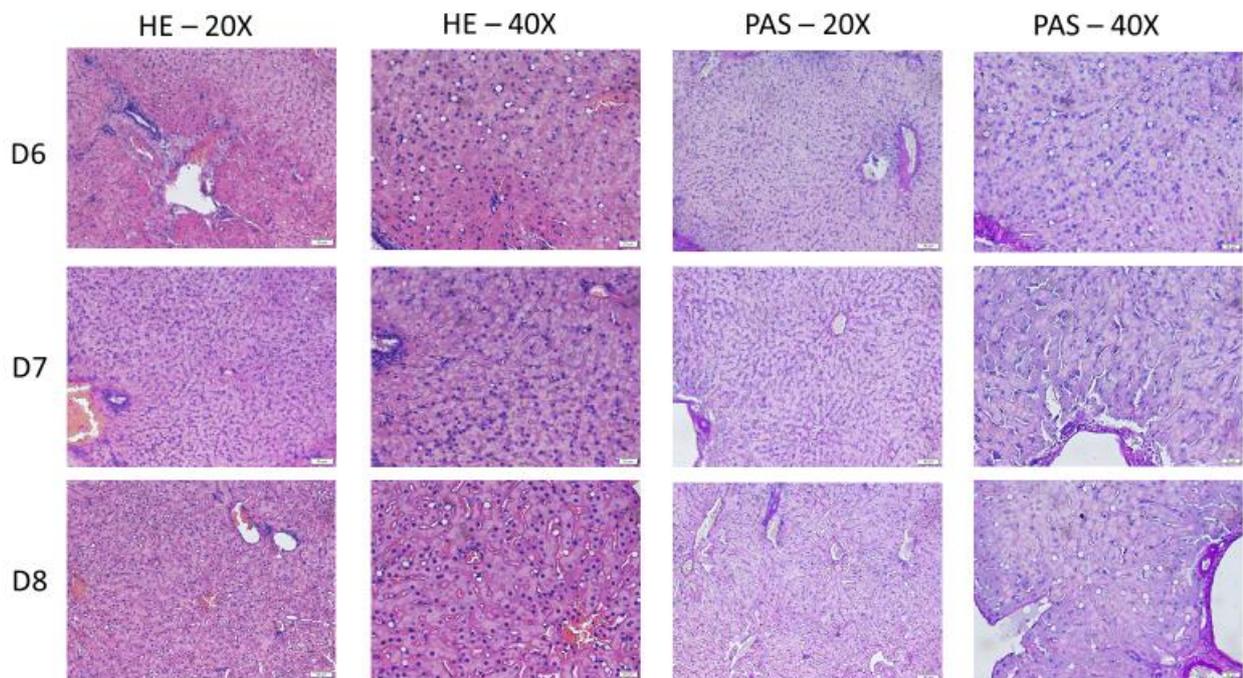
Histologia – Fígado – *Artibeus sp*

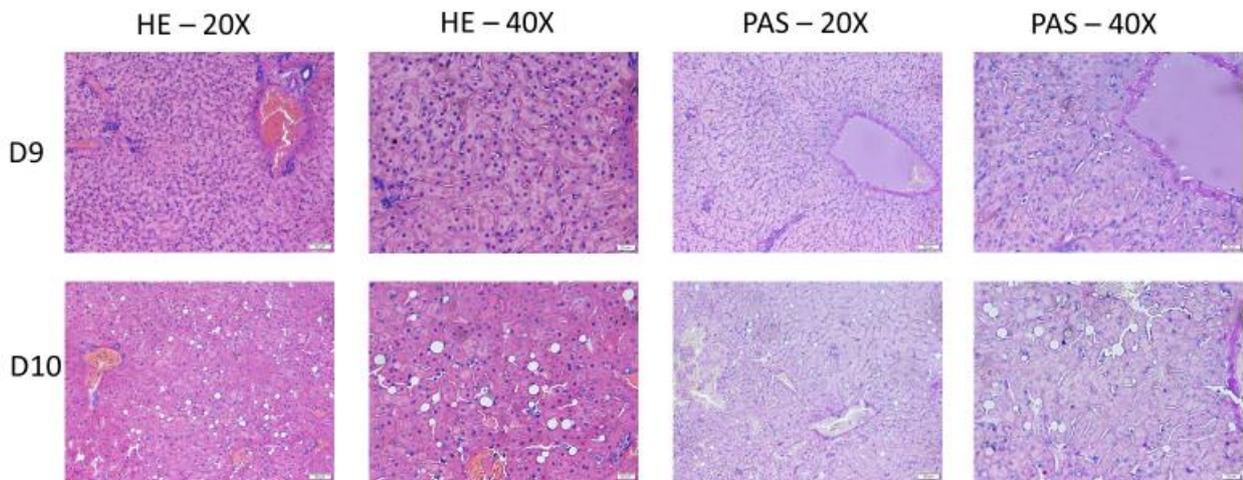




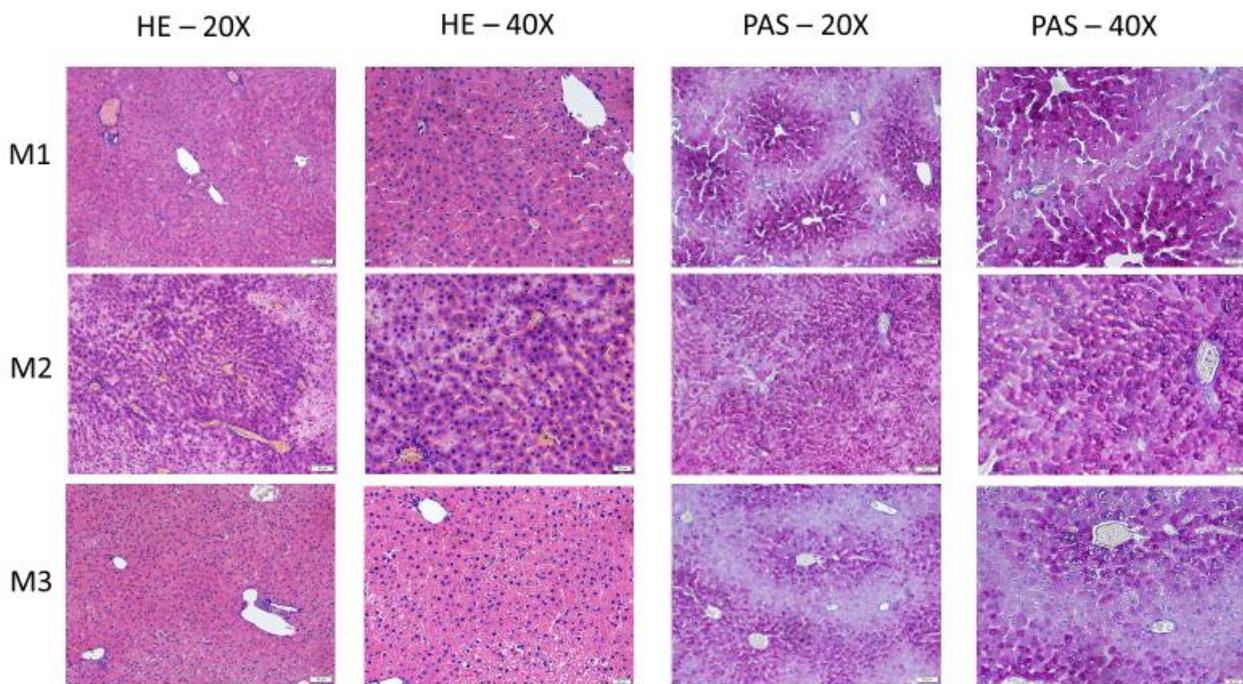


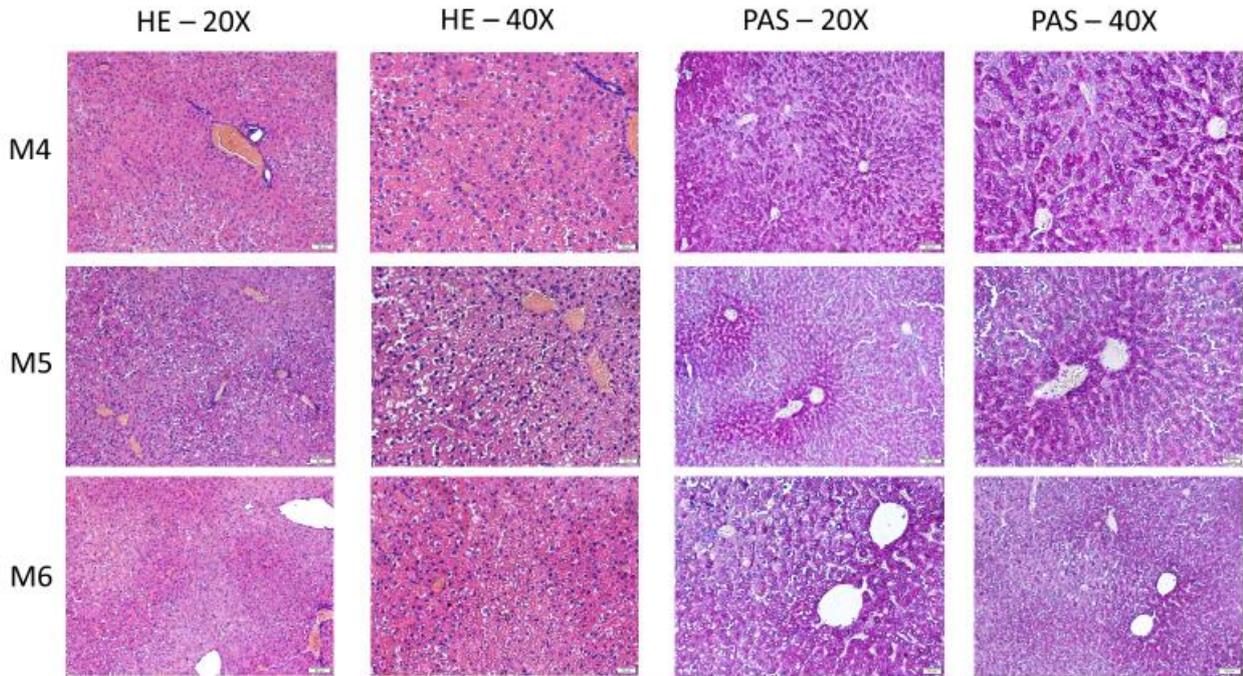
Histologia – Fígado – *Desmodus rotundus*



