



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

MORGANA CONTINI

Relação entre a dieta predominante e a composição do pâncreas endócrino em morcegos frugívoros, insetívoros e nectarívoros

Florianópolis
2023

MORGANA CONTINI

Relação entre a dieta predominante e a composição do pâncreas endócrino em morcegos frugívoros, insetívoros e nectarívoros

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestra em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Alex Rafacho

Florianópolis

2023

Contini, Morgana

Relação entre a dieta predominante e a composição do pâncreas endócrino em morcegos frugívoros, insetívoros e nectarívoros / Morgana Contini ; orientador, Alex Rafacho, 2023.

48 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Fisiológicas. 2. morcegos. 3. evolução. 4. pâncreas endócrino. 5. histologia. I. Rafacho, Alex. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. III. Título.

MORGANA CONTINI

Relação entre a dieta predominante e a composição do pâncreas endócrino em morcegos frugívoros, insetívoros e nectarívoros

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

Prof^ª Dr^ª Mariella Bontempo de Freitas
Instituição: Universidade Federal de Viçosa

Prof^ª Dr^ª Fernanda Barbosa Lima
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

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

Prof. Dr. Guilherme Fleury Fina Speretta
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Alex Rafacho
Orientador

Florianópolis
2023

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Prof. Alex pela oportunidade de ter sido sua orientanda, por todos os ensinamentos, por sempre direcionar seus orientandos à excelência, pela generosidade e preocupação com meu futuro, não medindo esforços para me ajudar neste sentido, e também pela confiança em meu trabalho.

Agradeço aos colegas de laboratório, em especial à Aline, Natália, Victoria, Priscila e Milena que foram com quem tive mais convivência neste tempo. Obrigada por todo o apoio profissional e emocional, por muitas vezes terem sido além de colegas de laboratório, verdadeiras professoras, por acreditarem em mim mais do que eu mesma acreditava, por todas as risadas, cafés e conversas, e pelo ombro amigo nos momentos difíceis. Tenho certeza que levarei vocês pra vida, não só como amigas, mas como parceiras científicas também.

Agradeço à colega e amiga Luma, por todos os momentos de conversa, por ter sido apoio em momentos difíceis e parceria em momentos felizes. Tenho certeza que também levarei esta amizade pra vida e para além do campo acadêmico.

Agradeço à toda a equipe do IBILCE da UNESP pela colaboração neste trabalho, especialmente ao Prof. Sebastião Taboga e ao Thalles que além de terem sido muito solícitos em todos os momentos em que necessitamos, me receberam em seu laboratório para realizar parte importante do processamento das amostras.

Agradeço à toda a equipe do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC, especialmente ao professor Filipe Modolo e a técnica Gilmara, por terem cedido o micrótomo para os cortes dos blocos de parafina, além de terem dado diversas dicas de histologia.

Agradeço ao LAMEB da UFSC pelo apoio técnico nos momentos necessários.

Agradeço às agências de fomento Capes e CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço aos meus pais, por sempre serem meus maiores incentivadores a continuar meus estudos, algo que sei que não puderam fazer e por este motivo dou tanto valor à esta conquista.

E por fim, agradeço ao meu namorado Juliano por estar ao meu lado e ter sido apoio físico, psicológico e emocional em diversos momentos ao longo desta caminhada, sempre entendendo e apoiando minhas decisões com sensibilidade, empatia e doação.

“The world needs all kinds of minds.”

Temple Grandin

Resumo

Os morcegos são os únicos mamíferos adaptados ao voo, e possuem diversidade alimentar única, havendo espécies insetívoras, frugívoras, nectarívoras, hematófagas, piscívoras, onívoras e carnívoras. Morcegos frugívoros e nectarívoros possuem dieta rica em açúcares, enquanto nos insetívoros, é rica em proteínas. Tais perfis alimentares devem ter ocorrido paralelamente aos ajustes no aparato metabólico de cada espécie. Alguns estudos já exploraram a histoarquitetura das ilhotas pancreáticas de morcegos procurando relacioná-la com hábitos alimentares, porém, um ponto de vista comparativo e que inclua um grande número de espécies é raramente visto. Assim, por meio de análises histomorfométricas, buscamos descrever e comparar a distribuição das ilhotas pancreáticas e proporção de células- α em morcegos de cinco espécies diferentes, focando em três nichos alimentares (frugívoros – *Artibeus lituratus* e *Carollia perspicillata*, insetívoros – *Molossus molossus* e *Myotis nigricans*, e nectarívoros – *Glossophaga soricina*). Para tal, lâminas com amostras de pâncreas das referidas espécies foram coradas por hematoxilina/eosina ou tricrômico de Gömori, além de realizadas imunomarcações para glucagon. Valores de área, perímetro, diâmetro, raio, massa relativa, densidade, grau de esfericidade, e proporção de células- α das ilhotas foram quantificados. A área, diâmetro médio e raio médio de ilhotas foram maiores no frugívoro *A. lituratus* quando comparado com os insetívoros *M. molossus* e *M. nigricans*. Esses parâmetros também foram maiores no nectarívoro *G. soricina* quando comparado com *M. nigricans*. Os valores de massa relativa de pâncreas endócrino e perímetro de ilhotas foram maiores em *A. lituratus* e *G. soricina* quando comparados a *M. molossus* e *M. nigricans*. Não foram encontradas diferenças de densidade de ilhotas entre os grupos, mas o grau de esfericidade, indicando ilhotas mais disformes, foi menor nos insetívoros *M. nigricans* e nectarívoros *G. soricina*. Quando realizada uma estratificação das ilhotas por tamanho, os morcegos insetívoros exibiram ilhotas mais prevalentes nas faixas menores, enquanto nos frugívoros e nectarívoros houve o padrão oposto. A proporção de células- α por ilhota foi maior nas espécies insetívoras quando comparados aos frugívoros e nectarívoro. Assim, concluímos que os morcegos frugívoros *A. lituratus* e os nectarívoros *G. soricina* exibem maior massa de ilhotas pancreáticas do que as espécies insetívoras que decorre de maior tamanho e não do número de ilhotas, enquanto os morcegos insetívoros possuem maior proporção de células- α por ilhota. Tais configurações indicam a ocorrência de ajustes espécie-específicos no pâncreas endócrino ao longo da fixação destas espécies em seus determinados hábitos alimentares.

Palavras-chave: morcegos, histologia, ilhotas pancreáticas, pâncreas endócrino.

Abstract

Bats are the only mammals adapted to flight, and have a unique food diversity, with insectivorous, frugivorous, nectarivorous, hematophagous, piscivorous, omnivorous and carnivorous species. Frugivorous and nectarivorous bats have a diet rich in sugars, while in insectivores it is rich in proteins. Such dietary profiles must have occurred in parallel with adjustments in the metabolic apparatus of each species. Some studies already describe islet architecture in bats relating it to diet, but a comparative point of view, with a large number of species is hardly seen. Thus, using histomorphometric techniques, we aim to describe and compare the endocrine pancreas distribution and α -cell proportion in five different species, from three food niches (frugivores – *Artibeus lituratus* and *Carollia perspicillata*, insectivores – *Molossus molossus* and *Myotis nigricans*, and nectarivores – *Glossophaga soricina*). For this purpose, slides with pancreas samples from the referred species were stained with hematoxylin/eosin or Gömori's trichrome, in addition to immunostaining for glucagon. Values for area, perimeter, diameter, radius, relative mass, density, roundness-factor, and islet α -cell proportion were quantified. The area, mean diameter and mean radius of islets were greater in the frugivore *A. lituratus* when compared to the insectivores *M. molossus* and *M. nigricans*. These parameters were also higher in the nectarivore *G. soricina* when compared to *M. nigricans*. Values for relative mass of endocrine pancreas and islet perimeter were higher in *A. lituratus* and *G. soricina* when compared to *M. molossus* and *M. nigricans*. No differences in islet density were identified between groups, but the roundness-factor, indicating more irregular-shaped islets, was lower in insectivores *M. nigricans* and nectarivores *G. soricina*. When the islets were stratified by size, insectivorous bats exhibited the majority of islets in smaller sizes, while in frugivores and nectarivores there was the opposite pattern. The α -cells distribution was higher in insectivorous species when compared to frugivores and nectarivores. Thus, we conclude that fruit bats *A. lituratus* and nectarivores *G. soricina* exhibit greater pancreatic islet mass than insectivorous species, which is due to the larger size and not the number of islets, while insectivorous bats have a higher proportion of α -cells per islet. Such configurations indicate the occurrence of species-specific adjustments in the endocrine pancreas across species with different eating habits.

Keywords: bats, histology, pancreatic islets, endocrine pancreas.

Lista de Figuras

Figura 1. Espécies utilizadas.....	19
Figura 2. Quantificação de área total de tecido pancreático.....	23
Figura 3. Histologia pancreática, área média, perímetro e grau de esfericidade de ilhotas.....	26
Figura 4. Diâmetro mínimo, máximo, médio e raio médio.....	28
Figura 5. Massa relativa de pâncreas endócrino e densidade de ilhotas.....	29
Figura 6. Representação da densidade de ilhotas.....	30
Figura 7. Distribuição de ilhotas por tamanho.....	31
Figura 8. Distribuição e estimativa da proporção de células- α	32

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sumarização das principais características das espécies utilizadas.....19

Tabela 2. Diâmetro mínimo, máximo e médio para as cinco espécies de morcego.....28

Lista de Anexos

Anexo 1. Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal do IBILCE – Universidade Estadual de São Paulo.....	47
--	----

Lista de Abreviações e símbolos

Slc2a4 – do inglês “solute carrier family 2 member 4”

GLUT-4 – do inglês “Glucose transporter 4”

μm – micrômetros

Células- β – células-beta

Células- α – células alfa

Células- δ – Células delta

Células PP – Células produtoras de polipeptídeo pancreático

Sumário

1. Introdução	13
2. Objetivo	20
2.1. Objetivos específicos	20
3. Materiais e métodos	20
3.1. Autorizações e coleta dos animais	20
3.2. Material utilizado	21
3.3. Microtomia	21
3.4. Colorações e digitalização	22
3.5. Imunohistoquímica	22
3.6. Análises morfométricas	23
3.6.1. Área, perímetro, diâmetro e raio de ilhotas	23
3.6.2. Massa relativa, densidade e esfericidade de ilhotas	23
3.6.3. Distribuição das ilhotas por tamanho (histograma)	24
3.6.4. Distribuição e estimativa da proporção de células-α	24
3.7. Análise estatística	24
4. Resultados	25
4.1. Morfologia, área média, perímetro e grau de esfericidade de ilhotas	25
4.2. Diâmetro mínimo, médio, máximo e raio médio de ilhotas	27
4.3. Massa relativa de pâncreas endócrino e densidade de ilhotas	29
4.4. Distribuição das ilhotas por tamanho (histograma)	30
4.5. Distribuição e estimativa da proporção de células-α	31
5. Discussão	32
6. Limitações	38
7. Referências	38
8. Anexos	47

1 – Introdução

Os morcegos são os únicos mamíferos adaptados para o voo verdadeiro (ARITA; FENTON, 1997). Provenientes da coorte Placentalia, esses animais pertencem à mega-ordem Epitheria e ordem Chiroptera (GARDNER, 2007). Por serem animais noturnos, uma característica importante de sua biologia é a ecolocalização, presente em grande parte das espécies, onde ornamentações faciais os permitem emitir sons de alta frequência pela boca e nariz. As ondas sonoras refletidas são captadas, dando noção de posição e distância de objetos no espaço (GONZÁLEZ, 1998; REIS *et al.*, 2007).

As análises moleculares mais atuais possibilitaram um rearranjo da classificação filogenética dos morcegos, alterando a subdivisão da ordem Chiroptera em Yinpterochiropera e Yangochiroptera. Apesar disso, muitos autores continuam a usar a divisão clássica das duas subordens em Megachiroptera e Microchiroptera (PERACCHI *et al.*, 2006; SIMMONS, 2000; SOTERO-CAIO; BAKER; VOLLETH, 2017). Esta classificação sistemática dos morcegos vem mudando constantemente, e hoje o banco de dados da Sociedade Americana de Mamologistas (MAMMAL DIVERSITY DATABASE, 2023) registra na ordem dos quirópteros 21 famílias, 234 gêneros e 1.460 espécies, sendo nove extintas nos últimos 500 anos.

Abordando a divisão clássica, os Megaquirópteros compreendem apenas uma família (Pteropodidae), com cerca de 46 gêneros e 196 espécies e sua ocorrência se restringe ao Velho Mundo (África, Índia, Ásia e Austrália). São animais de tamanho médio a grande e não possuem ornamentações faciais e nasais, pois em sua maioria não apresentam ecolocalização. (MAMMAL DIVERSITY DATABASE, 2023; PERACCHI *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2007). Já os Microquirópteros, possuem 20 famílias, com 188 gêneros e 1.264 espécies, espalhados no mundo todo, menos nas regiões polares (MAMMAL DIVERSITY DATABASE, 2023; SIMMONS, 2000; SIMMONS, 2005). São animais que em sua maioria apresentam tamanho médio, porém há exceções (NOWAK, 1994; EMMONS; FEER, 1990). Possuem olhos pequenos, e pouca percepção de cores, embora não sejam cegos. Utilizam a ecolocalização para navegação e, portanto, ornamentos faciais são comuns (NEUWEILER, 2000).

No Brasil, todos os animais pertencem à subordem Microquiróptera, e segundo a Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros (GARBITO *et al.*, 2020) a lista atualizada seria de 9 famílias, 68 gêneros e 181 espécies ocorrendo no país, habitando todo o território nacional, inclusive em áreas urbanas. Podem se abrigar em diferentes espaços, como cavernas, tocas de pedra, ocos de árvore e árvores caídas, entre folhas de palmeira ou bananeira, raízes

nas beiras de rios, e até forros de casas e tubulações fluviais (PERACCHI *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2007).

A biologia reprodutiva também varia entre os quirópteros. Os morcegos normalmente produzem um filhote ao ano, porém em casos raros podem chegar a quatro. A duração da gestação varia entre 44 dias e 11 meses, e a maioria das espécies são monoéstricas (um ciclo ao ano), mas também existem morcegos que apresentam poliestria (vários ciclos ao ano). Acredita-se que as fêmeas ancestrais fossem poliéstricas, de onde a monoestria surgiu em zonas geográficas mais sazonais (REIS, 1981; RACEY; ENTWISTLE, 2000).