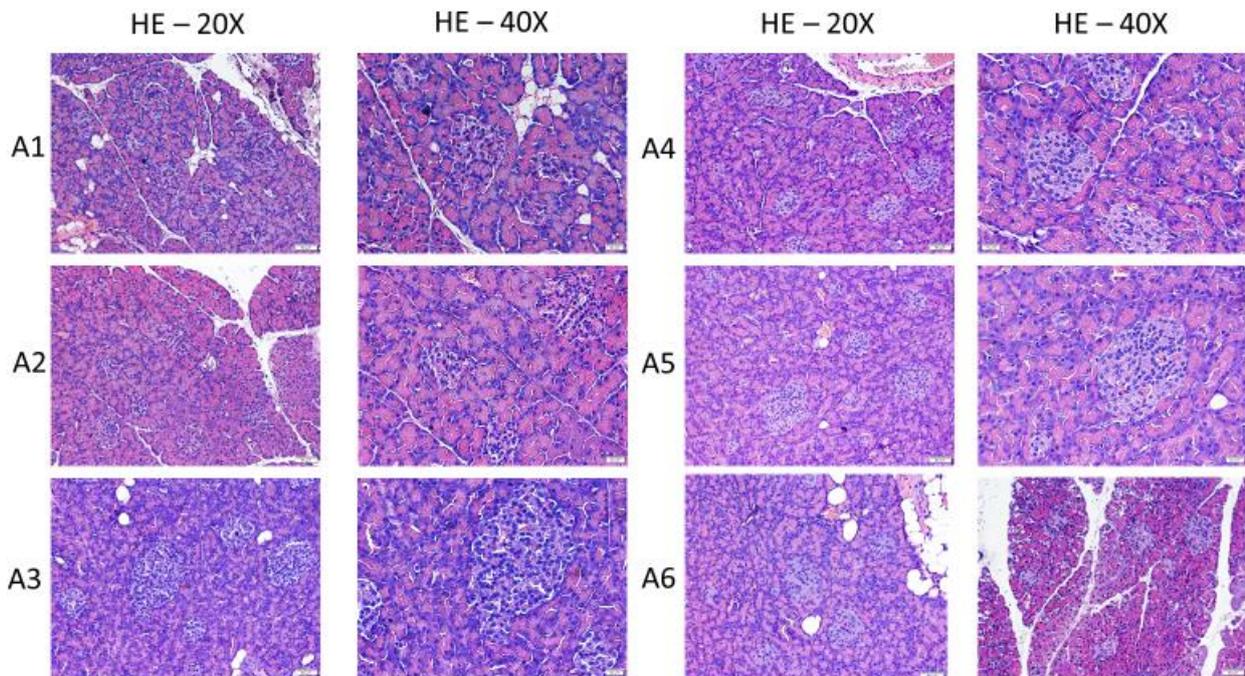


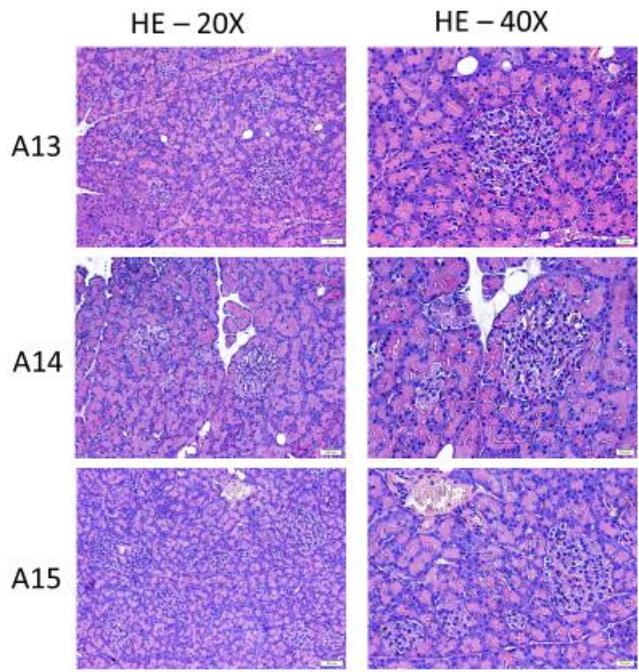
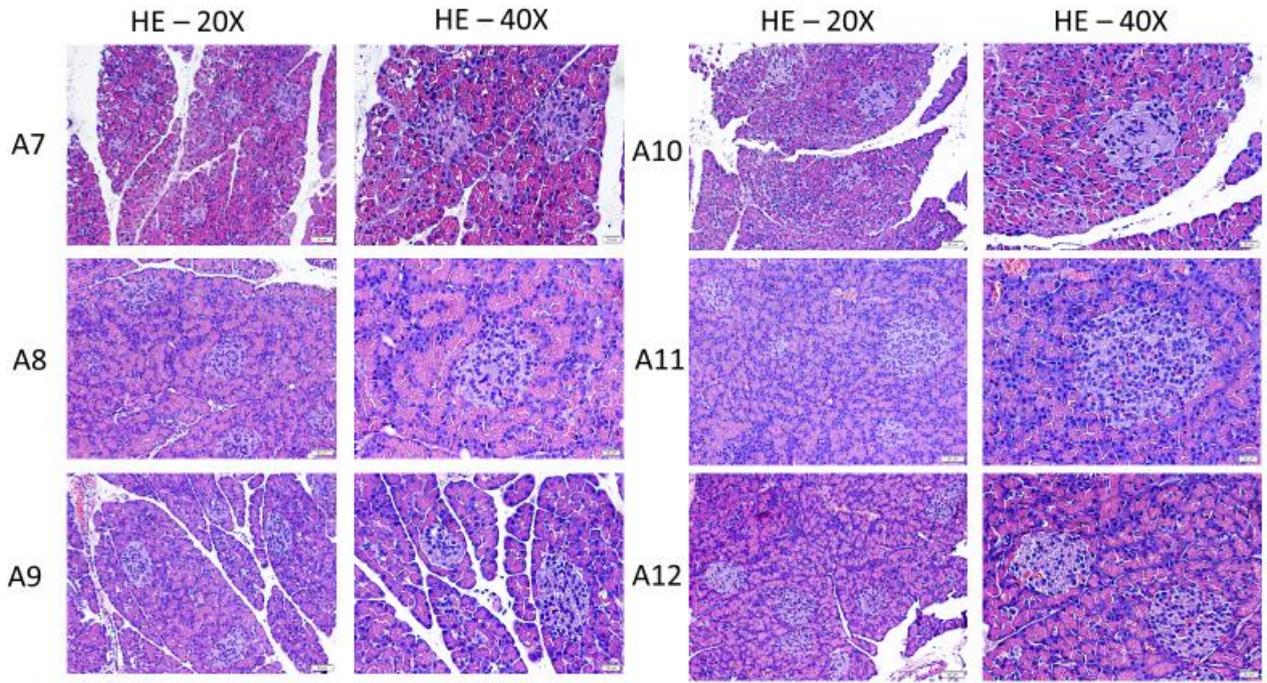
Histologia – Fígado – *Molossus molossus*



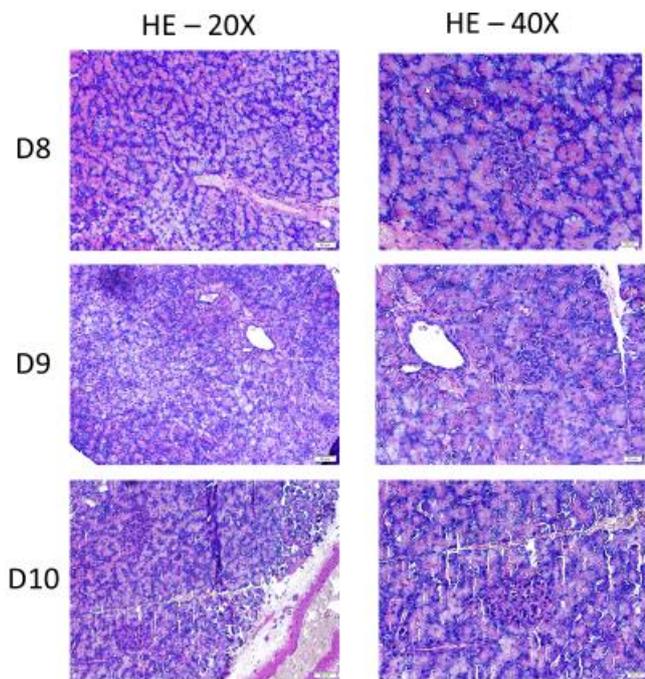
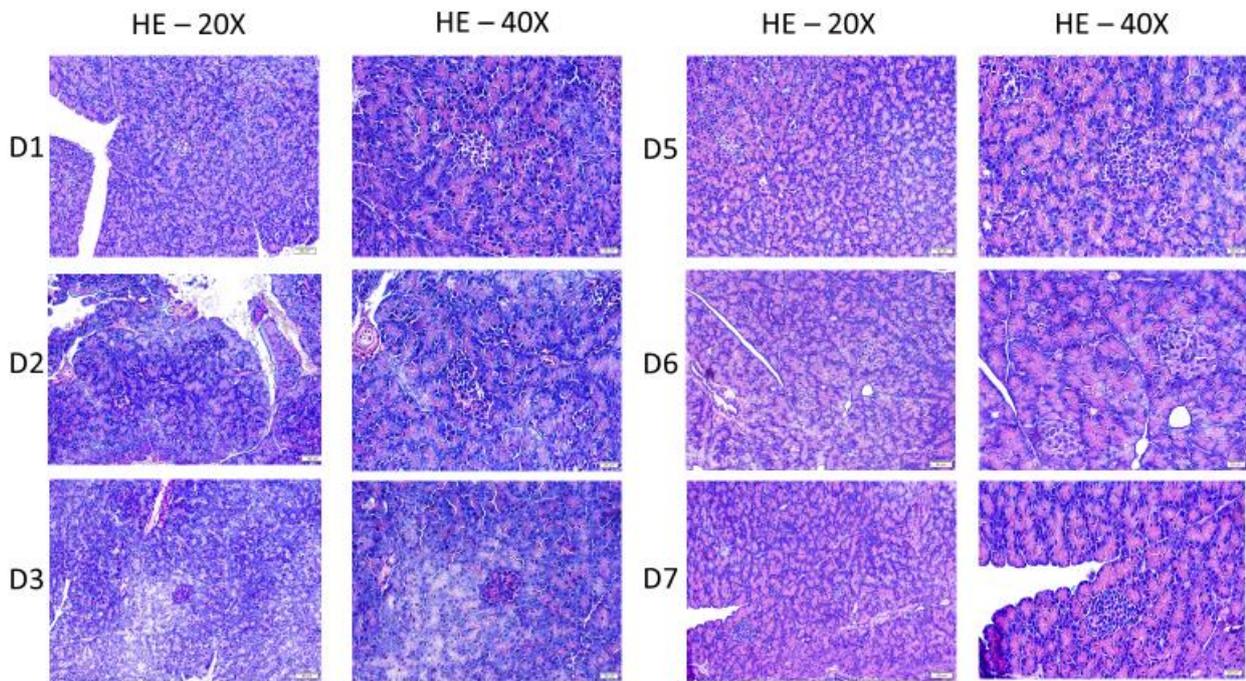


Histologia – Pâncreas – *Artibeus sp*

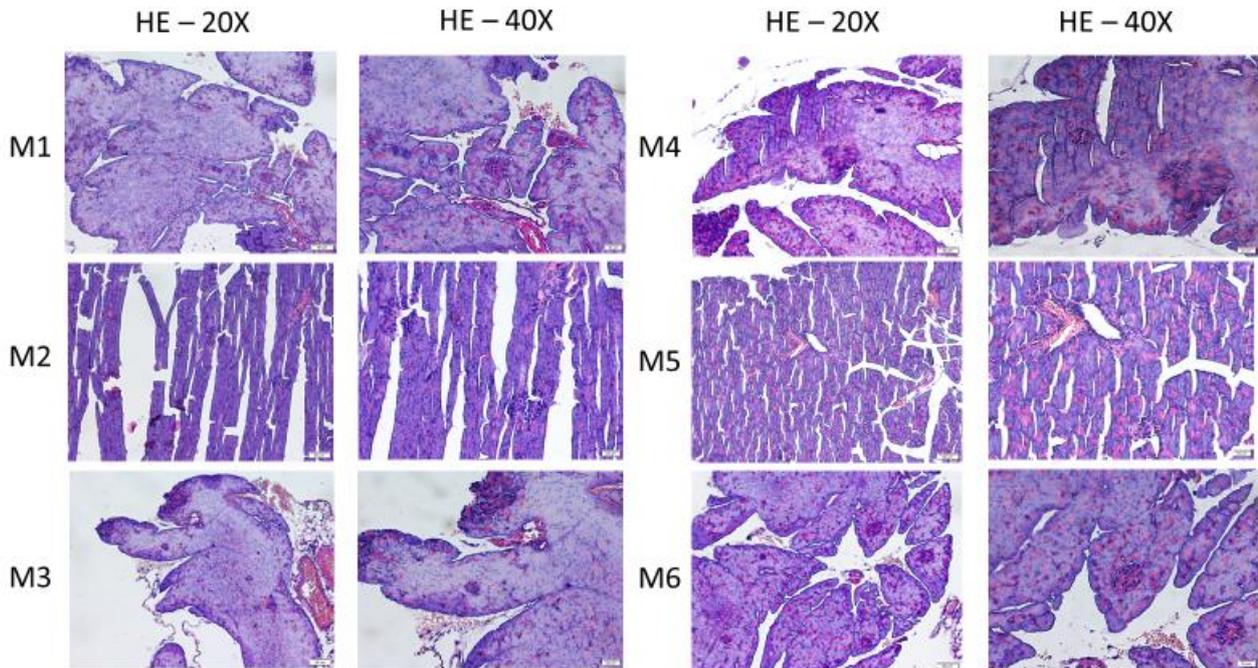




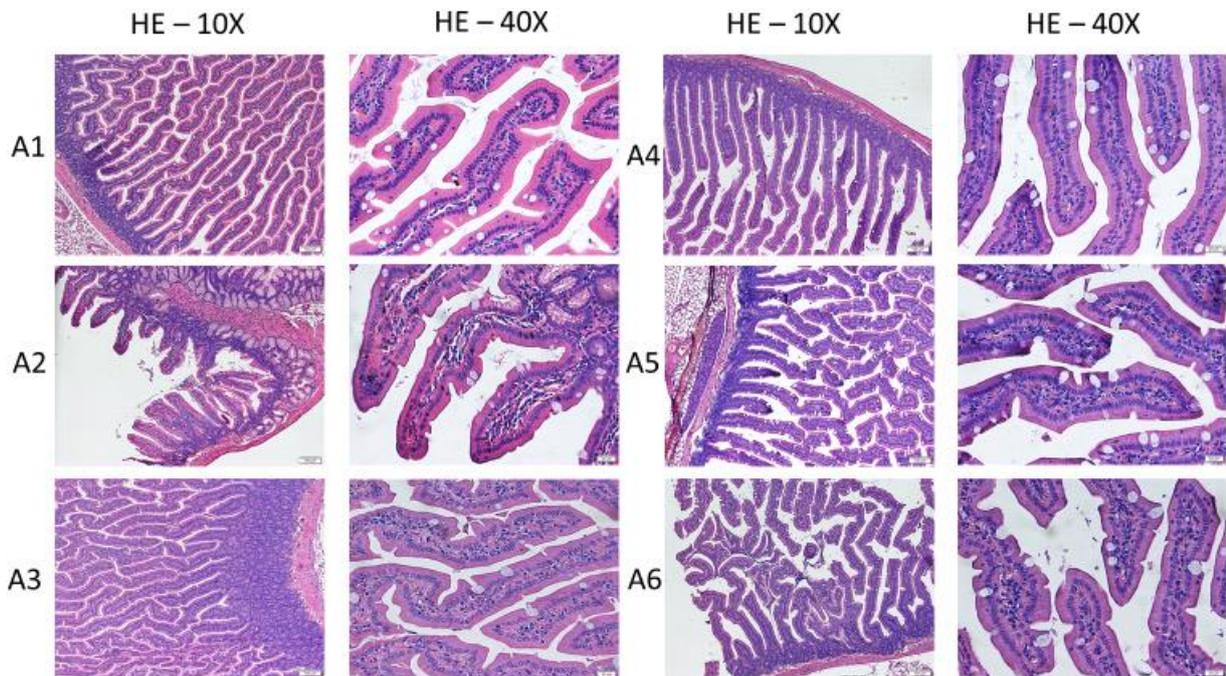
Histologia – Pâncreas – *Desmodus rotundus*

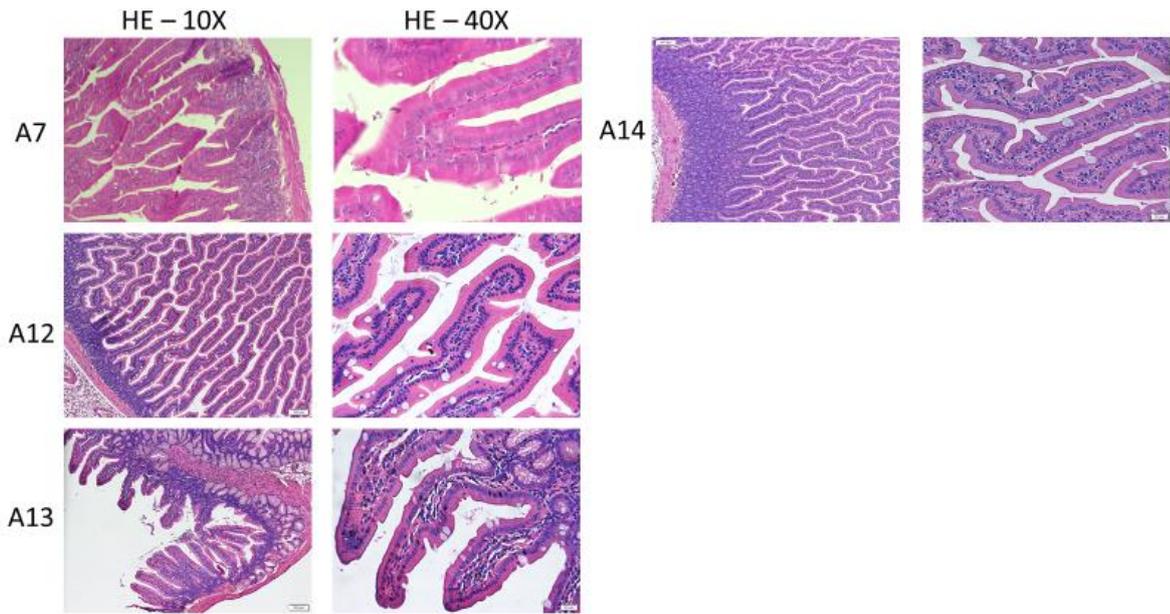


Histologia – Pâncreas – *Molossus molossus*

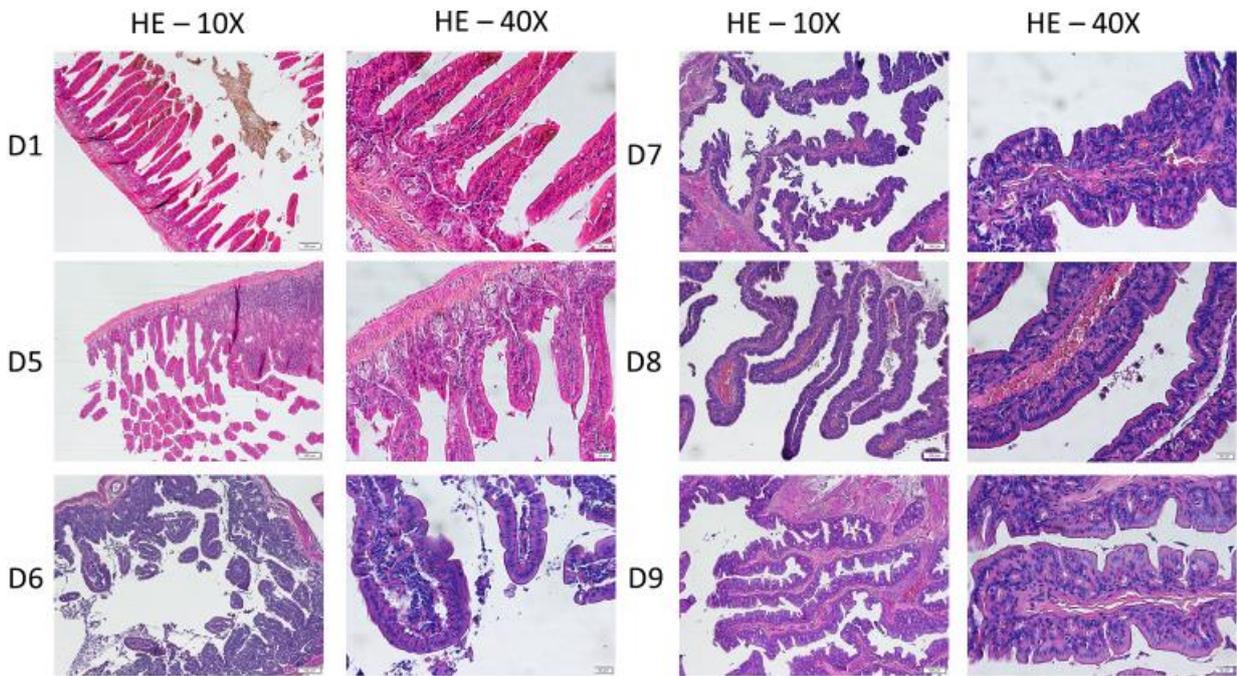


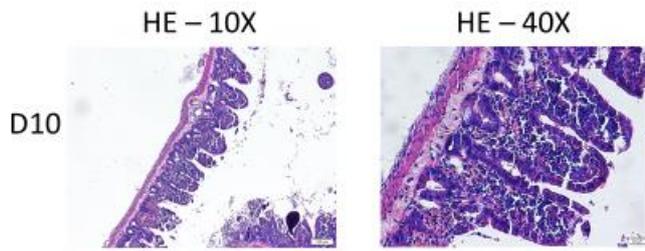
Histologia – Intestino proximal – *Artibeus sp*



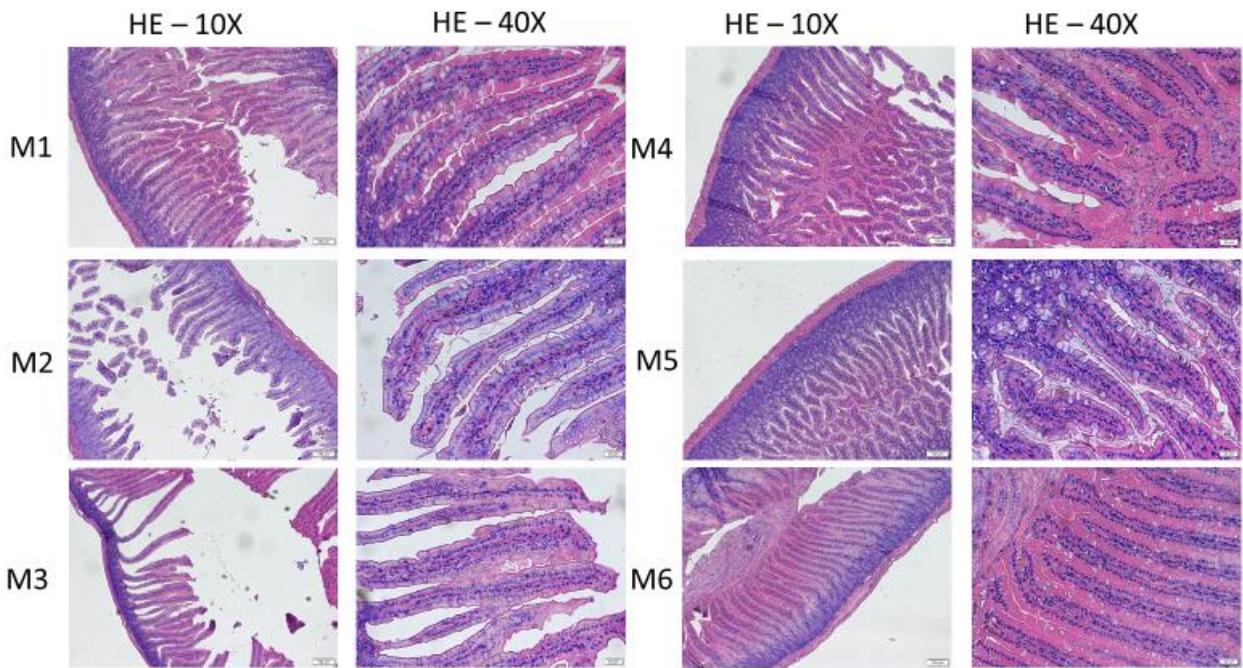


Histologia – Intestino proximal – *Desmodus rotundus*

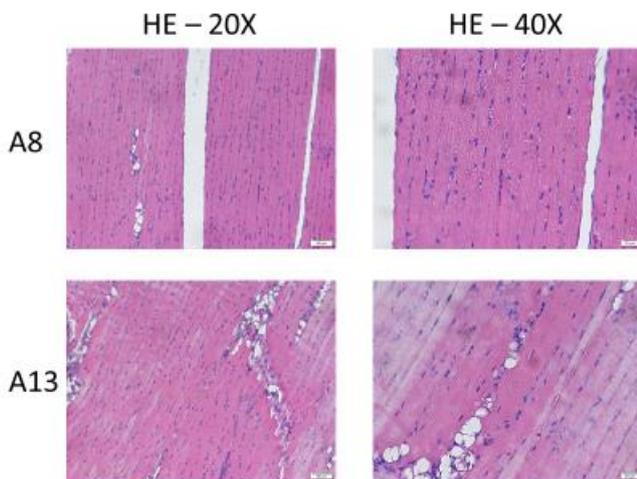




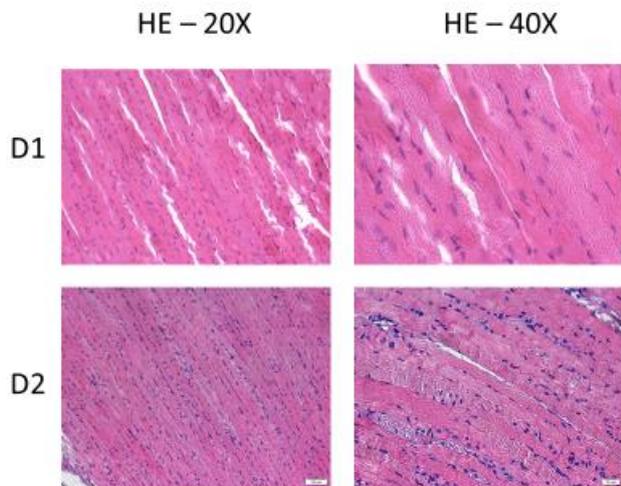
Histologia – Intestino proximal – *Molossus molossus*