O voo é extremamente custoso quando se trata de taxa metabólica. Desta forma, ao longo da evolução desenvolveram-se várias estratégias adaptativas para suportá-lo, como o sistema de trocas gasosas mais eficiente entre os mamíferos. Além disso, a morte decorrente da escassez de alimento no inverno parece ter sido uma importante pressão evolutiva para que algumas espécies desenvolvessem especializações em diminuição da taxa metabólica, como hibernação em países de clima frio, ou torpor durante o período de inatividade (SZEWCZAK, 1997).

De fato, a pressão evolutiva tornou a ordem Chiroptera única em diversos aspectos. Um deles, de grande importância, é a ampla diversidade alimentar, que é a mais variada entre todos os mamíferos. Existem espécies insetívoras, frugívoras, nectarívoras, hematófagas, piscívoras, onívoras e carnívoras (PERACCHI *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2007). Para a subordem Megachiroptera, que inclui apenas uma família de morcegos de médio a grande porte, acredita-se que a nectarivoria evoluiu a partir de ancestrais frugívoros (FREEMAN, 1995). Já na subordem Microchiroptera, a maioria das famílias são insetívoras, e a carnivoria, piscivoria e onivoria como hábitos alimentares principais se destacam em poucos casos. Entretanto, a família Phyllostomidae diversificou-se de forma mais ampla, englobando gêneros e espécies frugívoras, nectarívoras e sanguívoras além de insetívoras e carnívoras (HUTSON; MICKLEBURGH; RACEY, 2001; HESTER; MYERS, 2001).

Estudos filogenéticos suportam a hipótese de que na família Phyllostomidae, a frugivoria e a nectarivoria se diversificaram de forma direta a partir da insetivoria, evoluindo paralelamente durante o Mioceno a partir de cinco linhagens, no caso da frugivoria, e três linhagens no caso da nectarivoria. Acredita-se que esta mudança forneceu acesso a recursos abundantes e/ou subexplorados que propiciaram vantagens seletivas e favoreceram o aparecimento de inovações ecológicas de forma independente em diferentes linhagens da família (ROJAS *et al.*, 2011).

Para melhor entendimento a respeito das adaptações que colaboram para suportar diferentes hábitos alimentares, é importante que sejam identificadas as singularidades nutricionais entre as dietas que serão abordadas neste trabalho, sendo elas a frugivoria, insetivoria e nectarivoria. A análise dos componentes nutricionais de 13 tipos de frutas consumidas por três espécies diferentes de morcegos frugívoros revelou que o principal macronutriente presente foram os carboidratos, representando 45%, enquanto lipídeos e proteínas representaram 19,7% e 4,3%, respectivamente (média das 13 espécies) (BATISTA *et al.*, 2016). Com relação ao néctar de flores, sabe-se que no geral, é pobre em aminoácidos, e que a concentração de açúcares pode chegar a 70% do peso total da solução (w/w) (NICOLSON; NEPI; PACINI, 2007; DRESS *et al.*, 1997). A proporção de açúcares nestes alimentos, obtida por meio da análise de frutos de 27 espécies consumidas por Microquirópteros (BAKER *et al.*, 1998), revelou que a glicose é o monossacarídeo predominante (47,3%) seguida pela frutose (44,2%) e pela sacarose (8,4%) (um dissacarídeo nesse caso) (média das 27 espécies). Neste mesmo estudo, a proporção de açúcares do néctar de 36 espécies de flores visitadas por Microquirópteros apontou que o monossacarídeo predominante é a frutose (42,7%), seguida da glicose (40,5%) e do dissacarídeo sacarose (16,4%) (média das 36 espécies) (BAKER *et al.*, 1998). Portanto, pode-se afirmar, que dentro de certos limites, dietas predominantemente frugívoras ou nectarívoras são ricas em açúcares e pobres em proteínas.

O contexto inverso ocorre com as dietas insetívoras. Em um trabalho em que se analisou o conteúdo nutricional de 236 espécies de inseto (com dados separados por espécie e média nutricional por ordem) foi revelado que em três ordens de insetos que são amplamente consumidas por morcegos, os principais macronutrientes são as proteínas e os lipídios (RUMPOLD; SCHLÜTER, 2013). Na ordem Coleoptera, que é representada principalmente pelos besouros, a distribuição dos macronutrientes foi de 40,6% para proteínas, 22,9% para lipídios e 4,5% para carboidratos. Para a ordem Diptera, que representa grande parte dos insetos voadores como moscas e mosquitos, a média dos macronutrientes foi de 49,4% de proteína, 22,7% de lipídios e 6% de carboidratos. Para a ordem Lepidoptera, conhecida popularmente como a ordem das borboletas e mariposas, o conteúdo de macronutrientes foi de 45,3% para proteínas, 27,6% para lipídios e 18% para carboidratos. Neste caso, é possível afirmar que dietas insetívoras são predominantemente ricas em proteínas e pobres em carboidratos.

O fato de existirem diferenças tão marcantes no perfil nutricional destas dietas pode remeter também a diferenças marcantes em atributos adaptativos. Os estudos descrevendo adaptações que auxiliam estes mamíferos a lidar com as demandas impostas por suas dietas são diversos, e podem envolver características comportamentais, anatômicas, metabólicas e

moleculares (GONZALEZ-TERRAZAS *et al.*, 2016; GLASS, 1970; REIS *et al.*, 2007; VOIGT; SPEAKMAN, 2007; SHEN *et al.*, 2012).

Quando falamos de adaptações comportamentais, é sabido que morcegos nectarívoros (ex., *L. yerbabuena*) ajustam seu comportamento de voo e ecolocalização de forma dependente do tipo de alvo (flor) a ser forrageado (GONZALEZ-TERRAZAS *et al.*, 2016). Sob o ponto de vista anatômico, além de outras adaptações, sabe-se que morcegos frugívoros possuem molares achatados que os permitem esmagar frutas, enquanto insetívoros possuem molares pontiagudos, o que colabora para a quebra da barreira de quitina dos insetos. Já os morcegos nectarívoros, possuem dentes diminutos e em menor quantidade, ao mesmo tempo que possuem focinhos alongados e língua bastante comprida, o que permite uma coleta eficiente do néctar (GLASS, 1970; REIS *et al.*, 2007).

Do ponto de vista metabólico, sabe-se que microquirópteros nectarívoros da espécie *Glossophaga soricina* utilizam carboidratos recém ingeridos para prover cerca de 78% da energia necessária durante o voo, e que até mesmo macroquirópteros frugívoros, consideravelmente maiores como *Rousettus aegyptiacus*, também fazem uso desta mesma estratégia, de forma comparável à beija-flores que possuem 5 gramas de massa corpórea (VOIGT; SPEAKMAN, 2007; WELCH; HERRERA; SUAREZ, 2008; AMITAI *et al.*, 2010). Além disso, sabe-se também que em *R. aegyptiacus* a absorção de glicose no intestino é facilitada pela eficiência do transporte paracelular (KEEGAN, 1984; TRACY *et al.*, 2007). Outros estudos demonstram que combinada à alta absorção paracelular, os morcegos frugívoros possuem a superfície absorptiva intestinal com características diferenciadas, como epitélio unicamente elaborado e microvilos 18 vezes maiores que em ratos (MAKANYA *et al.*, 1997). A nível molecular, Shen e colaboradores (2012) demonstraram que megaquirópteros frugívoros possuem alterações no gene *Slc2a4* que codifica o transportador de glicose 4 (GLUT-4), facilitando seu ancoramento na membrana celular, o que não foi encontrado nas espécies de microquirópteros frugívoros analisadas.

Entretanto, isto não significa que não haja adaptações moleculares relacionadas à evolução dos hábitos alimentares em microquirópteros. Em estudo de Gutiérrez-Guerrero (2020) onde foram realizadas análises genômicas comparativas entre morcegos frugívoros, nectarívoros e insetívoros da família Phyllostomidae, foram encontrados diversos genes com alterações relacionadas ao tipo de dieta, como genes da regulação do metabolismo lipídico e do glicogênio, secreção de insulina, controle das vias da glicólise, gliconeogênese, entre outros (GUTIÉRREZ-GUERRERO, 2020).

A partir destes estudos, pode-se assumir que morcegos com diferentes hábitos alimentares possuem alterações singulares que contribuem para as necessidades específicas de cada dieta, o que nos leva a presumir que também haja alterações na composição do aparato metabólico destes animais como por exemplo, no pâncreas endócrino, permitindo acomodar diferenças na demanda hormonal decorrentes do padrão alimentar.

O pâncreas endócrino está composto pelas células beta (β), alfa (α), delta (δ) e PP e é responsável por regular a homeostase glicêmica no organismo, mantendo os níveis de glicose dentro da faixa necessária para a manutenção do metabolismo energético durante o estado alimentado, e de jejum (HALL; HALL, 2021; GENUTH, 2006). Em termos genéricos, a elevação da secreção de insulina e diminuição na secreção de glucagon é essencial durante o contexto prandial (RASK-MADSEN; KAHN, 2012). De forma contrarregulatória, em situações de jejum, a secreção plasmática de glucagon se torna fundamental para a manutenção da glicemia (RAMNANAN, et al., 2011).

É amplamente conhecido que a distribuição e o perfil celular das ilhotas pancreáticas difere entre as espécies, variando em forma, tamanho, proporção e disposição das células. Esta ampla variação, denota a grande plasticidade deste micro-órgão, tanto em resposta a estados metabólicos alterados, quanto em adaptações evolutivas induzidas por diferentes condições fisiológicas (STEINER *et al.*, 2010).

Em humanos e roedores, as ilhotas de Langerhans compõe cerca de 1 a 2% do órgão, sendo o restante composto por tecido exócrino (BRISSOVA; POWERS, 2008). A proporção das células, no entanto é ligeiramente diferente entre estas espécies, sendo composta em humanos por cerca de 50% de células- β , 40% de células- α , 10% de células- δ e poucas células PP, enquanto em roedores, a proporção fica em torno de 60 a 80% de células- β , 15 a 20 % de células- α , até 10% de células- δ e menos de 1% de células PP (STEINER *et al.*, 2010). É importante ressaltar que embora a ideia mais lógica nos leve a acreditar que em condição hígida a quantidade de células- β deva ser sempre maior, esta condição não é regra entre todos os animais na natureza. Existem marsupiais por exemplo, com ilhotas compostas por 70% de células- α e apenas 8% de células- β , e aves com predominância de células- δ (WHITE; HARROP, 1975; KIM *et al.*, 2009). Quando se trata do arranjo das células, ratos por exemplo, possuem células- β predominantemente na área central da ilhota, com as células- α e δ ocupando a periferia, formando um “manto” (ORCI; UNGER, 1975; SUJATHA; PULIMOOD; GUNASEKARAN, 2004), enquanto em humanos as células- α não ficam na periferia e sim dispersas ao longo da ilhota (KIM *et al.*, 2009).

Quando nos remetemos a histoarquitetura das ilhotas pancreáticas de morcegos, a literatura já apresenta alguns relatos (MICHELMORE; KEEGAN; KRAMER, 1998; PROTZEK *et al.*, 2010; MACHADO-SANTOS *et al.*, 2017 e 2013; FREITAS *et al.*, 2013). Descrições a respeito da espécie frugívora *Rousettus aegyptiacus*, demonstram que o pâncreas endócrino representa 9,1% do tecido pancreático, valor este que está bem acima da média conhecida para humanos e roedores. Quanto à proporção celular, as células- β representaram a maior proporção com 51,4% da composição das ilhotas, enquanto as células- α compuseram 30,6% da ilhota (MICHELMORE; KEEGAN; KRAMER, 1998). Não há dados morfométricos para *Artibeus lituratus* (frugívoro), mas sabe-se que as células- β podem estar distribuídas mais periféricamente (PROTZEK *et al.*, 2010). Já em morcegos insetívoros da espécie *Pteronotus personatus* e nectarívoros *Anoura geoffroyi* a massa relativa de ilhotas variou entre 3,4% e 6,1%, com um perfil celular predominante de células- β de aproximadamente 35,5% e 55%, e de células- α de cerca de 25,8% e 33,1% respectivamente (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2017). A respeito de morcegos hematófagos, são encontrados relatos nas espécies *Desmodus rotundus* (FREITAS *et al.*, 2013) e *Diphylla ecaudata* (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2013) onde foi observado massa relativa de ilhotas variando entre 1,5% e 4,1% com proporção de células- β por ilhota entre 33,8% e 54,8% e de células- α de 16,2% (dados disponíveis apenas para *D. ecaudata*).

Os dados acima relatados constituem os principais achados na literatura a respeito das diferenças morfológicas e morfométricas das ilhotas pancreáticas de morcegos. É importante entender, que em sua maioria os estudos produzidos são descrições isoladas de uma única espécie ou comparativas entre poucas espécies, o que pode trazer vieses quando estes dados são interpretados em conjunto. A descrição isolada do pâncreas endócrino de morcegos é ainda a forma de análise mais encontrada dada a dificuldade de obtenção destes animais na natureza, assim como sua difícil manutenção após a captura. Independente deste contexto, é necessário compreender que quando feitos de forma isolada, estes estudos trazem diferentes variáveis, o que torna a comparação dos dados difícil de ser realizada.

Além disso, salienta-se que até então a literatura não apresenta estudos que avaliem a citoarquitetura e proporção de células- α das ilhotas de morcegos abordando cinco espécies, sendo duas espécies pertencentes aos mesmos nichos alimentares. Portanto, neste trabalho, abordaremos uma descrição comparativa da morfofisiologia do pâncreas endócrino de microquirópteros frugívoros *Artibeus lituratus* e *Carollia perspicillata*, insetívoros *Molossus molossus* e *Myotis nigricans*, e nectarívoro *Glossophaga soricina*, ressaltando que esta é a

primeira descrição das ilhotas de *C. perspicillata*, *M. nigricans* e *G. soricina*. As principais características das espécies analisadas podem ser evidenciadas na **Tabela 1** e **Figura 1**.

Tabela 1. Sumarização das principais características das espécies utilizadas.