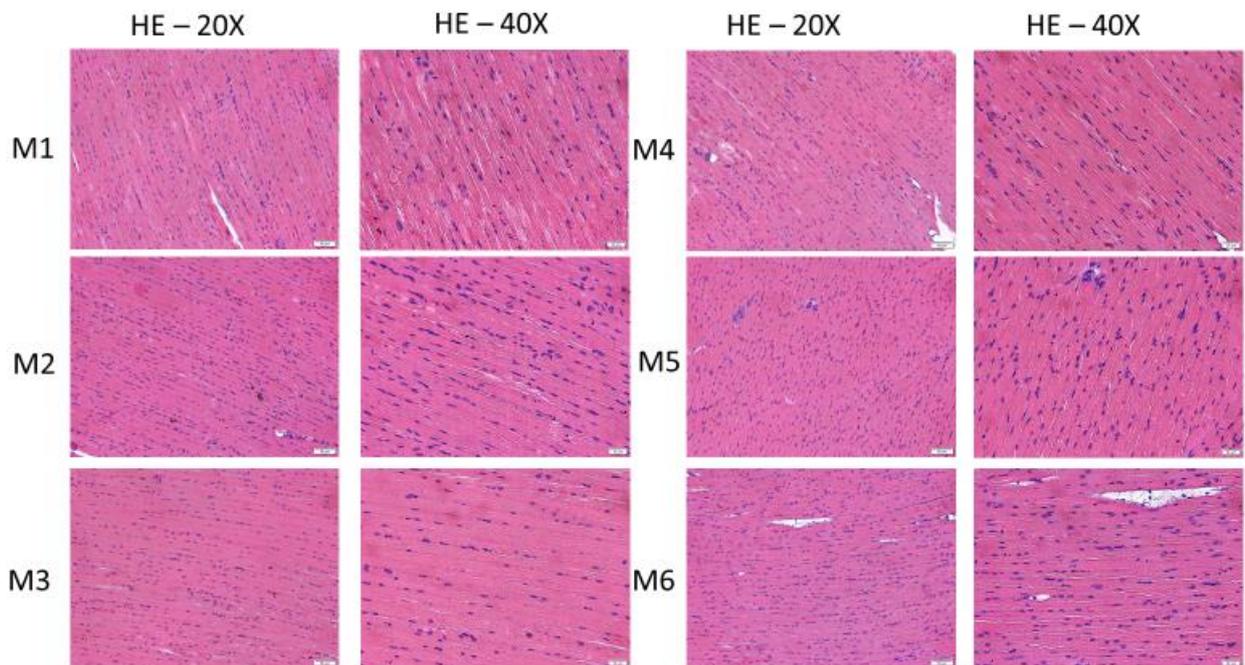
Histologia – Musculo esquelético – *Artibeus sp*



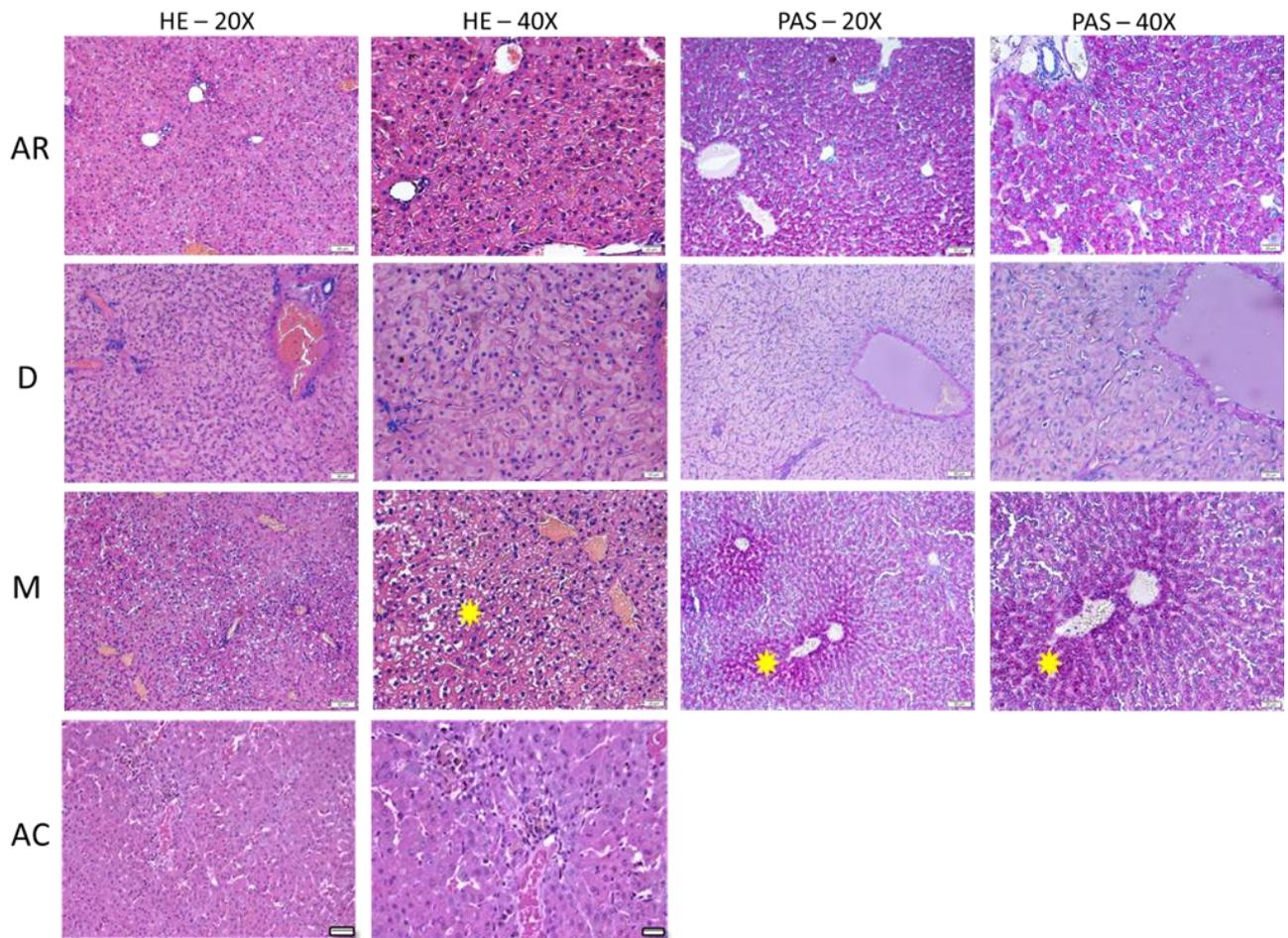
Histologia – Musculo esquelético – *Desmodus rotundus*



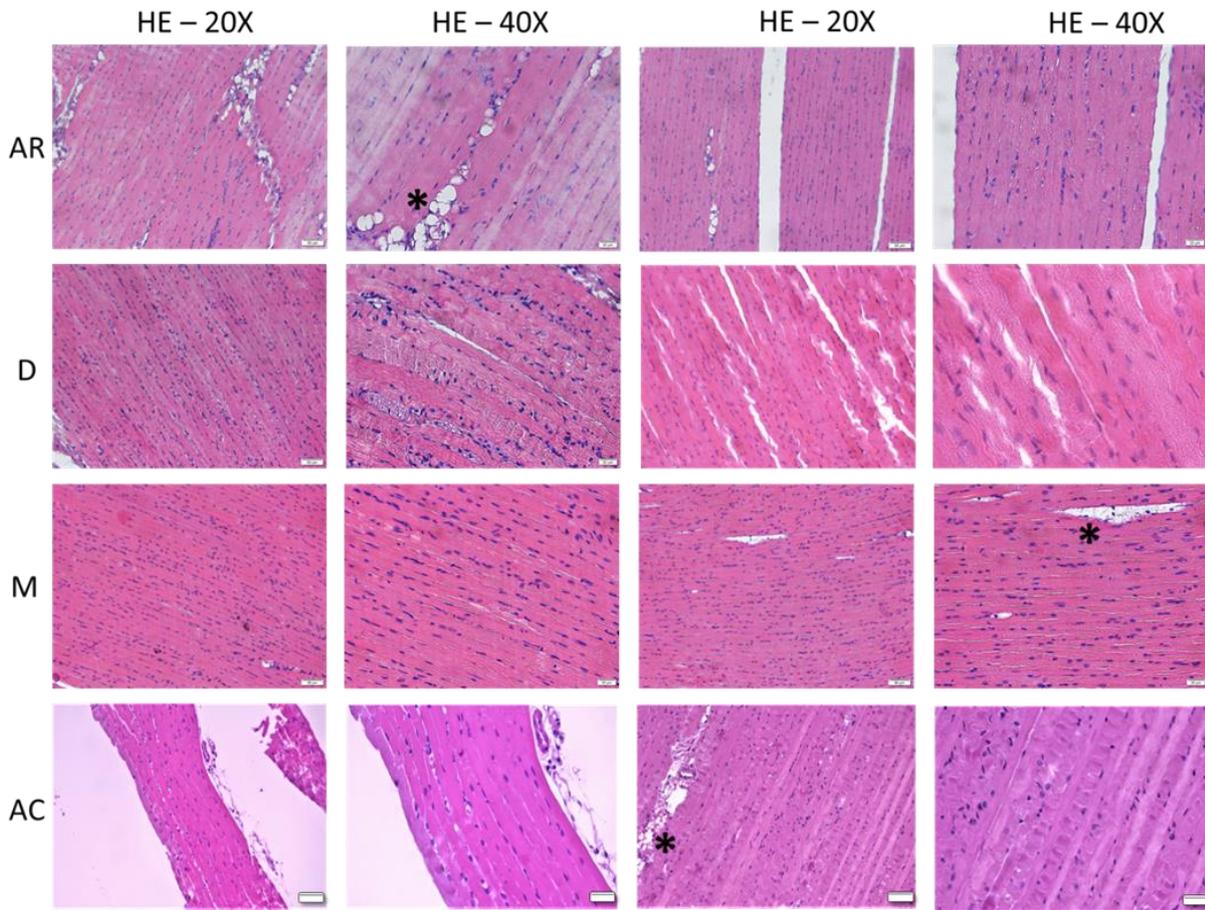
Histologia – Musculo esquelético – *Molossus molossus*



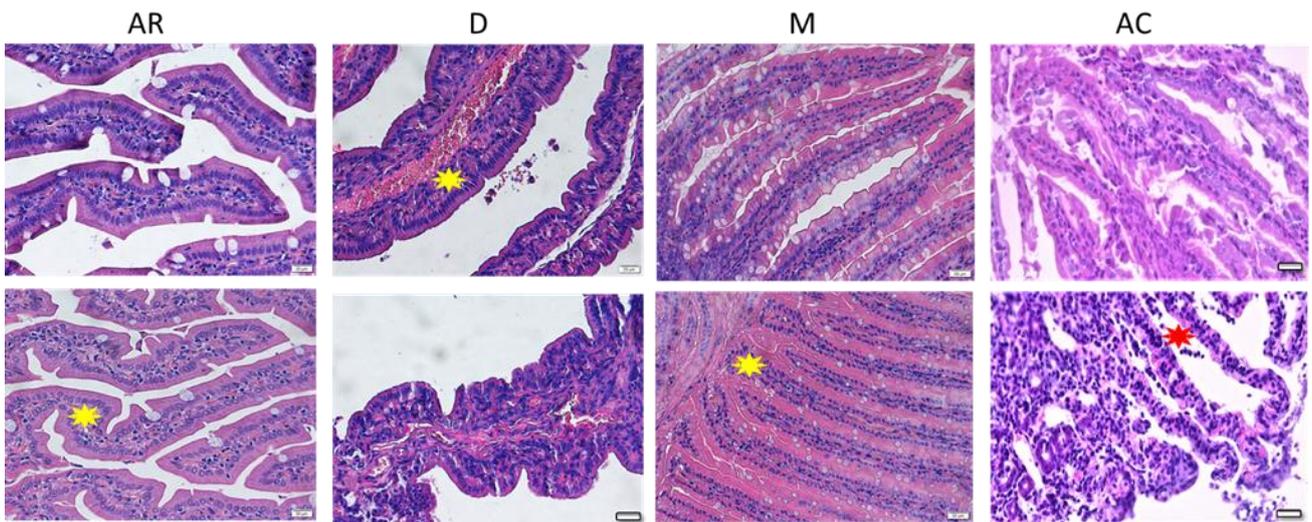
Histologia – Fígado – Com todos + *Anoura caudifer*