Espécie	Família	Peso	Envergadura	Hábito Alimentar	Preferências alimentares
<i>Artibeus lituratus</i>	Phyllostomidae	44-87 g	~30 cm	Frugívoro	Frutos dos gêneros <i>Solanum</i> , <i>Cecropia</i> e <i>Ficus</i>
<i>Carollia perspicillata</i>	Phyllostomidae	~18,5 g	~25 cm	Frugívoro	Frutos da família Piperaceae
<i>Molossus molossus</i>	Molossidae	~13 g	~28 cm	Insetívoro	Insetos das ordens Coleoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Odonata, Hymenoptera
<i>Myotis nigricans</i>	Vespertilionidae	~4 g	~21 cm	Insetívoro	Insetos das ordens Ephemeroptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera
<i>Glossophaga soricina</i>	Phyllostomidae	7-17 g	~25 cm	Nectarívoro	Variedade de flores, como por exemplo das famílias Bombacaceae e Cactaceae

Referências: (GARDNER, 2007, ZORTÉA; MENDES, 1993; ZORTÉA; CHIARELLO, 1994; CLOUTIER; THOMAS, 1992; ORTÊNCIO-FILHO; LIMA; FOGAÇA, 2007; FLEMING, 1988; FABIAN; GREGORIN, 2007; PERACCHI *et al.*, 2006; CARRERA *et al.*, 2010; NOWAK, 1994; BREDT; CAETANO-JÚNIOR, 2001; WILSON, 1973; FENTON *et al.*, 1998; FALCÃO; REBELO; TALAMONI, 2003; MYERS, 1977; BIANCONI; PEDRO, 2007; GRIFFITHS; NOGUEIRA; DIAS; PERACCHI, 2007; LEMKE, 1984; FREEMAN, 1995; PERACCHI; ALBUQUERQUE, 1971; WEBSTER, 1993; RODRÍGUEZ-PEÑA *et al.*, 2007; NYFFELER; KNÖRNSCHILD, 2013; BEGUELINI *et al.*, 2015).

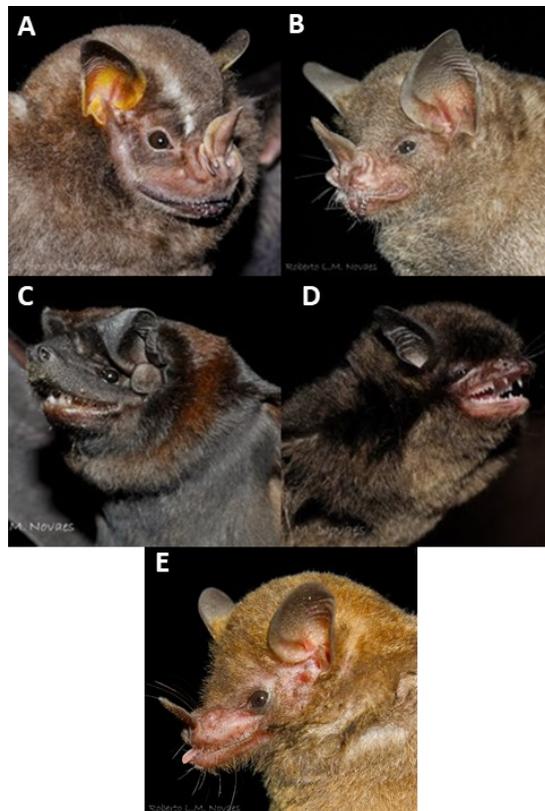


Figura 1. Espécies utilizadas: (A) *Artibeus lituratus* – frugívoro. (B) *Carollia perspicillata* – frugívoro. (C) *Molossus molossus* – insetívoro. (D) *Myotis nigricans* – insetívoro. (E) *Glossophaga soricina* – nectarívoro.
(Foto por Roberto L. M. Novaes, 2021).

De acordo com o referencial teórico abordado, é possível assumir que a grande variedade alimentar entre espécies de morcegos oferece uma oportunidade única para investigar a influência da dieta nas características morfofisiológicas das ilhotas pancreáticas, e que estudos contendo um grande número de espécies e mais de uma espécie por nicho alimentar são um contexto inexplorado. As adaptações já descobertas em morcegos de diferentes classes alimentares nos levam a crer que estas se estendam a outros mecanismos envolvidos na alimentação, podendo exigir destes animais um aparato endócrino que seja requisitado de formas diferentes. Sendo assim, buscamos descrever, de forma comparativa, o padrão morfológico e morfométrico de ilhotas pancreáticas entre morcegos frugívoros, insetívoros e nectarívoros, e nossa hipótese é de que animais frugívoros/nectarívoros requerem aparato endócrino com maior celularidade e/ou densidade de ilhotas em detrimento dos insetívoros. Novamente destacamos, que é inédita a análise comparativa de ilhotas entre cinco espécies de morcegos, assim como a comparação entre duas espécies diferentes de frugívoros e insetívoros.

2 – Objetivo

Descrever parâmetros morfológicos e morfométricos do pâncreas endócrino entre cinco espécies de morcegos incluindo frugívoros, insetívoros e nectarívoros.

2.1 – Objetivos específicos

- ❖ Descrever e comparar características morfométricas como a área, perímetro, raio, diâmetro mínimo, máximo, médio, densidade, massa relativa e esfericidade das ilhotas de *A. lituratus*, *C. perspicillata*, *M. molossus*, *M. nigricans* e *G. soricina*, além de apresentar a distribuição destas ilhotas por tamanho;
- ❖ Descrever e comparar se possíveis diferenças encontradas se dão por maior celularidade ou densidade de ilhotas;
- ❖ Descrever e comparar a proporção de células- α , assim como sua distribuição ao longo das ilhotas de *A. lituratus*, *C. perspicillata*, *M. molossus*, *M. nigricans* e *G. soricina*.

3 – Materiais e Métodos

3.1 – Autorizações e coleta dos animais

Os animais foram coletados por equipe especializada da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) em projeto autorizado e homologado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da mesma, sob o protocolo nº 017/09 (**Anexo 1**) e seguindo o Marco Regulatório com base na lei 11.794 de 8 de outubro de 2008 e no Decreto

6.899 de 15 de julho de 2009, assim como as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). A coleta dos animais também contou com autorização do Ministério do Meio Ambiente por meio do Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por meio do nº de identificação 21707-1.

As capturas ocorreram entre os anos de 2010 e 2013 e os locais de coleta foram nos arredores da cidade de São José do Rio Preto no estado de São Paulo, com exceção de dois exemplares da espécie *Myotis nigricans* e um exemplar da espécie *Molossus molossus* que foram coletados na cidade de Uchoa, no mesmo estado (Coordenadas: São José do Rio Preto – SP – 20°52'2"S 49°20'6"W / 20°50'25"S 49°24'24"W / 20°47'12"S 49°21'37"W / 20°46'43"S 49°21'19"W / 20°43'5"S 49°20'52"W. Uchoa – SP – 20°57'39"S 49°13'36"W). Foram considerados para coleta animais machos e fêmeas não prenhes. No caso do grupo *A. lituratus*, uma fêmea prenhe foi coletada, porém não foi retirada da análise pelo fato de se tratar de terço inicial da gestação, o que não alterou os resultados de forma a diferir da faixa de valores encontrados para os demais animais do grupo.

3.2 – Material utilizado

Após realizada a eutanásia dos animais por anestesia profunda (cetamina/xilazina – 370/16 mg/kg, respectivamente), amostras de pâncreas foram coletadas e fixadas em Methacarn (60% metanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético glacial), emblocadas em parafina e doadas para o Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas (LIDoC) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde permaneceram armazenadas até sua utilização no presente estudo. O “n” experimental utilizado foi: *Artibeus lituratus* (n=8; peso médio 67,7±3,8g), *Carollia perspicillata* (n=4; peso médio 17,1±1,1g), *Molossus molossus* (n=8; peso médio 10,9±2,0g), *Myotis nigricans* (n=5; peso médio 3,9±0,1g) e *Glossophaga soricina* (n=4; peso médio 9,6±0,4g). Observação: não houve a pesagem do fragmento pancreático.

3.3 – Microtomia

Os blocos de parafina contendo amostras pancreáticas das cinco espécies de interesse foram seccionados em micrótomo rotativo manual, e os cortes aderidos a lâminas histológicas comuns e silanizadas. Todo o tecido foi seccionado de forma consecutiva e intervalada, obtendo-se de três a quatro intervalos seccionais por bloco. Em cada intervalo seccional, foram coletados 2 cortes para posterior processamento em Hematoxilina/Eosina e Tricrômico de Gömori, além de dois cortes para processamento em imuno-histoquímica, e cortes extras para testes de coloração.

A espessura de cada corte foi fixada em 5 μm e o espaçamento mínimo entre cada intervalo seccional foi definido previamente de acordo com dados de diâmetro de ilhotas disponíveis em literatura para cada espécie. Quando não disponíveis essas informações, o espaçamento foi definido com base em outras espécies com hábito alimentar semelhante. Sendo assim, os intervalos seccionais mínimos utilizados foram: *Artibeus lituratus* – 90 μm ; *Carollia perspicillata* – 90 μm ; *Molossus molossus* – 50 μm ; *Myotis nigricans* – 50 μm ; *Glossophaga soricina* – 90 μm . Este espaçamento mínimo pré-definido foi realizado com o intuito de evitar a obtenção de cortes com sobreposição da mesma ilhota pancreática. Em um bloco de *M. molossus* e um bloco de *M. nigricans* o padrão de intervalo seccional não foi possível de ser feito por conta do tamanho da amostra, sendo realizados nestes cortes consecutivos sem espaçamento, e analisando-se apenas um intervalo seccional. Um total de 29 blocos foram seccionados. Para cada bloco, cerca de 14 a 18 lâminas foram produzidas.

3.4 – Colorações e digitalização

Dois lâminas seriadas de três intervalos seccionais consecutivos foram processadas para posterior análise morfológica, sendo coradas pelos métodos de Hematoxilina/Eosina e Tricrômico de Gömori Azul (RAFACHO *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2019) e posteriormente digitalizadas em escâner Olympus BX61VS (Olympus Corp., Tóquio, Japão).

3.5 – Imunohistoquímica

Uma estimativa da distribuição de células- α foi realizada utilizando o método de imunoperoxidase indireta (RAFACHO *et al.*, 2008). Para tal, secções pancreáticas previamente coletadas em lâminas silanizadas foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de álcoois. Após, a recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato de sódio (10 mM, pH 6,0), seguido da permeabilização das membranas em solução PBS a 0,2% de Triton-100 por 20 minutos e bloqueio em solução PBST a 3% de albumina por 1h. Na incubação seguinte foi utilizado anticorpo primário anti-glucagon na diluição 1:250 por 3h, em câmara úmida e temperatura ambiente (sc-7779R, Santa Cruz Biotechnology[®], Santa Cruz, CA, EUA). Foi realizado então o bloqueio da atividade da peroxidase endógena com solução PBS a 0,3% de peróxido de hidrogênio por 20 minutos, seguido da incubação com anticorpo secundário na diluição 1:100 por 1 h (sc-2491, Santa Cruz Biotechnology[®]). Os cortes foram então tratados com complexo Avidina-Biotina (Santa Cruz Biotechnology[®]) e a marcação detectada por meio de solução de diaminobenzidina 0,02% (DAB) em PBS. Por fim, as lâminas

foram rapidamente coradas em hematoxilina, desidratadas e montadas para visualização microscópica e posterior aquisição de fotografias para análises morfométricas.

3.6 – Análises morfométricas

3.6.1 – Área, perímetro, diâmetro e raio de ilhotas

As imagens digitalizadas foram analisadas no software OlyVIA versão 3.4.1 (Olympus Corp., Tóquio, Japão). A área total de tecido pancreático (em μm^2) foi mensurada sempre incluindo apenas o tecido de interesse e excluindo-se campos onde houvesse tecido adiposo, linfático, hemácias e paredes de vasos. Com relação às ilhotas, os seguintes dados foram coletados (em μm^2 ou μm): área total, perímetro, diâmetro mínimo, máximo e médio e raio médio. Detalhes da quantificação da área total podem ser vistos na imagem abaixo (**Figura 2**).

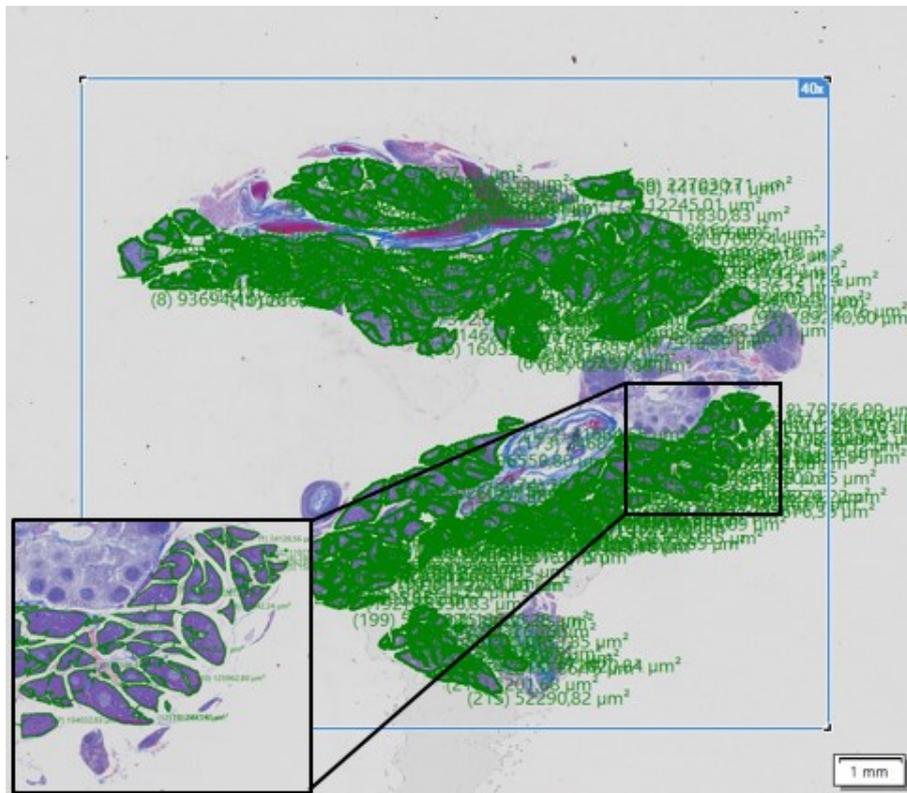


Figura 2. Quantificação de área total de tecido pancreático: Toda a extensão de tecido pancreático foi quantificada, totalizando cerca de 100 a 250 campos analisados por bloco. O mesmo procedimento foi realizado com as ilhotas uma a uma. Por exemplo, para a espécie *Artibeus lituratus*, cerca de 100 a 250 ilhotas foram encontradas em cada lâmina.