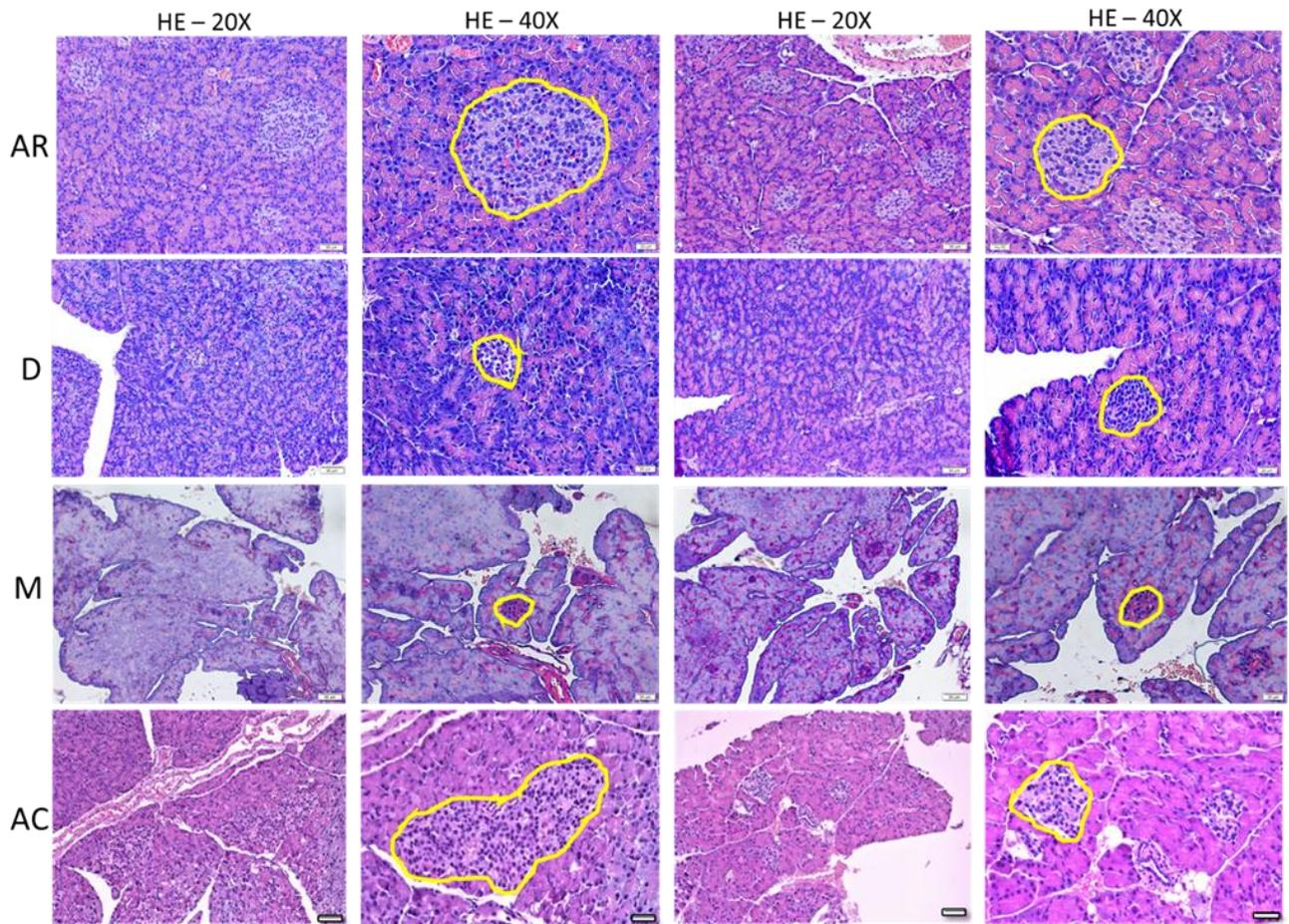
Histologia – Musculo esquelético – Com todos + *Anoura caudifer*



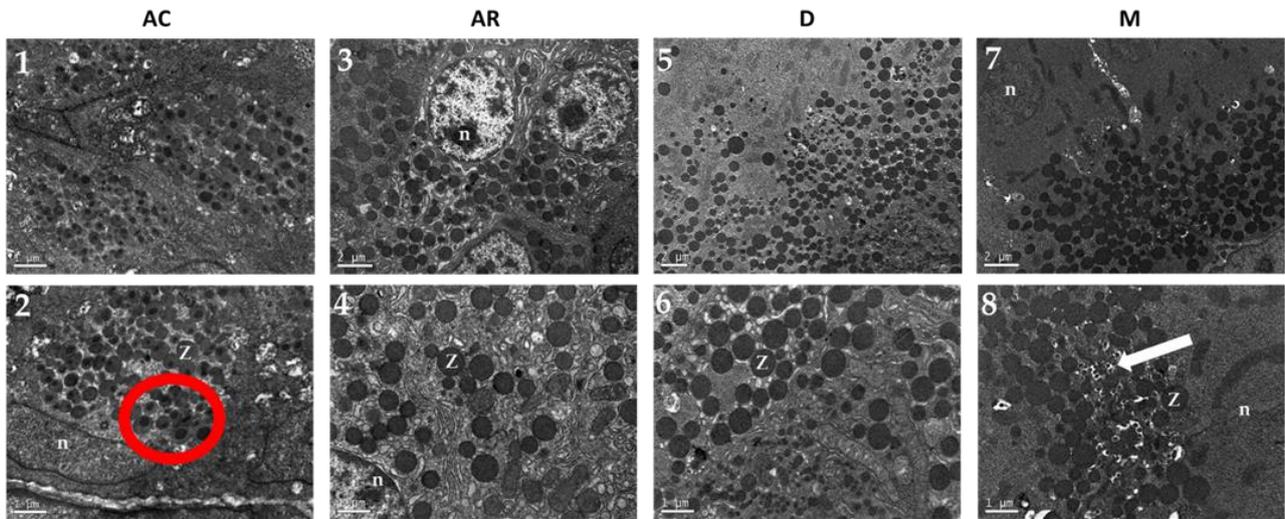
Histologia – Intestino proximal – Com todos + *Anoura caudifer*



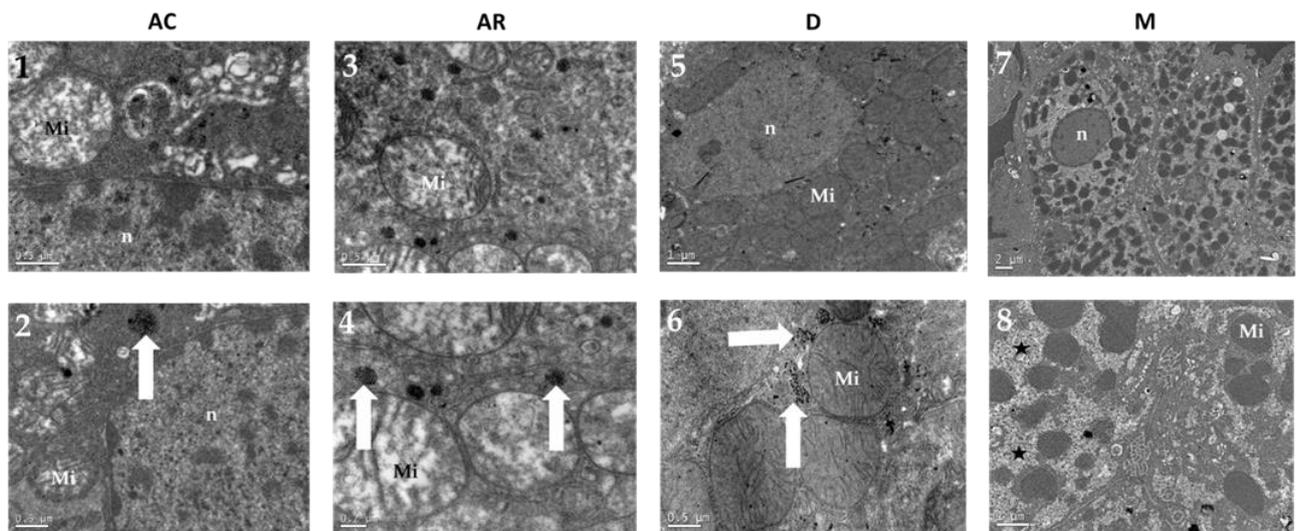
Histologia – Pâncreas – Com todos + *Anoura caudifer*



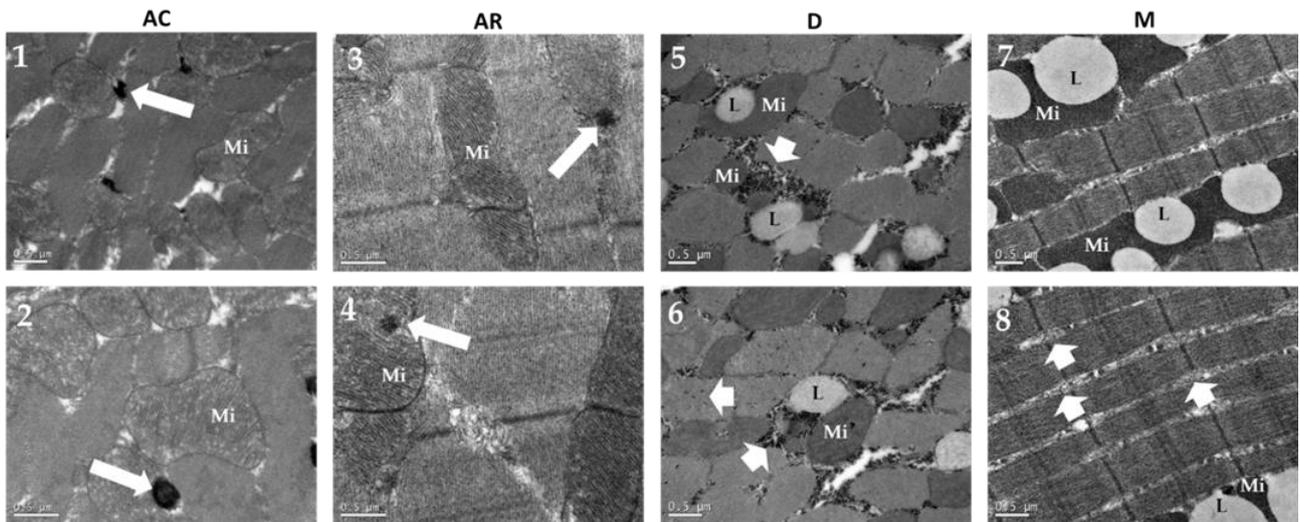
Microscopia Eletrônica de Varredura (MET) – Todos - PANCREAS