3.6.2 – Massa relativa, densidade e esfericidade de ilhotas

A massa relativa de pâncreas endócrino foi obtida somando-se a área de ilhotas, dividindo-se pela área total de tecido pancreático e multiplicando-se por 100, sendo o resultado expresso em porcentagem de pâncreas endócrino por tecido pancreático (GOMES *et al.*, 2019).

Para a densidade de ilhotas, fixamos uma área de 100.000 μm^2 para a análise. Para o cálculo, utilizou-se a seguinte fórmula: $(100.000 \times \text{n}^\circ \text{ total de ilhotas} / \text{área total})$. O resultado foi expresso em n° de ilhotas/100.000 μm^2 .

O grau de esfericidade também foi calculado para cada uma das ilhotas avaliadas. Para tanto, foram utilizados os valores individuais de área e perímetro de ilhota aplicados na seguinte fórmula: $[4\pi \cdot \text{área} / (\text{perímetro})^2]$. Para aquelas consideradas como círculos perfeitos, o valor obtido é ≥ 1 e para aquelas que não são consideradas círculos perfeitos o valor obtido é < 1 (RAFACHO *et al.*, 2008).

3.6.3 – Distribuição das ilhotas por tamanho (histograma)

A estratificação de cada ilhota por tamanho foi realizada de acordo com valores pré-definidos nas seguintes faixas: $< 1.000 \mu\text{m}^2$, de 1.000 a 1.999 μm^2 , de 2.000 a 2.999 μm^2 , de 3.000 a 3.999 μm^2 , de 4.000 a 4.999 μm^2 e $> 5.000 \mu\text{m}^2$ (KIM *et al.*, 2009). Todos os parâmetros foram quantificados para cada lâmina (3 lâminas, uma de cada intervalo seccional), e para todas as análises foram consideradas como ilhotas todas as estruturas endócrinas com mais de quatro células.

3.6.4 – Distribuição e estimativa da proporção de células- α

Para a determinação da distribuição e proporção (%) de células- α por ilhota foi utilizado o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA) em ao menos 2 secções (uma secção = 1 animal) e 25 ilhotas por espécie. A área total de cada ilhota foi quantificada, assim como a somatória das áreas correspondentes às marcações positivas para glucagon, e a proporção foi obtida multiplicando-se a área de células- α por 100 e dividindo-se pela área total da ilhota.

3.7 – Análise estatística

A simetria dos dados foi avaliada pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro Wilks. Quando cumprida a normalidade, os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, e quando não-normais, foram apresentados como mediana com seus respectivos intervalos interquartílicos. Os dados foram então submetidos a análise de variância 1 via (1-way ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey, quando cumpridas a normalidade e homocedasticidade, e teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn quando assimétricos ou heterocedásticos. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4 – Resultados

4.1 – Morfologia, área média, perímetro e grau de esfericidade de ilhotas

Em todas as espécies foi encontrada a presença de ilhotas pancreáticas. Sob microscopia de luz, foi possível visualizar ácinos serosos constituídos por várias células piramidais e polarizadas, com núcleo esférico e coloração mais densa em um dos polos, assim como ductos intra e interlobulares. As ilhotas pancreáticas foram identificadas como agregados celulares de coloração clara, por diversas vezes dispostas em cordões e ricamente irrigadas por capilares sanguíneos, circundadas por uma fina camada de tecido conjuntivo, que as separam do tecido exócrino restante (**Figura 3A**). Foram observadas ilhotas pequenas e com poucas células aglomeradas em todas as espécies. Entretanto, ilhotas com maior celularidade, contendo extensos cordões celulares foram encontradas apenas nas espécies *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata* e *Glossophaga soricina*. Também foi observado ilhotas com padrão mais disforme nas espécies *Myotis nigricans* e *Glossophaga soricina*, enquanto que em *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata* e *Molossus molossus* estas estruturas possuem forma mais arredondada (**Figura 3A**).

Com relação a **área média das ilhotas**, foram observados valores maiores na espécie frugívora *Artibeus lituratus* ($2.727 \mu\text{m}^2$ [2.478 – 3.194]) em comparação às espécies insetívoras *Molossus molossus* ($1.075 \mu\text{m}^2$ [929– 1.246]) e *Myotis nigricans* ($767 \mu\text{m}^2$ [650 – 916]) ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente). Os valores também foram maiores para a espécie nectarívora *Glossophaga soricina* ($2.745 \mu\text{m}^2$ [2.460 – 4.260]) quando comparados com a espécie insetívora *Myotis nigricans* ($p < 0,01$). Os valores entre *Glossophaga* sp. e *Molossus* sp. aproximaram-se do limiar de significância, porém não o atingiram ($p = 0,06$) (**Figura 3B**).

Para os dados de **perímetro de ilhotas** os valores foram maiores nas espécies *Artibeus lituratus* e *Glossophaga soricina* quando comparados à *Molossus molossus* e *Myotis nigricans*, com valores de mediana de $207 \mu\text{m}$ [192 – 221] para *Artibeus* sp., $209 \mu\text{m}$ [198 – 265] para *Glossophaga* sp. em relação à $127 \mu\text{m}$ [123 – 141] e $125 \mu\text{m}$ [110 - 130] para *Molossus* sp. e *Myotis* sp., respectivamente (*Artibeus* vs *Molossus* e *Myotis* – $p < 0,05$ e $< 0,01$; *Glossophaga* vs *Molossus* e *Myotis* – $p < 0,05$ e $< 0,01$). A mediana de perímetro para *Carollia perspicillata* foi de $172 \mu\text{m}$ [164 – 193], e não foi encontrado diferenças entre este e os demais grupos (**Figura 3C**).

Com relação ao **grau de esfericidade das ilhotas**, os valores foram maiores nos animais do grupo *Artibeus* (0,73 [0,70 – 0,75]) em comparação aos animais dos grupos *Myotis* (0,65 [0,61 – 0,65]) e *Glossophaga* (0,65 [0,63 – 0,66]). Os valores também foram maiores nos animais do grupo *Carollia perspicillata* (0,77 [0,75 – 0,79]) em relação aos animais dos grupos

Myotis e *Glossophaga*. Os valores do grupo *Molossus* (0,72 [0,69 – 0,73]) também foram maiores em comparação aos animais dos grupos *Myotis* e *Glossophaga* (**Figura 3D**).

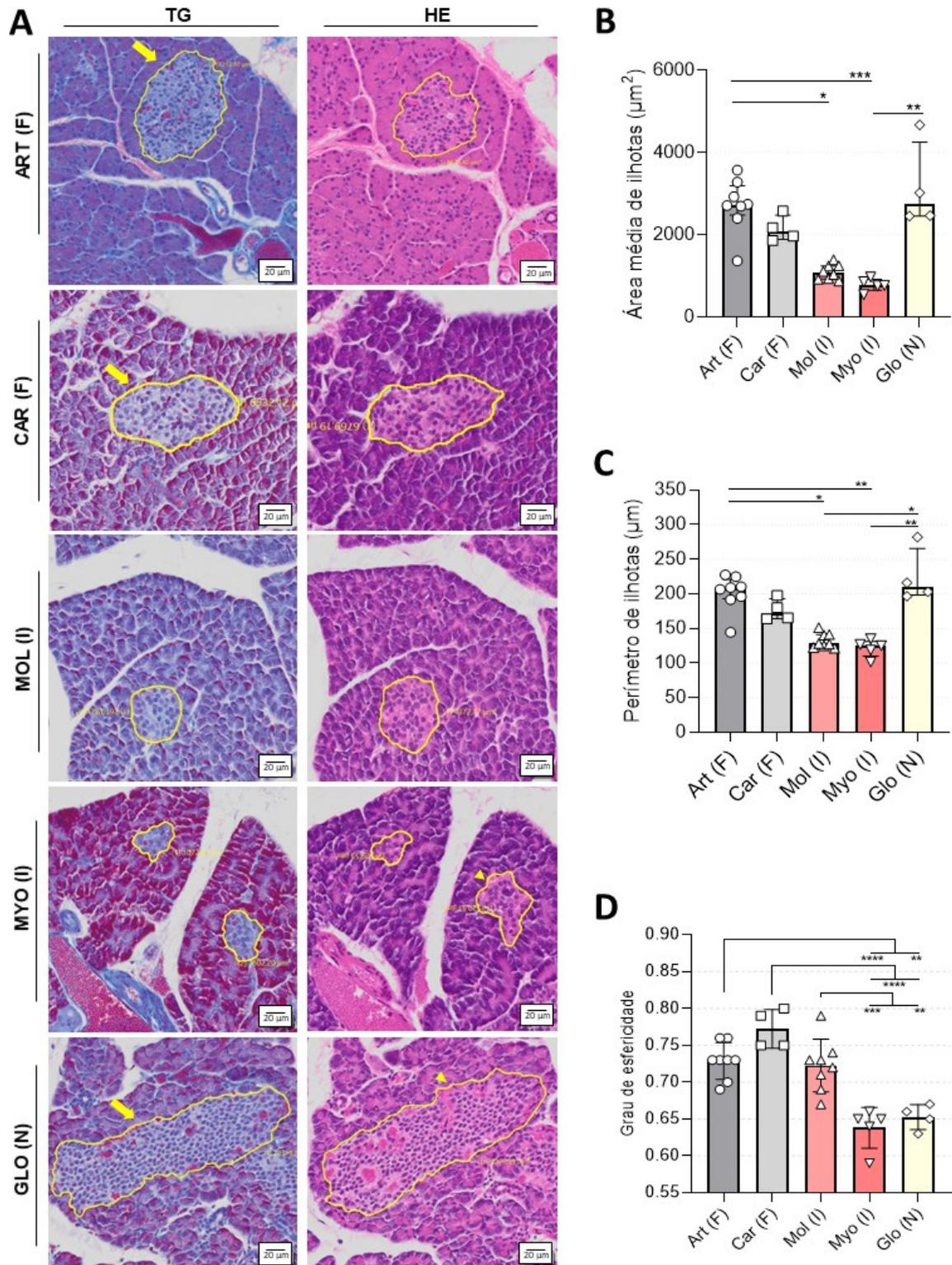


Figura 3. Histologia pancreática, área média, perímetro e grau de esfericidade de ilhotas. (A) Microscopia de luz. Imagens representativas. As ilhotas pancreáticas estão circundadas em amarelo. Embora haja ilhotas pequenas em todas as espécies, ilhotas com maior celularidade como as representadas nas imagens em ART, CAR e GLO não são vistas em MOL e MYO (setas). É possível perceber padrão mais disforme em GLO e MYO (pontas de seta). Coloração Tricrômico de Gömori (TG) à esquerda e Hematoxilina e Eosina (HE) à direita. Escala: 20 µm

= 40x. **(B) Área média de ilhotas.** Valores maiores para o grupo *Artibeus* em comparação à *Molossus* e *Myotis*; valores maiores para o grupo *Glossophaga* em comparação à *Myotis*. **(C) Perímetro de ilhotas.** Valores maiores para o grupo *Artibeus* em relação à *Molossus* e *Myotis*; valores maiores para o grupo *Glossophaga* em relação à *Molossus* e *Myotis*. **(D) Grau de esfericidade de ilhotas.** Valores do grupo *Artibeus* maiores em relação à *Myotis* e *Glossophaga*. Valores do grupo *Carollia* maiores em relação a *Myotis* e *Glossophaga*. Valores do grupo *Molossus* maiores em relação à *Myotis* e *Glossophaga*. Em **B** e **C** valores apresentados como mediana e intervalo interquartilico e análise estatística realizada por meio do teste de Kruskal–Wallis com pós-teste de Dunn. Em **D** valores apresentados como média \pm desvio padrão e análise estatística realizada por meio do teste ANOVA de 1 via com pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. **ART (F):** *Artibeus lituratus* - frugívoro; **CAR (F):** *Carollia perspicillata* - frugívoro; **MOL (I):** *Molossus molossus* – insetívoro; **MYO (I):** *Myotis nigricans* - insetívoro; **GLO (N):** *Glossophaga soricina* – nectarívoro.

4.2 – Diâmetro mínimo, médio, máximo e raio médio de ilhotas

Os resultados referentes à **diâmetro mínimo** apresentaram-se maiores nos morcegos *Artibeus lituratus* com relação a *Molossus molossus* e *Myotis nigricans*, assim como houveram valores maiores no frugívoro *Carollia perspicillata* quando comparado ao insetívoro *Myotis nigricans*. Os valores entre o nectarívoro *Glossophaga soricina* e o insetívoro *Myotis* sp. também foram maiores (*Artibeus* vs *Molossus* e *Myotis* - $p < 0,01$ e $< 0,001$; *Carollia* vs *Myotis* e *Glossophaga* vs *Myotis*: $p < 0,05$).

Com relação ao **diâmetro máximo** os resultados foram maiores nos animais do grupo *Artibeus* e *Glossophaga* em relação aos animais dos grupos *Molossus* e *Myotis* (*Artibeus* vs *Molossus* e *Myotis* - $p < 0,01$; *Glossophaga* vs *Molossus* e *Myotis*: $p < 0,05$). Os resultados para **diâmetro médio** foram maiores nos animais do grupo *Artibeus* em relação aos animais dos grupos *Molossus* e *Myotis*, assim como houveram valores maiores para os animais do grupo *Glossophaga* em relação aos animais do grupo *Myotis* (*Artibeus* vs *Molossus* e *Myotis* - $p < 0,01$ e $< 0,001$; *Glossophaga* vs *Myotis* - $p < 0,05$). Os dados referentes a diâmetro mínimo, máximo e médio estão descritos abaixo na **Tabela 2 e Figura 4 A, B e C**.

Em se tratando do **raio médio das ilhotas**, as medianas foram maiores para a espécie *Artibeus lituratus* (27 μm [25 – 28]), em comparação com os insetívoros *Molossus molossus* (17 μm [16 – 18]) e *Myotis nigricans* (14 μm [13 – 15]) ($p < 0,01$ e $< 0,001$, respectivamente). Os valores também foram maiores na espécie nectarívora *Glossophaga soricina* (25 μm [23 – 32]) em relação à *Myotis* sp ($p < 0,05$). Os valores de raio médio para a espécie *Carollia perspicillata* foram de 23 μm [22 – 26]. Os dados referentes a raio médio estão descritos na **Figura 4D**.