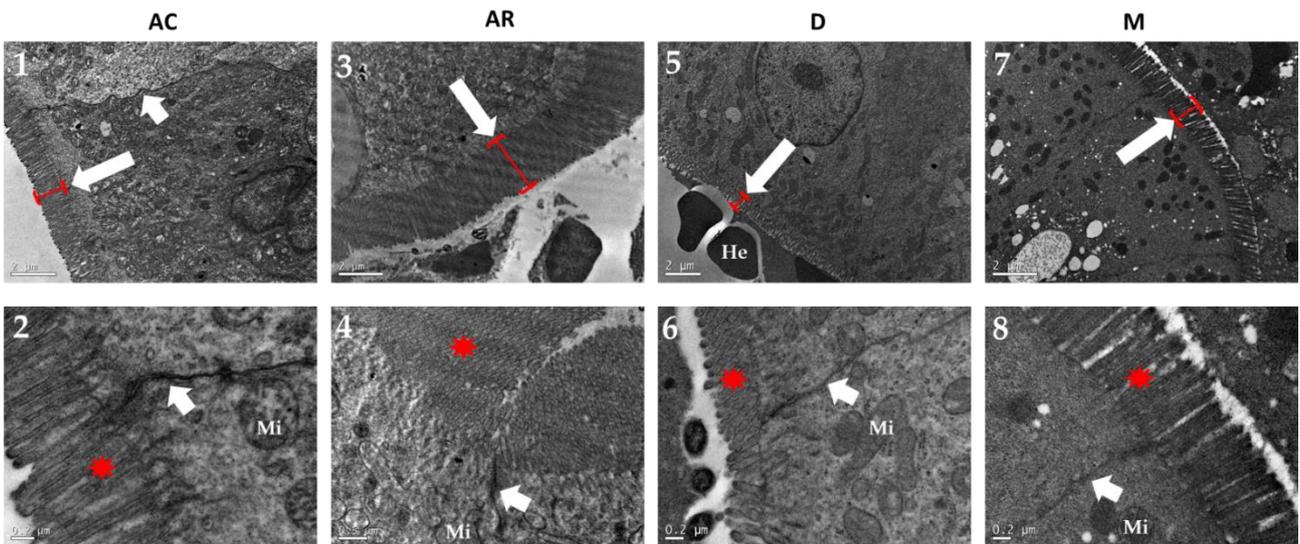
Microscopia Eletrônica de Varredura (MET) – Todos - FÍGADO



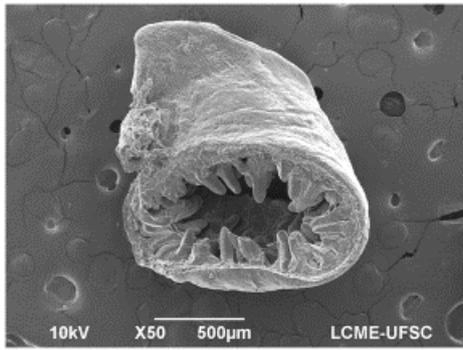
Microscopia Eletrônica de Varredura (MET) – Todos - MUSCULO



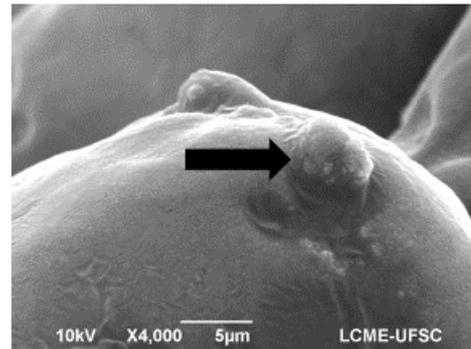
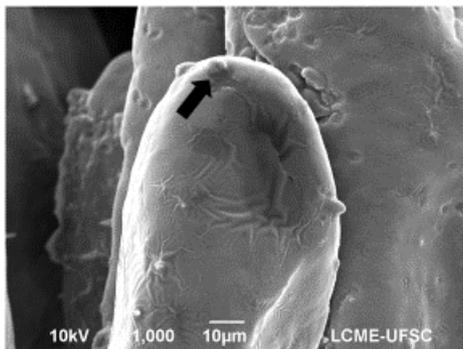
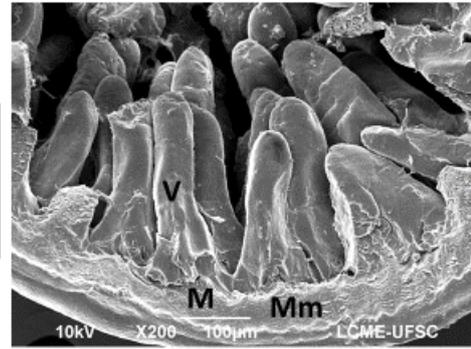
Microscopia Eletrônica de Varredura (MET) – Todos – INTESTINO



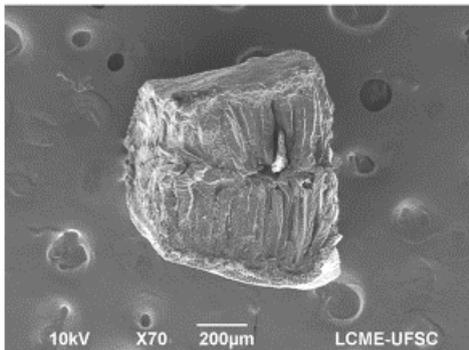
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) – *Artibeus lituratus*



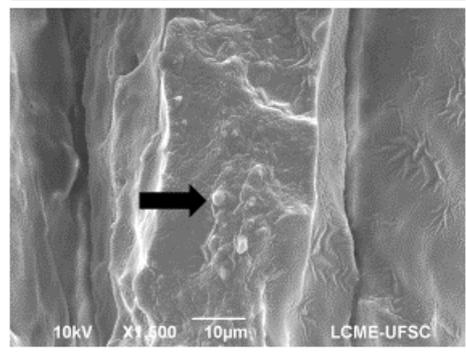
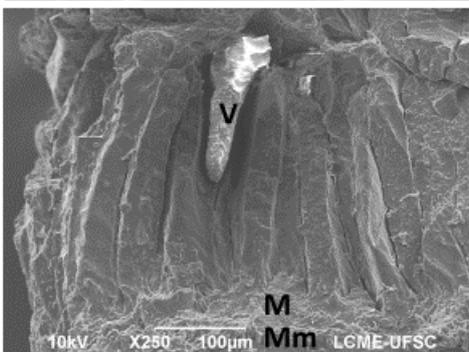
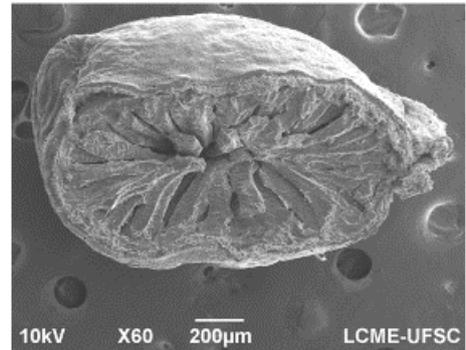
Intestino proximal
 Seta = Célula caliciforme
 M = Mucosa
 Mm = Túnica muscular
 V = Vilosidades



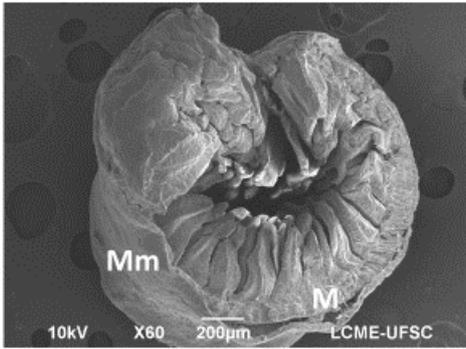
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) – *Desmodus rotundus*



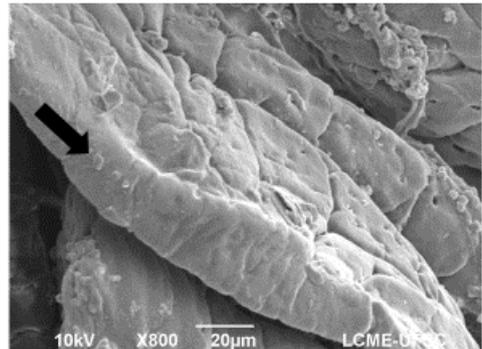
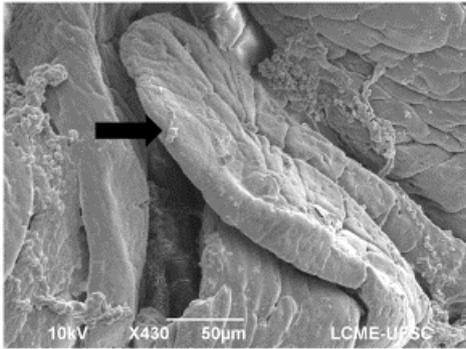
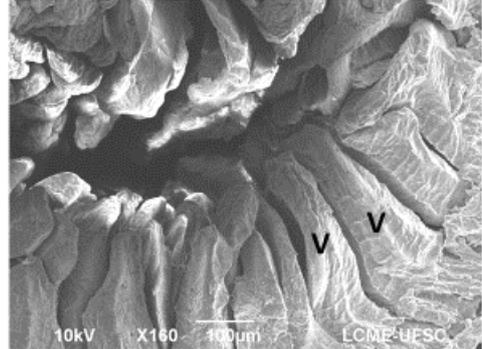
Intestino proximal
 Seta = Célula caliciforme
 M = Mucosa
 Mm = Túnica muscular
 V = Vilosidades



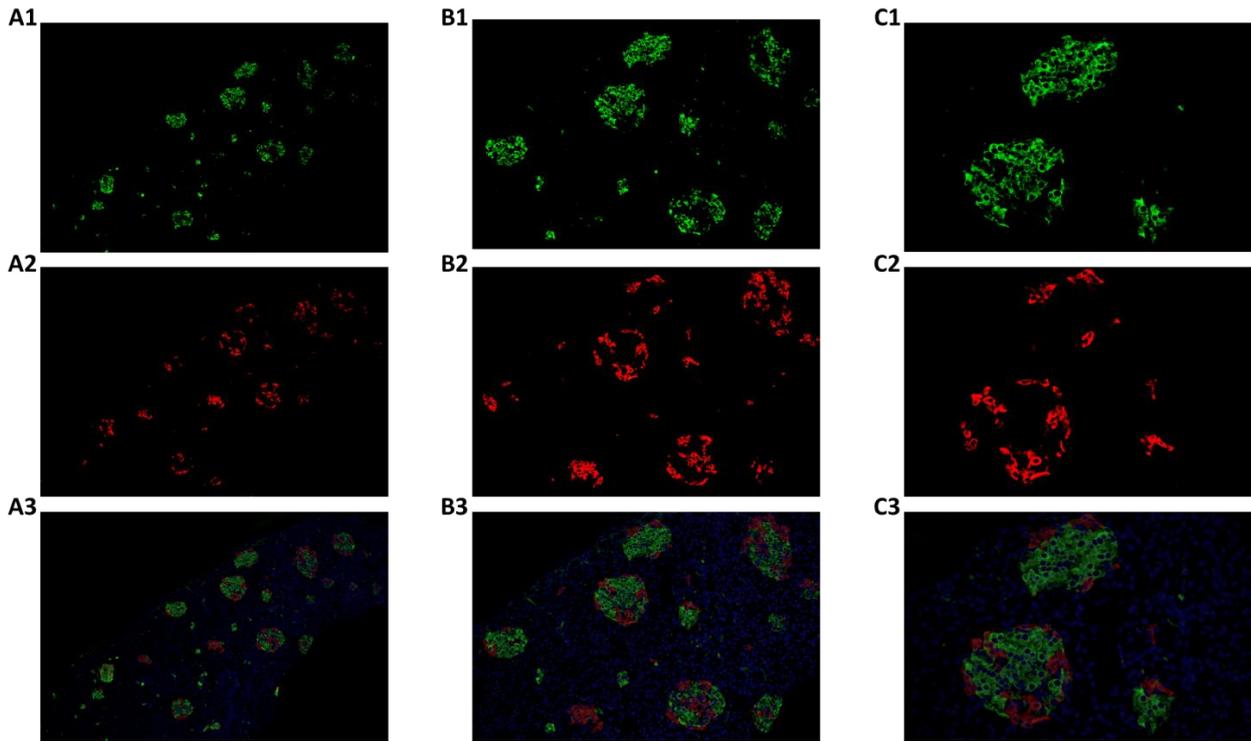
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) – *Molossus molossus*