Tabela 2. Diâmetro mínimo, máximo e médio para as cinco espécies de morcego.

Espécie	Diâmetro Mínimo (µm)	Diâmetro Máximo (µm)	Diâmetro Médio (µm)
<i>Artibeus lituratus</i> (F)	43 [41 – 46]	69 [65 – 73]	54 [51 – 57]
<i>Carollia perspicillata</i> (F)	37 [35 – 41]	59 [57 – 66]	46 [45 – 52]
<i>Molossus molossus</i> (I)	28 [25 – 30]	42 [41 – 46]	34 [32 – 37]
<i>Myotis nigricans</i> (I)	20 [18 – 23]	41 [37 – 44]	28 [26 – 31]
<i>Glossophaga soricina</i> (N)	36 [32 – 48]	68 [65 – 84]	50 [46 – 64]

Os valores estão expressos como mediana e intervalos interquartis. As diferenças estatísticas foram indicadas apenas nos dados gráficos. F: frugívoro; I: insetívoro; N: nectarívoro.

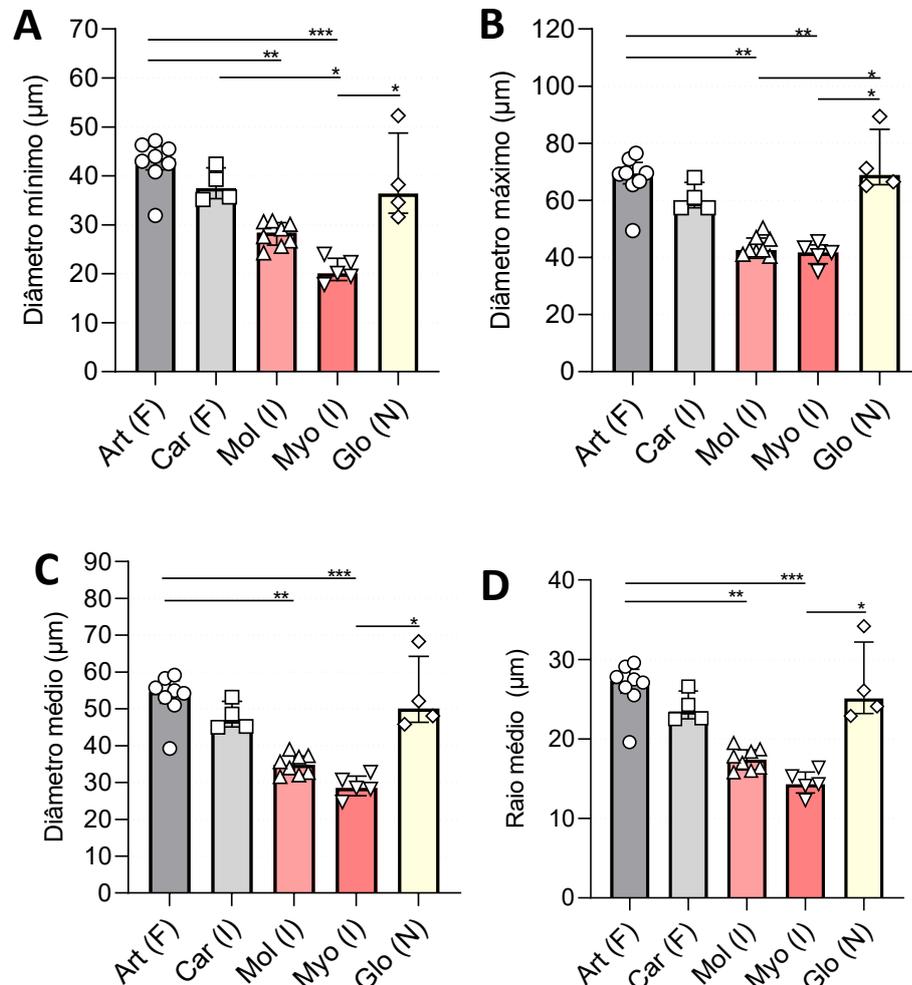


Figura 4. Diâmetro mínimo, máximo, médio e raio médio. (A) Diâmetro mínimo: Valores maiores para o grupo *Artibeus* em relação à *Molossus* e *Myotis*; valores maiores para o grupo *Carollia* com relação à *Myotis*; valores maiores para o grupo *Glossophaga* com relação à *Myotis*. **(B) Diâmetro máximo:** Valores maiores para o grupo *Artibeus* em relação à *Molossus* e *Myotis*; valores maiores para o grupo *Glossophaga* em relação à *Molossus* e *Myotis*. **(C) Diâmetro médio:** Valores maiores para o grupo *Artibeus* com relação à *Molossus* e *Myotis*; valores maiores para o grupo *Glossophaga* com relação à *Myotis*. **(D) Raio médio de ilhotas:** Valores do grupo *Artibeus*

maiores em relação à *Molossus* e *Myotis*. Valores do grupo *Glossophaga* são maiores em relação à *Myotis*. Teste de Kruskal – Wallis e pós-teste de Dunn, valores apresentados como mediana e intervalo interquartilico para todos os gráficos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. **ART (F):** *Artibeus lituratus* - frugívoro; **CAR (F):** *Carollia perspicillata* - frugívoro; **MOL (I):** *Molossus molossus* – insetívoro; **MYO (I):** *Myotis nigricans* - insetívoro; **GLO (N):** *Glossophaga soricina* – nectarívoro.

4.3 – Massa relativa de pâncreas endócrino e densidade de ilhotas

Os resultados referentes à massa relativa de pâncreas endócrino foram maiores na espécie *Artibeus lituratus* (4,0 % [3,8 – 4,2]) quando comparados com os insetívoros *Molossus molossus* (1,3 % [1,0 – 1,6]) e *Myotis nigricans* (1,2 % [0,9 – 1,3]) ($p < 0,01$ para ambas as comparações) (**Figura 5A**). Os valores referentes à espécie nectarívora *Glossophaga soricina* (5,1 % [3,5 – 6,1]) também foram maiores em relação aos morcegos insetívoros (**Figura 5A**). O resultado de massa relativa de pâncreas endócrino para o frugívoro *Carollia perspicillata* foi de 2,5 % [2,4 – 3,0], e embora os valores sejam maiores que os apresentados pelos morcegos insetívoros, não houve diferença estatística entre eles.

Os dados de densidade de ilhotas foram realizados considerando-se uma área fraccional de $100.000 \mu\text{m}^2$. As medianas foram: 1,5 ilhotas / $100.000 \mu\text{m}^2$ [1,3 – 1,7] para *Artibeus lituratus*, 1,2 ilhotas / $100.000 \mu\text{m}^2$ [1,1 – 1,3] para *Carollia perspicillata*, 1,1 ilhotas / $100.000 \mu\text{m}^2$ [1,0 – 1,4] para *Molossus molossus*, 1,4 ilhotas / $100.000 \mu\text{m}^2$ [1,1 – 1,8] para *Myotis nigricans* e 1,7 ilhotas / $100.000 \mu\text{m}^2$ [1,4 – 1,9] para *Glossophaga soricina*. Não houveram diferenças estatísticas entre os grupos para estes dados (**Figuras 5B e 6**).

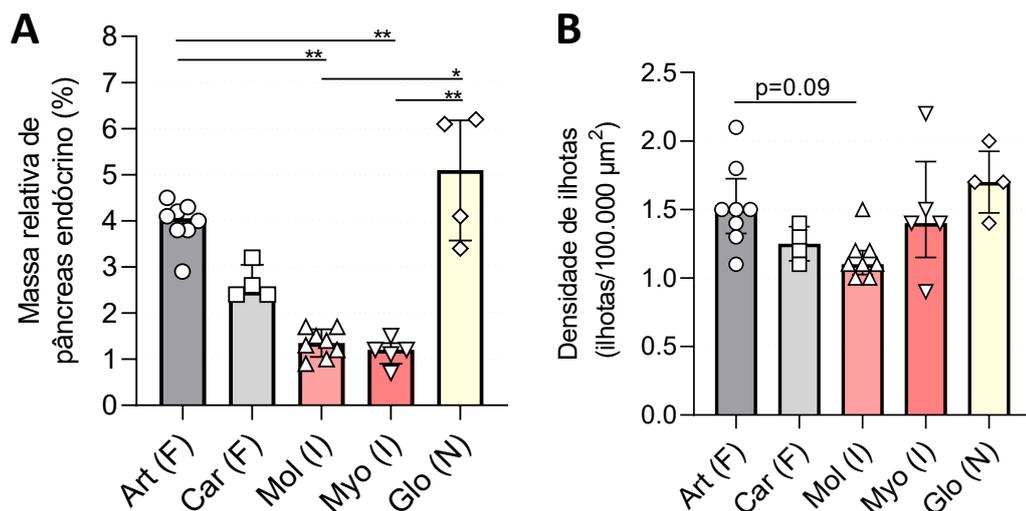


Figura 5. Massa relativa de pâncreas endócrino e densidade de ilhotas. (A) Massa relativa de pâncreas endócrino: Valores do grupo *Artibeus* maiores em comparação à *Molossus* e *Myotis*. Valores do grupo *Glossophaga* maiores em comparação à *Molossus* e *Myotis*. **(B) Densidade de ilhotas:** Não houve diferença estatística entre os grupos. Teste de Kruskal – Wallis com pós-teste de Dunn, valores expressos como mediana e intervalos interquartilicos para ambos os gráficos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. **ART (F):** *Artibeus lituratus* - frugívoro; **CAR (F):** *Carollia perspicillata* - frugívoro; **MOL (I):** *Molossus molossus* – insetívoro; **MYO (I):** *Myotis nigricans* - insetívoro; **GLO (N):** *Glossophaga soricina* – nectarívoro.

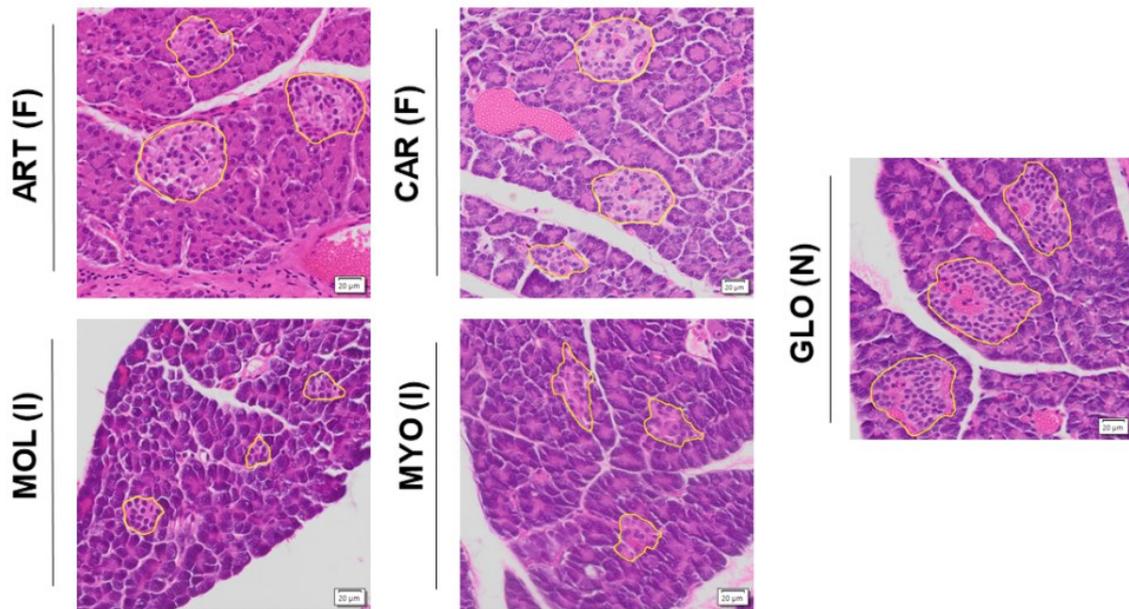


Figura 6. Representação da densidade de ilhotas: As ilhotas pancreáticas estão circundadas em amarelo. É possível perceber densidade parecida entre as espécies, com diferenças no tamanho das ilhotas. Coloração Hematoxilina e Eosina. Escala: 20 μm = 40x. **ART (F):** *Artibeus lituratus* - frugívoro; **CAR (F):** *Carollia perspicillata* - frugívoro; **MOL (I):** *Molossus molossus* – insetívoro; **MYO (I):** *Myotis nigricans* - insetívoro; **GLO (N):** *Glossophaga soricina* – nectarívoro.

4.4 – Distribuição das ilhotas por tamanho (histograma)

A distribuição das ilhotas foi analisada por meio de um histograma a fim de ilustrar as diferenças entre as espécies. Como pode ser observado na **Figura 7**, prevaleceram ilhotas de tamanhos (área) menores em todas as espécies. A faixa de tamanho com a maior frequência para as ilhotas dos frugívoros *Artibeus lituratus* e *Carollia perspicillata* foi a de 1.000 a 1.999 μm^2 , com medianas de 29% [32 – 26] e 34% [37 – 30], respectivamente. Para as espécies insetívoras *Molossus molossus* e *Myotis nigricans*, a maior frequência de tamanho encontrada foi <1.000 μm^2 , com medianas de 55% [64 – 48] e 77.4 % [84 – 66], respectivamente. Para a espécie *Glossophaga soricina* a faixa de tamanho mais prevalente também foi <1.000 μm^2 (36% [44 – 21]). Nos morcegos insetívoros prevaleceu a distribuição de ilhotas menores (<1.000 μm^2), com menor frequência de distribuição de ilhotas na medida em que se aumentou a faixa de tamanho. Não foram encontrados valores relevantes para ilhotas maiores que 4.000 μm^2 nos grupos *Myotis* e *Molossus*.