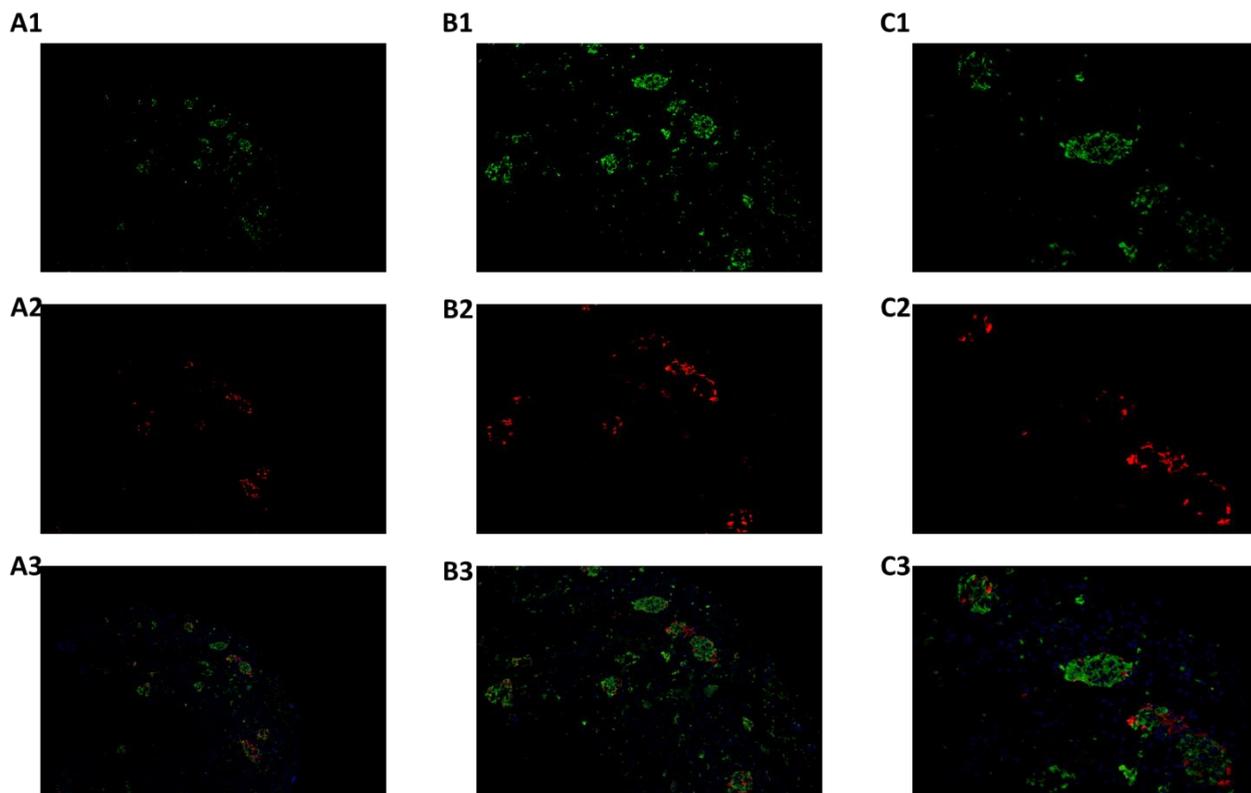
Intestino proximal
Seta = Célula caliciforme
M = Mucosa
Mm = Túnica muscular
V = Vilosidades



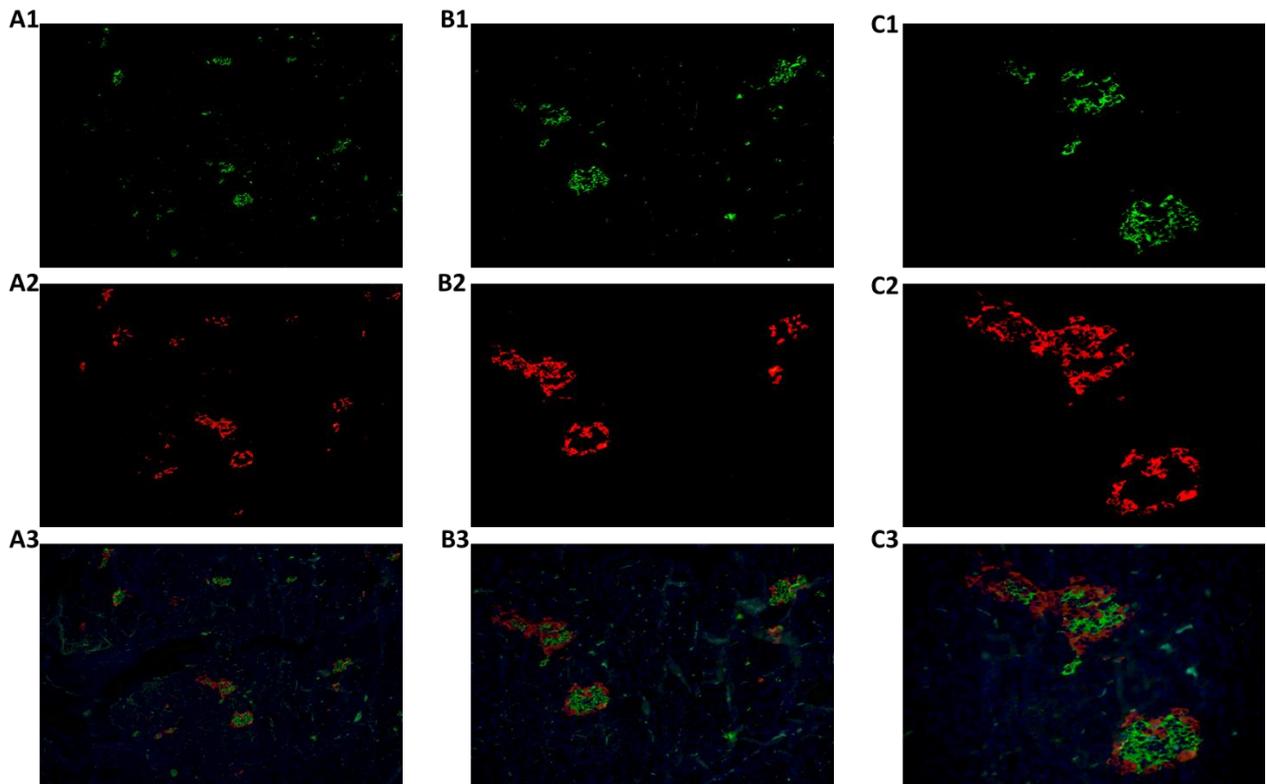
Imunofluorescência – *Artibeus lituratus*



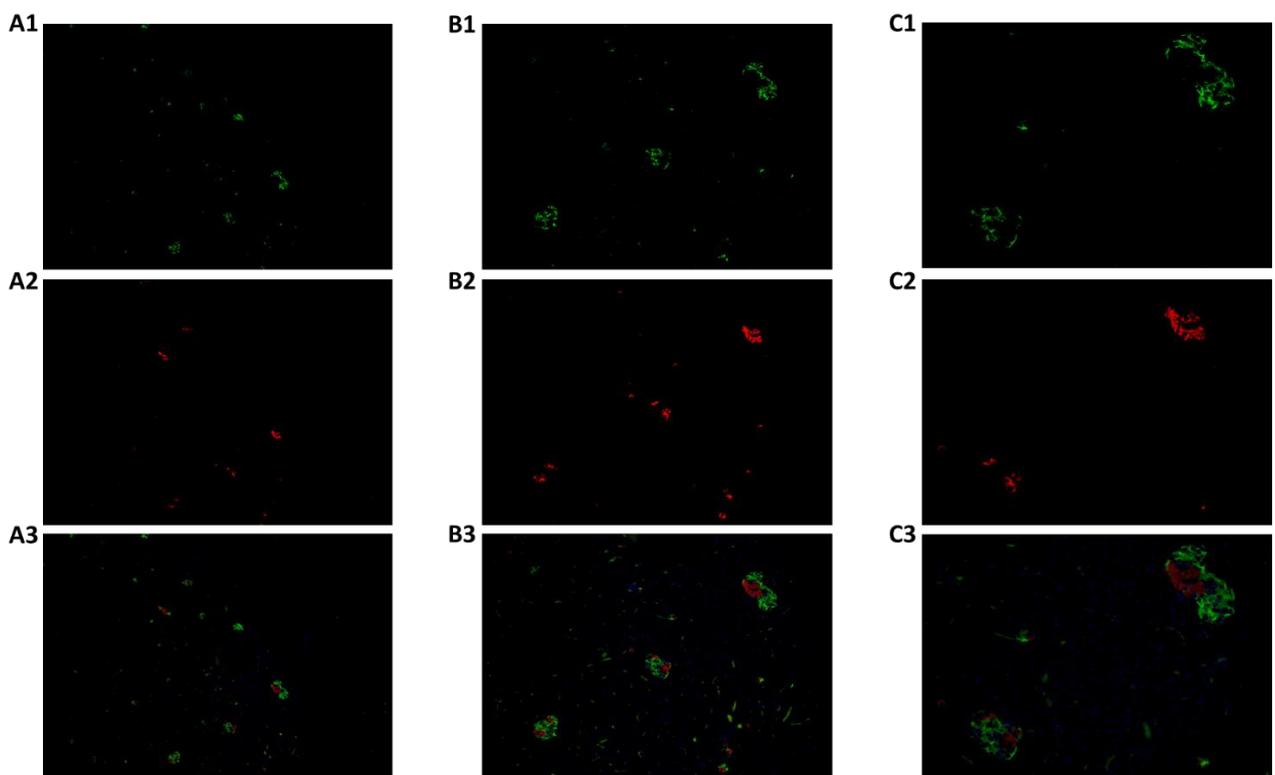
Imunofluorescência – *Anoura caudiffer*



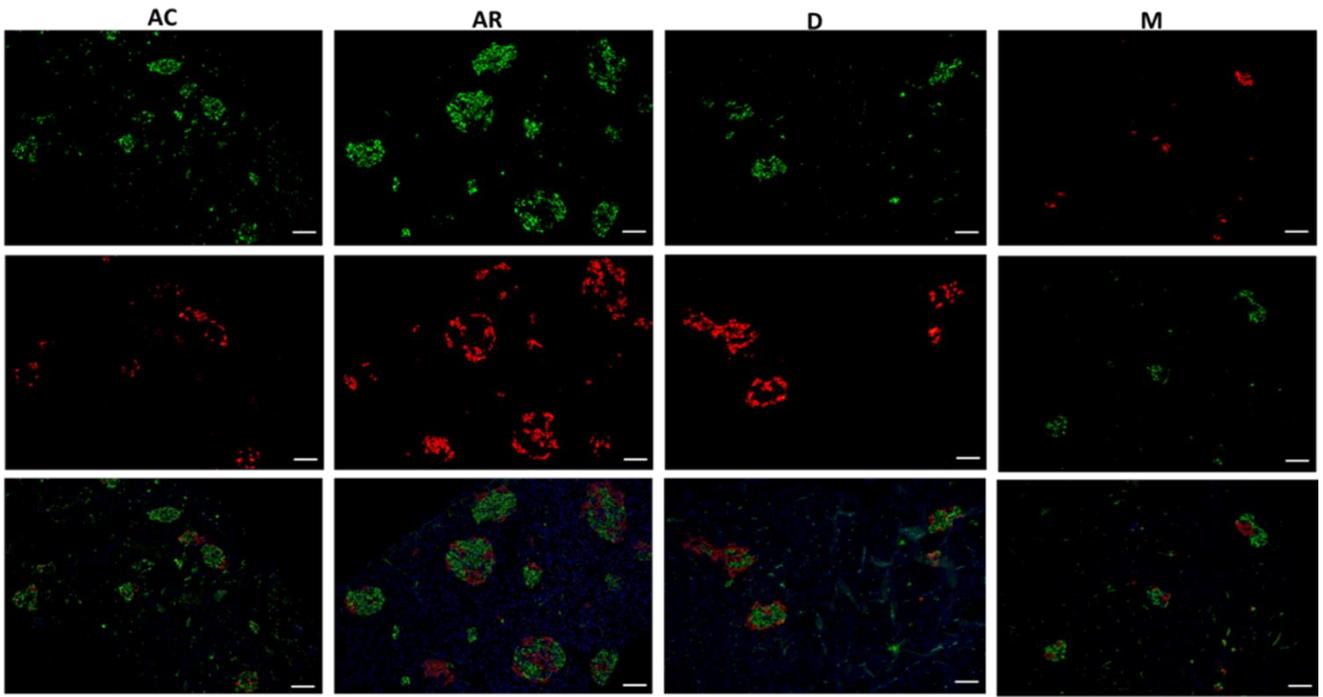
Imunofluorescência – *Desmodus rotundus*



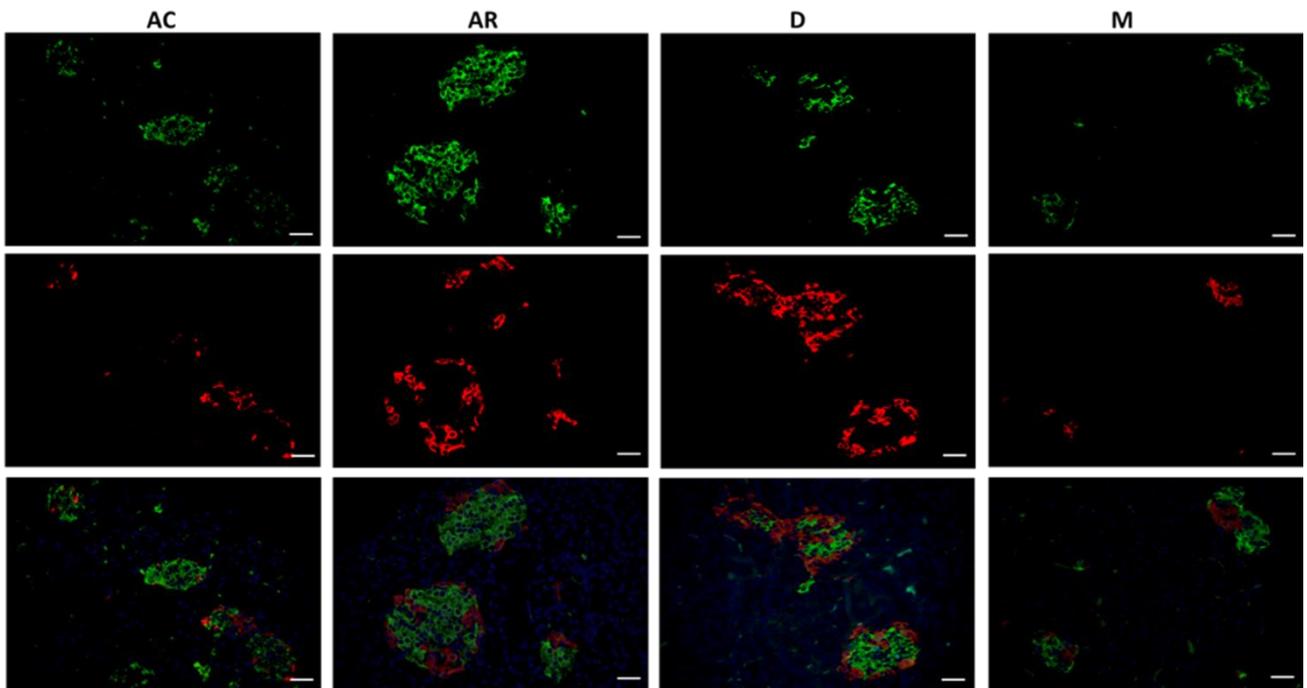
Imunofluorescência – *Molossus molossus*



Imunofluorescência – *COMPARATIVO TODOS* – 20X



Imunofluorescência – COMPARATIVO TODOS – 40 X



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Distribuição e massa de células alfa, beta e delta pancreáticas em morcegos (Mammalia, Chiroptera): uma abordagem funcional e estrutural pautada nos diferentes hábitos alimentares", protocolada sob o CEUA nº 1725300517, sob a responsabilidade de **Alex Rafacho e equipe; Guilherme Durante Cruz** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 05/09/2017.

We certify that the proposal "Distribution and mass of pancreatic alpha, beta and delta cells in bats (Mammalia, Chiroptera): a functional and structural approach based on different eating habits", utilizing 50 Brazilian wild species (males and females), protocol number CEUA 1725300517, under the responsibility of **Alex Rafacho and team; Guilherme Durante Cruz** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 09/05/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07/2017** a **03/2021** Área: **Ciências Fisiológicas**

Origem: **CCB - Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas - LIDoC**

Espécie: **Espécies silvestres brasileiras** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **1 a 5 anos** N: **50**

Linagem: **De acordo com o delineamento** Peso: **20 a 70 g**

Registro IBAMA/Sisbio/Etc: **Protocolo Sisbio numero: 6852657**

Método de Captura: **Os animais serão capturados predominantemente em Rede de Neblina, devidamente instaladas e sob a supervisão do prof. Sérgio Althoff (FURB - Blumenau/SC). O prof. Sérgio é um dos grandes zoólogos do Brasil e sem dúvida da região sul que estará atuando como colaborador/co-orientador desta proposta. Eventualmente apenas como método auxiliar, uma Puçá pode ser necessária.**

Resumo: O estudo das ilhotas pancreáticas vem sendo realizado por inúmeros grupos de pesquisa no sentido de compreender melhor suas características celulares e fisiológicas com o intuito de relacionar estes conhecimentos não só ao metabolismo corpóreo geral mas também com contexto patológicos, como observado numa das principais doenças da atualidade: o diabetes mellitus. A conformação e plasticidade celular das ilhotas pancreáticas estão fortemente relacionadas a fatores extrínsecos (ex., hábito alimentar, stress, gestação) e, os morcegos, que apresentam inúmeras semelhanças com o organismo humano, são alvos muito interessantes para a compreensão das adaptações pancreáticas, haja vista que possuem alimentação específica de acordo com cada espécie. Tal aspecto biológico pode se servir como um modelo in vivo interessante para melhor compreensão das relações entre os hábitos alimentares e a citoarquitetura celular nas ilhotas pancreáticas. Assim, esperamos avaliar quais adaptações celulares foram definidas ao longo da evolução destes mamíferos sobre as células beta, alfa e delta pancreáticas. Com esse estudo visamos compreender se há uma relação entre o hábito alimentar e a configuração celular que venha a se servir de base para adaptações pancreáticas semelhantes que venham a ocorrer em contextos patofisiológicos envolvendo este microórgão. Para tal, coletaremos morcegos de 3 a 5 espécies distintas (vide delineamento experimental) que serão mantidos por até 3 dias para realização de testes funcionais e serão eutanasiados para a coleta do pâncreas para posterior quantificação das células beta, alfa e delta pancreáticas. O conteúdo de glicogênio e lipídeos hepáticos e musculares, bem como a determinação do comprimento intestinal também serão avaliados. Nossa expectativa é que animais com padrões alimentares e metabólicos distintos (ex., nectarívoro, hematófago, insectívoro) apresentarão citoarquitetura endócrina distintas permitindo-nos compreender quais adaptações celulares correspondem a cada hábito alimentar.

Local do experimento: Local: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Fisiológicas, LIDoC (Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas).

Rua Desembargador Vitor Lima, 222, sala 401 - Trindade - Florianópolis/Santa Catarina-SC CEP: 88040-400 - tel: 55 (48) 3721-6093 / fax: -
Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8h às 12h e das 14h às 18h : e-mail: ceua.propesq@contato.ufsc.br
CEUA N 1725300517

Florianópolis, 05 de setembro de 2017

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Maria Alcina Martins de Castro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



Florianópolis, 23 de dezembro de 2019
CEUA N 1725300517

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Alex Rafacho

Área: Ciências Fisiológicas

Título da proposta: "Distribuição e massa de células alfa, beta e delta pancreáticas em morcegos (Mammalia, Chiroptera): uma abordagem funcional e estrutural pautada nos diferentes hábitos alimentares".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFSC (ID 000878)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 06/novembro/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Estimado Sr. Presidente, Nossa solicitação segue em anexo. Grato desde já pela atenção e ficamos à disposição para esclarecimentos. Alex Rafacho e Guilherme D Cruz".

Comentário da CEUA: "RESULTADO DA REUNIÃO DA CEUA - APROVADO Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela Aprovação. - vide pareceres Atenciosamente, Divisão Administrativa - CEUA parecer: APROVADO - Solicita captura de 6 morcegos Glossophaga oricina ou Anoura geoffroyi, espécies nectarívoras. Favorável ao adendo. Maurício 11/12/2019".

Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Junior
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 58350-3	Data da Emissão: 12/02/2019 11:15:35	Data da Revalidação*: 12/02/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Alex Rafacho	CPF: 285.799.478-80
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA	CNPJ: 83.899.526/0001-82

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Período em que ocorrerão as coletas em campo das diferentes espécies	06/2017	06/2019
2	Período reservado as abordagens histomorfométricas	07/2018	12/2020
3	Período reservado as abordagens in vitro (rotinas histológicas)	06/2017	12/2020
4	Discussão, interpretação e análise dos dados	06/2017	12/2020
5	Período reservado as abordagens plasmáticas	06/2017	12/2020
6	Período reservado as abordagens in vivo (GTT e ITT)	06/2017	06/2019
7	Período reservado as abordagens in vitro (conteúdo de glicogênio)	06/2017	12/2020

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	SÉRGIO LUIZ ALTHOFF	Captura, identificação e marcação dos morcegos	543.084.619-87	Brasileira
2	Maciel Alencar Bruxel	Participação nas análises laboratoriais	007.955.460-17	Brasileira
3	Guilherme Durante Cruz	Executor líder (doutorando)	195.460.368-11	Brasileira
4	ARTUR STANKE SOBRINHO	Participação na coleta em campo	060.541.509-95	Brasileira
5	João Pedro Garcia	Participação na coleta em campo	110.249.819-08	Brasileira
6	LEVI KOCH BECKHAUSER	Participação na coleta em campo	058.653.839-90	Brasileira
7	Fabio de Carvalho Ferreira	Participação na coleta em campo	711.449.860-87	Brasileira
8	João Vítor Schaidt	Participação nas análises laboratoriais	087.011.899-48	Brasileira

Observações e ressalvas

1	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
2	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
3	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
4	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa n.º 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0583500320190212

Página 1/4

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 58350-3	Data da Emissão: 12/02/2019 11:15:35	Data da Revalidação*: 12/02/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Alex Rafacho	CPF: 285.799.478-80
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA	CNPJ: 83.899.526/0001-82

Observações e ressalvas

5	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
6	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Outras ressalvas

1	A presente autorização só terá validade após aprovação pela comissão de ética no uso de animais da UFSC. As redes de neblinas deverão ser verificadas no mínimo de 20 em 20 minutos. Não está autorizada a coleta, transporte de fêmeas grávidas ou em processo de amamentação.	CGPEQ
2	As redes de neblinas deverão ser verificadas no mínimo de 20 em 20 minutos. Não está autorizada a coleta, transporte de fêmeas grávidas ou em processo de amamentação.	COINF

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Áreas urbanas ou propriedades rurais	Vidal Ramos-SC	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
2	Áreas urbanas ou propriedades rurais	Navegantes-SC	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
3	Áreas urbanas e/ou propriedades rurais	Blumenau-SC	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
4	Áreas urbanas e/ou propriedades rurais	Ibirama-SC	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
5	Áreas urbanas e/ou propriedades rurais	Florianópolis-SC	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
6	Áreas urbanas e/ou propriedades rurais	Rio Fortuna-SC	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
7	Áreas urbanas e/ou propriedades rurais	São Bento do Sul-SC	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Artibeus lituratus	20
2	Captura de animais silvestres in situ	Artibeus lituratus	-
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Artibeus lituratus	-
4	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Desmodus rotundus	20

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 58350-3	Data da Emissão: 12/02/2019 11:15:35	Data da Revalidação*: 12/02/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Alex Rafacho	CPF: 285.799.478-80
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA	CNPJ: 83.899.526/0001-82

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
5	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Desmodus rotundus	-
6	Captura de animais silvestres in situ	Desmodus rotundus	-
7	Captura de animais silvestres in situ	Glossophaga soricina	-
8	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Glossophaga soricina	-
9	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Glossophaga soricina	20
10	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Molossus molossus	20
11	Captura de animais silvestres in situ	Molossus molossus	-
12	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Molossus molossus	-
13	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Noctilio leporinus	-
14	Captura de animais silvestres in situ	Noctilio leporinus	-
15	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Noctilio leporinus	20

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Fragmento de tecido/órgão, Sangue
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Rede de neblina, Puçá
3	Método de marcação (Outros mamíferos)	Colar

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA	Laboratório