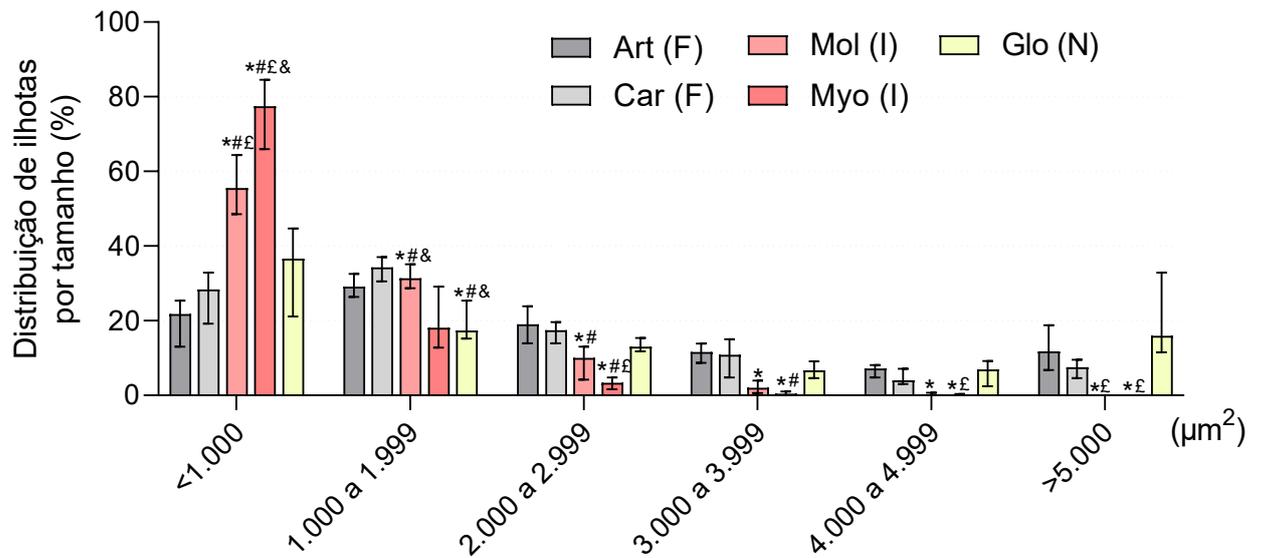


Figura 7. Distribuição de ilhotas por tamanho. Foram consideradas para a análise qualquer agrupamento de tecido endócrino com mais de quatro células. **Simbologia:** * - Diferente de Art (F); # - Diferente de Car (F); & - Diferente de Mol (I); £ - Diferente de Glo (N). Valores apresentados como mediana e intervalo interquartilico. Estatística realizada por meio de análise de variância de 1 via (ANOVA) com pós teste de Tukey para dados normais e homogêneos e teste de Kruskal – Wallis com pós teste de Dunn para dados não normais ou heterogêneos. **<1.000 µm²:** *M. molossus* vs. *A. lituratus*; *M. nigricans* vs. *A. lituratus*; *M. nigricans* vs. *C. perspicillata*; *G. soricina* vs. *M. nigricans*: $p < 0,0001$. *M. molossus* vs. *C. perspicillata*: $p < 0,001$. *M. nigricans* vs. *M. molossus*; *G. soricina* vs. *M. molossus*: $p < 0,05$. **1.000 – 1.999 µm²:** *M. nigricans* vs. *A. lituratus*; *G. soricina* vs. *A. lituratus*: $p < 0,05$. *M. nigricans* vs. *C. perspicillata*; *G. soricina* vs. *C. perspicillata*; *M. nigricans* vs. *M. molossus*; *G. soricina* vs. *M. molossus*: $p < 0,01$. **2.000 – 2.999 µm²:** *M. nigricans* vs. *A. lituratus*: $p < 0,0001$. *M. molossus* vs. *A. lituratus*; *M. nigricans* vs. *C. perspicillata*: $p < 0,001$. *G. soricina* vs. *M. nigricans*: $p < 0,01$. *M. molossus* vs. *C. perspicillata*: $p < 0,05$. **3.000 – 3.999 µm²:** *M. nigricans* vs. *A. lituratus*: $p < 0,01$. *M. molossus* vs. *A. lituratus*; *M. nigricans* vs. *C. perspicillata*: $p < 0,05$. **4.000 – 4.999 µm²:** *M. molossus* vs. *A. lituratus*; *M. nigricans* vs. *A. lituratus*: $p < 0,01$. *G. soricina* vs. *M. nigricans*: $p < 0,05$. **>5.000 µm²:** *M. molossus* vs. *A. lituratus*; *G. soricina* vs. *M. molossus*; *G. soricina* vs. *M. nigricans*: $p < 0,01$. *M. nigricans* vs. *A. lituratus*: $p < 0,05$. **ART (F):** *Artibeus lituratus* - frugívoro; **CAR (F):** *Carollia perspicillata* - frugívoro; **MOL (I):** *Molossus molossus* – insetívoro; **MYO (I):** *Myotis nigricans* - insetívoro; **GLO (N):** *Glossophaga soricina* – nectarívoro.

4.5 – Distribuição e estimativa da proporção de células- α

Pela análise morfológica foi observado que no frugívoro *Artibeus lituratus* e no insetívoro *Myotis nigricans* as células- α se distribuem de forma mais dispersa nas ilhotas. Já no nectarívoro *Glossophaga soricina* e frugívoro *Carollia perspicillata*, as células- α por vezes estão distribuídas no centro das ilhotas, mas preferencialmente na periferia destas. No insetívoro *Molossus molossus* as células- α também se distribuem mais na periferia da ilhota, porém é muito comum estarem situadas de forma polarizada, ou seja, em uma das margens da ilhota (formando um manto incompleto) (**Figura 8A-E**). Quanto à proporção de células- α por ilhota os valores encontrados foram maiores para *Molossus molossus* (28,9% [22,5 – 33,6]) quando comparados à *Artibeus lituratus* (18,7% [16,4 – 29,6]), *Carollia perspicillata* (18,1% [13,7 – 22,1]) e *Glossophaga soricina* (18,8% [15,9 – 22,0]). Os valores do grupo *Myotis sp.* (26,3%

[22,1 – 28,1]) também foram maiores quando comparados à *Artibeus*, *Carollia* e *Glossophaga* (Figura 8F).

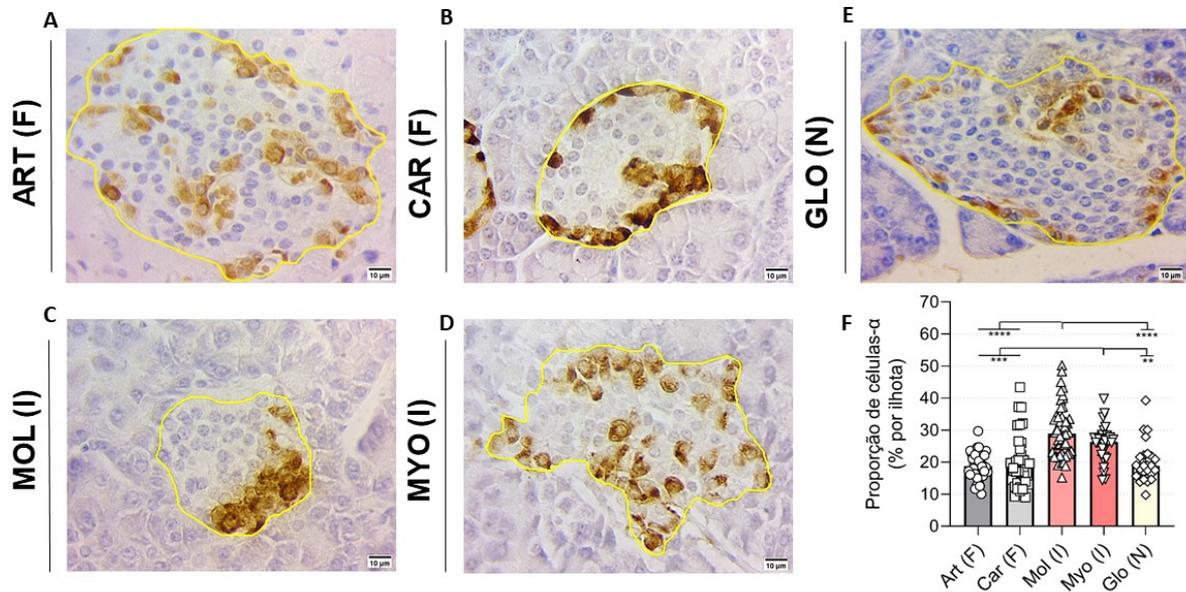


Figura 8. Distribuição e estimativa da proporção de células- α por ilhota. Imunomarcagem de células- α em *Artibeus lituratus*, frugívoro: ART (A); *Carollia perspicillata*, frugívoro: CAR (B); *Molossus molossus*, insetívoro: MOL (C); *Myotis nigricans*, insetívoro: MYO (D) e *Glossophaga soricina*, nectarívoro: GLO (E). É possível observar em A e D células- α mais dispersas pelas ilhotas. Em B e E se nota a imunomarcagem se dá mais na periferia das ilhotas. Em C as células- α se situam com frequência polarizadas em uma das margens da ilhota. Escala: 10 μ m = 40x. (F) **Proporção de células- α por ilhota. Valores do grupo *Molossus* sp. maiores em comparação à *Artibeus* sp., *Carollia* sp. e *Glossophaga* sp. Valores do grupo *Myotis* sp. maiores em comparação à *Artibeus* sp., *Carollia* sp. e *Glossophaga* sp. Teste de Kruskal – Wallis com pós-teste de Dunn, valores expressos como mediana e intervalos interquartílicos. ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001. ART (F): *Artibeus lituratus* - frugívoro; CAR (F): *Carollia perspicillata* - frugívoro; MOL (I): *Molossus molossus* – insetívoro; MYO (I): *Myotis nigricans* - insetívoro; GLO (N): *Glossophaga soricina* – nectarívoro.**

5 – Discussão

Os morcegos são mamíferos com uma grande diversidade, chegando a representar cerca de 27% da quantidade total de espécies desta classe (Mammalia) (MAMMAL DIVERSITY DATABASE, 2023). Estão distribuídos geograficamente em todo o globo, exceto nas regiões polares, sendo uma ordem excepcionalmente bem adaptada (VILCHES-PIÑONES et al., 2022). Conhecer a fisiologia dos morcegos é deveras relevante. Por exemplo, os morcegos frugívoros e nectarívoros são espécies interessantes do ponto de vista metabólico por conta da capacidade destes animais ingerirem grandes quantidades de açúcares diariamente sem com isso desenvolverem aumento de adiposidade e disfunções metabólicas como ocorreria em humanos (MQOKELI; DOWNS, 2012).

Segundo nossa hipótese, era esperado que as espécies com dieta frugívora e nectarívora possuíssem ilhotas com maior celularidade em comparação aos morcegos insetívoros, refletindo em maior área, diâmetros, perímetro e raio médio. Também era esperado

que estes animais demonstrassem maior massa relativa de pâncreas endócrino, maior densidade de ilhotas por área e menor proporção de células- α . De um modo geral, estes parâmetros indicariam uma elevada requisição do aparato de células não- α (em sua maioria, células- β) presumivelmente com o intuito de manter a glicemia dentro de níveis aceitáveis dada à elevada proporção de carboidratos destas dietas. De fato, nos frugívoros *Artibeus lituratus* e nos nectarívoros *Glossophaga soricina* houve grande correspondência nos resultados, com maiores valores de massa relativa, área, perímetro, diâmetro e raio em comparação ora com ambos os morcegos insetívoros, ora apenas com *Myotis nigricans*. Embora a literatura atual seja escassa tanto no número de estudos comparativos quanto na quantidade de dados morfométricos coletados, nossos resultados estão de acordo com o já expresso por Machado-Santos *et al.* (2017). Neste estudo, demonstrou-se que morcegos com dieta predominantemente glicídica (nectarívoros *Anoura geoffroyi*) possuem maior massa relativa de pâncreas endócrino e ilhotas com maior diâmetro do que morcegos com dieta predominantemente proteica (insetívoros *Pteronotus personatus*) (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2017).

Considerando que não encontramos diferenças significativas com relação a densidade de ilhotas entre os grupos, podemos afirmar que a maior massa relativa de pâncreas endócrino encontrada em *A. lituratus* e *G. soricina* se dá por maior celularidade das ilhotas (área) do que por maior densidade (número) delas por área. Esta observação é confirmada pelos dados de histograma que revelaram nestes animais maior proporção de ilhotas acima dos 4.000 μm^2 (morcegos insetívoros ficaram com a maioria de suas ilhotas em faixas inferiores, como <1.999 μm^2).

Estes resultados, em conjunto com a proporção média de cerca de 18% de células- α em *A. lituratus* e *G. soricina* comparados a ~27% em *M. molossus* e *M. nigricans*, denotam que possivelmente nestes animais existe uma dependência maior do componente hipoglicemiante do pâncreas endócrino, porém, é importante evidenciar que nem sempre características morfológicas se equiparam a condições funcionais (RAFACHO *et al.*, 2009). Embora nosso estudo não tenha avaliado a homeostase glicêmica *in vivo* e nem a proporção de células- β , quando analisada a literatura já disponível para ambas estas espécies juntamente com nossos resultados, é possível que façamos algumas suposições quanto a atributos adaptativos. Por exemplo, já se sabe que os morcegos *A. lituratus* possuem elevada insulinemia, e que tanto no estado alimentado, quanto no jejum, estes valores são superiores aos observados em camundongos e humanos obesos (PROTZEK *et al.*, 2010). Sabe-se também que nestes animais as ilhotas possuem predominância de células- β , onde a secreção de insulina frente a um estímulo basal de glicose (em fragmentos pancreáticos), é na ordem de 16% do conteúdo total,

enquanto que em humanos, ratos e camundongos nestas mesmas condições não ultrapassa 2% (PROTZEK *et al.*, 2010). Apesar de uma elevada insulinemia parecer contra intuitiva, estes morcegos também possuem alta sensibilidade à insulina, elevada tolerância à glicose e alta atividade da enzima hexoquinase no tecido muscular esquelético (PROTZEK *et al.*, 2010; YACOE *et al.*, 1985).

Em contrapartida, embora os morcegos *Glossophaga soricina* também demonstrem elevada atividade da enzima hexoquinase no tecido muscular esquelético (SUAREZ; HERRERA; WELCH, 2011) e uma alta densidade de transportadores de glicose 4 (GLUT-4) no mesmo tecido (SUAREZ; WELCH, 2017), testes de tolerância à glicose realizados durante o descanso e com a permissão do voo, demonstram que morcegos *G. soricina* somente são capazes de regular sua glicemia de forma eficiente mediante à intensa atividade locomotora (KELM *et al.*, 2011). Além disso, embora não haja dados de secreção de insulina em ilhotas isoladas nestes animais, em 2021 Castro e colaboradores relatam que a insulinemia do morcego nectarívoro *Anoura caudifer* em condições basais é cerca de 3,6 vezes menor que a reportada em morcegos vampiros *Desmodus rotundus*, e 7,5 vezes menor que a reportada nos frugívoros já citados *A. lituratus* (CASTRO *et al.*, 2021; FREITAS *et al.*, 2013; PROTZEK *et al.*, 2010). Desta forma, é imprescindível ressaltar a importância de estudos comparativos entre espécies com dietas presumidamente semelhantes quanto a proporção de macronutrientes. Enquanto em *A. lituratus* a maior massa relativa, com ilhotas de expressiva área, diâmetro, perímetro e raio, provavelmente reflita em um componente endócrino hipoglicemiante proeminente e eficiente do ponto de vista secretório, é possível especular ao observar a literatura em conjunto com nossos resultados, que em *G. soricina* estas mesmas características se deem por conta de uma adaptação compensatória a uma eventual secreção de insulina discreta frente a um estímulo com glicose.

Além disso, outro fato que suporta a presença de um aparato hipoglicemiante robusto em *A. lituratus*, é de que sua dieta é constituída de frutos com uma concentração mais proeminente de lípidos, logo após a predominância de carboidratos (BATISTA *et al.*, 2016). Sabendo-se que os ácidos graxos quando em presença da glicose potencializam a secreção de insulina, presumimos que ao longo dos anos de adaptação à sua dieta, *A. lituratus* evoluiu de forma a apresentar um aparato hipoglicemiante potente tanto do ponto de vista morfométrico, quanto do ponto de vista funcional.

Já quanto a *G. soricina*, sabe-se há tempos que o exercício aeróbico intenso gera o deslocamento de GLUT-4 para a membrana das células musculares, de forma independente – porém sinérgica – à insulina (RICHTER; HARGREAVES, 2013), e acredita-se que devido a

este mecanismo, o voo pairado está diretamente relacionado à homeostase glicêmica em morcegos nectarívoros (CASTRO *et al.*, 2021). Embora se saiba que morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* spp. também realizem voo pairado e complementem sua alimentação com néctar, sabe-se que em termos aerodinâmicos, morcegos nectarívoros *G. soricina* e *A. caudifer* possuem voo mais especializado (INGERSOLL *et al.*, 2018). Quirópteros nectarívoros estritos possuem maior suporte ao próprio peso quando realizam movimentos ascendentes por conseguirem inverter a posição de suas asas de forma mais eficiente e mais parecida com os beija-flores (INGERSOLL *et al.*, 2018).

Morcegos do gênero *Artibeus* spp., que se alimentam predominantemente de figos, coletam frutos e se empoleiram em “abrigos de forrageamento” para consumi-los (OPREA *et al.*, 2007). Já no caso de morcegos nectarívoros estritos, a coleta do néctar de cada flor é feita enquanto o animal está suspenso no ar, o que implica em exercício aeróbico e gasto energético intenso (KELM *et al.*, 2011). Desta forma, supomos que mecanismos de captação de glicose independentes de insulina possivelmente seriam mais expressivos nesta espécie. Embora seja necessário frisar que nós não avaliamos a homeostase glicêmica *in vivo* e que a insulinemia de um animal não representa efetivamente o que é secretado por conta do *clearance* hepático (NAJJAR; PERDOMO, 2019), um dado encontrado por nós que suporta a suposição de uma secreção de insulina discreta em *G. soricina*, é o de esfericidade, onde estes animais juntamente com *M. nigricans*, apresentaram as ilhotas mais disformes.

O formato das ilhotas é um parâmetro que pode afetar a sua função (IONESCU-TIRGOVISTE *et al.*, 2015), e sabe-se que a organização específica das células endócrinas, assim como o formato da ilhota podem determinar diferentes padrões de microcirculação, que atendam de forma mais ou menos eficiente as necessidades de sinalização celular (KIM *et al.*, 2009). Hoje já se sabe por exemplo, que ilhotas com formato irregular podem ter uma influência negativa na atividade secretória de insulina (PICK *et al.*, 1998; BORDEN *et al.*, 2013), e que em contextos *in vitro*, quanto maior a ilhota, menor a capacidade de secreção insulínica devido ao baixo suprimento de oxigênio que é disponibilizado às células mais centrais (FUJITA *et al.*, 2011). Outro ponto que reforçaria a hipótese de uma secreção discreta de insulina em *G. soricina* é que diferentemente de *A. lituratus*, estes animais são extremamente sensíveis ao jejum, não possuindo grandes reservas de energia (AMARAL *et al.*, 2018). Visto que a insulina é um dos estímulos anabólicos mais importantes na constituição de reservas energéticas (DIMITRIADIS *et al.*, 2011), uma reduzida ação hormonal justificaria esta característica. Porém, também já foi confirmado em três espécies de morcegos nectarívoros que existem mutações em genes envolvidos no controle da massa corporal e acúmulo de gordura

(GUTIÉRREZ-GUERRERO *et al.*, 2020), o que permite que estes animais se mantenham leves, facilitando assim a execução do voo.

Novamente é importante ressaltar a importância de se reduzir o viés existente em trabalhos deste gênero, produzindo estudos com grande número de espécies, e que apresentem mais de uma espécie a ser avaliada para o mesmo hábito alimentar. Em nosso trabalho, os resultados apresentados para o frugívoro *A. lituratus* não foram fielmente convergentes com os apresentados pelos frugívoros de mesma família (Phyllostomidae) *Carollia perspicillata*. Enquanto os morcegos *A. lituratus* apresentaram ~4% de massa relativa de pâncreas endócrino, obtendo diferenças robustas quando comparados com os morcegos insetívoros, frugívoros *C. perspicillata* apresentaram uma mediana de 2,5%, não atingindo diferença estatística quando comparados nem com os morcegos insetívoros, nem com *A. lituratus* e *G. soricina*. Esta característica se repetiu para quase todos os parâmetros analisados.

Quando se avalia o comportamento alimentar destes animais, a literatura demonstra que mesmo que ambos morcegos frugívoros complementem sua dieta com insetos, estes têm pesos diferentes na alimentação de cada espécie (HERRERA *et al.*, 2002). Enquanto em morcegos *Artibeus jamaicensis* os frutos representam a fonte proteica principal da alimentação ao longo de todo ano, em morcegos *Carollia brevicauda* há um decréscimo na contribuição da fitofagia ao final da estação chuvosa e início da estação seca (HERRERA *et al.*, 2002). Sabe-se por exemplo, que as exigências nutricionais mínimas de nitrogênio são maiores em *C. perspicillata* quando comparadas com *Artibeus jamaicensis* (DELORME; THOMAS, 1996 e 1999). Acredita-se que este consumo de insetos por frugívoros do gênero *Carollia* spp. não seja eventual, e sim de grande importância no período do ano em que as frutas do gênero *Piper* spp. estão presentes em menor abundância (HERRERA *et al.*, 2002). Desta forma, acreditamos que as ilhotas de *C. perspicillata* apresentem características intermediárias entre os morcegos frugívoros *A. lituratus* e insetívoros *Molossus molossus* e *Myotis nigricans*.

Com relação aos resultados expressos pelos morcegos insetívoros, é de se ressaltar a semelhança e pouca variação por nós encontrada, mesmo sendo de famílias diferentes (*Molossus molossus*: Molossidae; *Myotis nigricans*: Vespertilionidae) (REIS *et al.*, 2007). Na natureza, *M. molossus* e *M. nigricans* possuem dietas parecidas, compostas por insetos das ordens Coleoptera (besouros), Diptera (moscas e mosquitos), Lepidoptera (borboletas e mariposas), Hymenoptera (vespas, abelhas e formigas) e Hemiptera (cigarras) (RAMÍREZ-CHAVEZ *et al.*, 2008; AGUIAR; ANTONINI, 2008). Em nosso trabalho, mesmo não tendo sido encontradas diferenças na densidade, os morcegos insetívoros apresentaram menor área, perímetro, diâmetros e raio de ilhotas, acarretando assim em uma massa relativa de pâncreas

endócrino reduzida (~1%), de forma parecida ao já relatado para outros morcegos com dieta predominantemente proteica, como o hematófago *Desmodus rotundus* (~1,5%) (FREITAS *et al.*, 2013). Nestes animais, a maior parte (~55% a ~78%) das ilhotas apresentaram área inferior a 1.000 μm^2 . Ainda assim, destaca-se a elevada proporção de células- α quando comparados com *A. lituratus*, *C. perspicillata* e *G. soricina*. Com valores de cerca de ~26% a 28%, esta proporção também é alta quando comparada com roedores, que possuem no máximo 15 a 20% das ilhotas compostas por este tipo celular (STEINER *et al.*, 2010).

A presença de ilhotas diminutas, com uma elevada proporção de células- α , denota que provavelmente estes animais não tem uma dependência tão grande do aparato hipoglicemiante para obtenção de energia. De fato, já foi relatado que morcegos insetívoros *Noctilio albiventris* oxidam proteínas recém ingeridas para subsidiar o metabolismo durante o voo e substratos lipídicos durante o jejum (VOIGT; SÖRGEL; DECHMANN, 2010), o que reduziria a demanda por insulina, uma vez que nem toda captação de aminoácidos depende deste hormônio (BONADONNA *et al.*, 1993).

Em animais carnívoros, onde o macro nutriente em maior quantidade na dieta são as proteínas, há uma grande dependência das células- α pancreáticas e do hormônio glucagon para o estabelecimento de um estado constante de gliconeogênese, sendo esta a via responsável por manter a glicemia destes animais (SCHERMERHORN, 2013). O metabolismo de aminoácidos está intimamente relacionado ao metabolismo hepático da glicose, e a interdependência destas vias se dá pois o catabolismo de aminoácidos fornece também o substrato necessário para a produção constante de glicose pela via gliconeogênica (SCHERMERHORN, 2013). A glicose produzida é reservada para manter a atividade cerebral, frente a um ambiente que fornece pouco carboidrato na dieta, e por este motivo carnívoros estritos possuem moderada intolerância à glicose e resistência à insulina em tecidos periféricos (SCHERMERHORN, 2013). No caso dos morcegos, quando avaliamos estes dados da literatura em conjunto com os resultados por nós encontrados, fica claro que como o substrato energético a ser catabolizado seriam os aminoácidos, ilhotas com elevada celularidade e grande proporção de células- β seriam desnecessárias. E de fato, alguns estudos suportam esta suposição. Por exemplo, em 2019 Peng e colaboradores, demonstraram que quatro espécies de morcegos insetívoros possuem captação de glicose reduzida nos tecidos periféricos quando comparados a morcegos frugívoros. Além disso, há tempos sabe-se que a atividade da enzima hexoquinase no tecido muscular esquelético de insetívoros *Noctilio albiventris*, *Myotis nigricans* e *Eumops dabbeni* é rudimentar (YACOE *et al.*, 1982).

Em suma, a distribuição das ilhotas pancreáticas e sua massa relativa (% por área) em cada espécie de morcego, sejam nos frugívoros, insetívoros ou nectarívoros refletem adaptações que garantiram o controle fino da glicemia de acordo com as necessidades impostas por suas dietas ao longo de suas fixações evolutivas. Assim, concluímos que os morcegos frugívoros *A. lituratus* e os nectarívoros *G. soricina*, mas não os frugívoros *Carollia perspicillata*, exibem maior massa de ilhotas pancreáticas do que as espécies insetívoras, e que isto decorre da maior celularidade das ilhotas e não de um maior número delas por área. Além disso, nossos resultados referentes à proporção de células- α nos permitem especular que parece haver uma relação mais ou menos fixa onde quanto maior a proporção de macronutrientes glicídicos numa dieta, maior a demanda por células- β e quanto maior a proporção de macronutrientes proteicos, maior a demanda por células- α .

6 – Limitações

No projeto inicial, pensávamos em fazer a quantificação da proporção de células- β e de células- α por meio de imunomarcação pelo sistema de peroxidase indireta (IHP) ou fluorescência (IF). Porém, não tivemos sucesso com a marcação para a insulina no sistema de IHP nem pela IF. Tal fato reside ou na inespecificidade ou viabilidade do anticorpo primário ou na interferência do Methacarn na exposição dos antígenos. Diante da escassez de amostras e das tentativas sem sucesso para imunomarcação de insulina por IF ou IHP, nos restaram poucas lâminas silanizadas que felizmente nos permitiram ter algum dado para as células- α .

7 – Referências:

- AGUIAR, L. M. S.; ANTONINI, Y. Diet of two sympatric insectivores bats (Chiroptera: Vespertilionidae) in the Cerrado of Central Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 1, p. 28–31, mar. 2008.
- AMARAL, T. S. *et al.* Low energy reserves are associated with fasting susceptibility in Neotropical nectar bats *Glossophaga soricina*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, p. 165–168, 20 ago. 2018.
- AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS. (2023). **Mammal Diversity Database** (Version 1.6). < <https://www.mammaldiversity.org/index.html> > Acesso em: 04/04/2023
- AMITAI, O. *et al.* Fruit bats (Pteropodidae) fuel their metabolism rapidly and directly with exogenous sugars. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 15, p. 2693–2699, 1 ago. 2010.
- ARITA, H. T; FENTON, M. B. Flight and echolocation in the ecology and evolution of bats. **Trends in Ecology and Evolution**, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 53-58, 1997.

- AWADI, K. M.; MUTLAK, B. H. Morphological and Histological Study of the Pancreas Gland in the Local Bat (*Pipisterillus kuhlii*). **Journal for Pure and Applied Science**, [s.l.], v. 28, n. 2, 2015.
- BAKER, H.G., BAKER, I. AND HODGES, S.A. Sugar Composition of Nectars and Fruits Consumed by Birds and Bats in the Tropics and Subtropics. **Biotropica**, v. 30, iss: 4, p. 559-586, 1998.
- BATISTA, C. B.; REIS, N. R.; REZENDE, M. I. Nutritional content of bat-consumed fruits in a forest fragment in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, p. 244–250, 15 ago. 2016.
- BEGUELINI, M. R. *et al.* Impact of the Processes of Total Testicular Regression and Recrudescence on the Epididymal Physiology of the Bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae). **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128484, 9 jun. 2015.
- BIANCONI, G. V.; PEDRO, W. A. Família Vespertilionidae. *In*: REIS, N. R.; PERACCHI A. L. PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (eds) **Morcegos do Brasil**. Londrina: [s.n], 2007. 256 p.
- BONADONNA, R. C. *et al.* Effect of insulin on system A amino acid transport in human skeletal muscle. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 2, p. 514–521, 1 fev. 1993.
- BORDEN, P. *et al.* Sympathetic Innervation during Development Is Necessary for Pancreatic Islet Architecture and Functional Maturation. **Cell Reports**, v. 4, n. 2, p. 287–301, jul. 2013.
- BREDT, A.; CAETANO-JÚNIOR, J. **Método visual para identificação dos morcegos do Distrito Federal – Brasil**. Brasília: Secretaria de Saúde do Distrito Federal/Visual Quiróptera, 2001.
- BRISSOVA, M. A.; POWERS, A. C. Architecture of Pancreatic Islets. *In*: SEINO, S. BELL, G. I. (eds) **Pancreatic Beta Cell in Health and Disease**. Tokyo: Springer, 2008.
- CARRERA, J. P.; SOLARI, S.; LARSEN, P. A.; ALVARADO, D. F.; BROWN, A. D.; CARRIÓN, C.; TELLO, S.; BAKER, R. J. **Bats of the tropical lowlands of western Ecuador**. Lubbock: Special Publications of the Museum of Texas Tech University, n. 57, 2010. 44 p.
- CASTRO, D. L. J. *et al.* Insulin and glucose regulation at rest and during flight in a Neotropical nectar-feeding bat. **Mammalian Biology**, v. 101, n. 6, p. 987–996, 1 dez. 2021.
- CLOUTIER, D.; THOMAS, D. W. *Carollia perspicillata*. **Mammalian Species**, [s.l.], n. 417, p. 1-9, 1992.
- DELORME, M.; THOMAS, D. W. Nitrogen and energy requirements of the short-tailed fruit bat (*Carollia perspicillata*): fruit bats are not nitrogen constrained. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 166, n. 7, p. 427–434, 1 nov. 1996.
- DELORME, M.; THOMAS, D. W. Comparative analysis of the digestive efficiency and nitrogen and energy requirements of the phyllostomid fruit-bat (*Artibeus jamaicensis*) and the pteropodid fruit-bat (*Rouseattus aegyptiacus*). **Journal of Comparative Physiology B**, v. 169, p. 123-132, 1999.

- DIMITRIADIS, G. *et al.* Insulin effects in muscle and adipose tissue. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 93, p. S52–S59, ago. 2011.
- DRESS, W.J.; NEWELL, S.J.; NASTASE, A.J.; FORD, J.C. Analysis of amino acids in nectar from pitchers of *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae). **Am. J. Bot.**, v. 84, iss: 12, p. 1701-1706, 1997.
- DUMONT, E. R. Feeding mechanisms in bats: variation within the constraints of flight. **Integrative and Comparative Biology**, v. 47, iss. 1, p. 137–146, 2007.
- EMMONS, L. H.; FEER, F. **Neotropical Rainforest Mammals: A field guide**. Chicago: University of Chicago Press, 1990. 281 p.
- FABIAN, M. E.; GREGORIN, R. Família Molossidae. *In*: REIS, N. R.; PERACCHI A. L. PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (eds) **Morcegos do Brasil**. Londrina: [s.n], 2007. 256 p.
- FALCÃO, F. C.; REBELO, V. F.; TALAMONI, S. A. Structure of a bat assemblage (Mammalia, Chiroptera) in Serra do Caraça Reserve, south-east Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 347-350, 2003.
- FENTON, M. B. et al. Emergence, Echolocation, Diet and Foraging Behavior of *Molossus ater* (Chiroptera: Molossidae). **Biotropica**, v. 30, n. 2, p. 314–320, 1998.
- FLEMING, T. H. **The Short-tailed Fruit Bat: A Study in Plant-Animal Interactions**. Chicago: The University of Chicago Press, 1988. 230 p.
- FREEMAN, P. W. Nectarivorous feeding mechanisms in bats. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 56, n. 3, p. 439–463, 1 nov. 1995.
- FREITAS, M. B. et al. Energy metabolism and fasting in male and female insectivorous bats *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, p. 617–621, ago. 2010.
- 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**, [s.l], v. 183, p. 1-6, 2013.
- FUJITA, Y. et al. Large human islets secrete less insulin per islet equivalent than smaller islets in vitro. **Islets**, v. 3, n. 1, p. 1–5, jan. 2011.
- GALINDO-GONZÁLES, J. Dispersion de semillas por murciélagos: su importancia en la conservación y regeneración del bosque tropical. **Acta Zoologica Mexicana**, [s.l.], v. 73, p. 57-74, 1998.
- GARBINO, G.S.T., R. GREGORIN, I.P. LIMA, L. LOUREIRO, L.M. MORAS, R. MORATELLI, M.R. NOGUEIRA, A.C. PAVAN, V.C. TAVARES, M.C., A.L. PERACCHI. **Updated checklist of Brazilian bats: versão 2020**. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil — CLMB. Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros (Sbeq), 2020. <<https://www.sbeq.net/lista-de-especies>> Acesso em: 31/08/2021

- GARDNER, A. L. Order Chiroptera. *In*: Gardner, A. L. **Mammals of South America: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats**. v. 1. Chicago: The University of Chicago Press, 2007. 690 p.
- GENUTH, S. M. Hormônios das ilhotas pancreáticas. *In*: LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fundamentos de Fisiologia**. Philadelphia: Elsevier Mosby, 4th ed, 2006. 815 p.
- GLASS, B. P. Feeding mechanisms of bats. *In*: SLAUGHTER, B. H.; WALTON, W. (eds). **About bats: a chiropteran symposium**. Dallas: Southern Methodist University Press, 1970.
- GOMES, F. A.; FLORES, R. A.; BRUXEL, M. A.; SILVA, F. N.; MOREIRA, E. L. G.; ZOCCAL, D. B.; PREDIGER, R. D.; RAFACHO, A. Glucose homeostasis is not affected in a murine model of Parkinson's disease induced by 6-OHDA. **Frontiers in Neuroscience**, [s.l], v. 12, 2019.
- GONZALEZ-TERRAZAS, T. P. *et al.* How Nectar-Feeding Bats Localize their Food: Echolocation Behavior of *Leptonycteris yerbabuenae* Approaching Cactus Flowers. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, e0163492, 2016.
- GORBUNOVA, V.; SELUANOV, A.; KENNEDY, B. K. The World Goes Bats: Living Longer and Tolerating Viruses. **Cell Metabolism**, v. 32, n. 1, p. 31-43, 2020.
- GORDON, W. E. *et al.* Integrative single-cell characterization of frugivory adaptations in the bat kidney and pancreas. **bioRxiv**, , 13 fev. 2023. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.02.12.528204v1> Acesso em: 9/04/2023
- GRIFFITHS T. A.; GARDNER, A L. Subfamily Glossophaginae. *In*: GARDNER, A. L. **Mammals of South America: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats**. v. 1. Chicago: The University of Chicago Press, 2007. 690 p.
- GUTIÉRREZ-GUERRERO, Y. T. *et al.* Genomic consequences of dietary diversification and parallel evolution due to nectarivory in leaf-nosed bats, **GigaScience**, v. 9, iss. 6, 2020.
- HALL, J. E.; HALL, M. E. **Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology**. Philadelphia: Elsevier, 14th ed., 2021. 1028 p.
- HERNANDEZ, A.; MARTINEZ DEL RIO, C. Intestinal disaccharidases in five species of phyllostomid bats. **Comparative biochemistry and physiology B, Comparative biochemistry**, v. 103, n. 1, p. 105–111, 1 set. 1992.
- HERRERA, G. L. *et al.* Sources of assimilated protein in five species of New World frugivorous bats. **Oecologia**, v. 133, n. 3, p. 280–287, nov. 2002.
- HESTER, L.; MYERS, P. (2001). "**Emballonuridae**" (On-line), Animal Diversity Web. <<https://animaldiversity.org/accounts/Emballonuridae/>> Acesso em: 04/04/2023

HINKLEY, R. E.; BURTON, P. R. Fine Structure of the Pancreatic Islet Cells of Normal and Alloxan Treated Bats (*Eptesicus fuscus*). **The Anatomical Record**, [s.l.], v. 166, p. 67-86, 1970.

HUTSON, A.M., MICKLEBURGH, S.P., AND RACEY, P.A. **Microchiropteran bats: global status survey and conservation action plan**. IUCN/SSC Chiroptera Specialist Group. Gland: Switzerland and Cambridge, 2001. 258 pp.

INGERSOLL, R.; HAIZMANN, L.; LENTINK, D. Biomechanics of hover performance in Neotropical hummingbirds versus bats. **Science Advances**, v. 4, n. 9, p. eaat2980, 7 set. 2018.

IONESCU-TIRGOVISTE *et al.* A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. **Sci Rep** v. 5, 14634, 2015.

KEEGAN, D. J. Glucose absorption in the fruit bat studied using the intestinal ring method. **South Afr. J. Zool.**, v. 80, n. 3, p. 132, 1984.

KELM, D. H. *et al.* High activity enables life on a high-sugar diet: blood glucose regulation in nectar-feeding bats. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 278, n. 1724, p. 3490–3496, 13 abr. 2011.

KIM, A.; MILLER, K.; JO, J.; KILIMNIK, G.; WOJCIK, P.; HARA, M. Islet architecture: A comparative study. **Landes Bioscience**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 129-136, 2009.

LEMKE, T. O. Foraging Ecology of the Long-Nosed Bat, *Glossophaga Soricina*. **Ecology**, [s.l.], v. 65, n.2, p. 538-548, 1984.

MACHADO-SANTOS, C.; AQUINO, J. C. F.; MIKALAUKA, J. S.; ABIDU-FIGUEIREDO, M.; MENDES, R. M. M.; SALES, A. What difference exists in the pancreas of mammals with sanguivorous diet? A morphological, stereological, and immunohistochemical study of the pancreatic islets of the hematophagous bat *Diphylla ecaudata*. **Regulatory Peptides**, [s.l.], v. 183, p. 62-68, 2013.

MACHADO-SANTOS, C.; AQUINO, J. C. F.; ROCHA, P. A.; ABIDU-FIGUEIREDO, M.; BRITO-GITIRANA, L.; SALES, A. Influence of feeding habits on the endocrine pancreas of insectivore bat *Pteronotus personatus* and nectarivore bat *Anoura geoffroyi*: A comparative stereological and immunohistochemical study. **Tissue and Cell**, [s.l.], 2017.

MAKANYA, A. N. *et al.* 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.**, v. 200, p. 2415-2423, 1997.

MICHELMORE, A. J.; KEEGAN, D. J.; KRAMER, B. Immunocytochemical Identification of Endocrine Cells in the Pancreas of the Fruit Bat, *Rouseattus aegyptiacus*. **General and Comparative Endocrinology**, [s.l.], v. 110, p. 319-325, 1998.

MQOKELI, B. R.; DOWNS, C. T. Blood plasma glucose regulation in Wahlberg's epauletted fruit bat. **African Zoology**, v. 47, n. 2, p. 348–352, 1 abr. 2012.

- MYERS, P. Patterns of reproduction of four species of vespertilionid bats in Paraguay. **University of California Publications in Zoology**, Berkeley, v. 107, p. 1-41, 1977.
- NAJJAR, S. M.; PERDOMO, G. Hepatic Insulin Clearance: Mechanism and Physiology. **Physiology**, v. 34, n. 3, p. 198–215, 1 maio 2019.
- NEUWEILER, G. **The biology of bats**. New York: Oxford University Press, 2000. 310 p.
- NICOLSON, S. W.; NEPI, M.; PACINI, E. Nectaries and Nectar. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2007. 408 p.
- NYFFELER, M.; KNÖRNSCHILD, M. Bat Predation by Spiders. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58120, 13 mar. 2013.
- NOGUEIRA, M. R.; DIAS, D.; PERACCHI, A. L. Subfamília Glossophaginae. *In*: REIS, N. R.; PERACCHI A. L. PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (eds) **Morcegos do Brasil**. Londrina: [s.n], 2007. 256 p.
- NOVAES, L. R. M. **Blog Morcegos do Brasil** (2021). < <http://morcegosdobrasil.blogspot.com/>> Acesso em: 02/09/2021.
- NOWAK, R. M. **Walker's bats of the world**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1994. 287 p.
- OPREA, M. et al. A note on the diet and foraging behavior of *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae) in an urban park in southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, p. 297–300, 2007.
- ORCI, L.; UNGER, R. H. Functional, subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. **Lancet**, [s.l.], v. 2, p. 1243-1244, 1975.
- ORTÊNCIO-FILHO, H.; LIMA, I. P.; FOGAÇA, F. N. O. Subfamília Carolliinae. *In*: REIS, N. R.; PERACCHI A. L. PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (eds) **Morcegos do Brasil**. Londrina: [s.n], 2007. 256 p.
- PERACCHI, A. L.; ALBUQUERQUE, S. T. Lista provisória dos quirópteros dos Estados do Rio de Janeiro e Guanabara, Brasil (Mammalia, Chiroptera). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 31, p. 405-413, 1971.
- PERACCHI, A. L.; LIMA, I. P.; REIS, N. R.; NOGUEIRA, M. R.; FILHO, H. O. Ordem Chiroptera. *In*: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: [s.n.], 2006. 438 p.
- PICK, A. et al. Role of Apoptosis in Failure of β -Cell Mass Compensation for Insulin Resistance and β -Cell Defects in the Male Zucker Diabetic Fatty Rat. v. 47, 1998.
- PINHEIRO, E. C. *et al.* Effect of fasting on carbohydrate metabolism in frugivorous bats (*Artibeus lituratus* and *Artibeus jamaicensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 143, n. 3, p. 279–284, 1 mar. 2006.

POTTER, J. H. T. *et al.* Nectar-feeding bats and birds show parallel molecular adaptations in sugar metabolism enzymes. **Current Biology**, v. 31, iss. 20, p. 4667-4674, 2021.

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**, [s.l.], v. 157, p. 142-148, 2010.

RACEY, P. A.; ENTWISTLE, A. C. Life-history and Reproductive Strategies of Bats. *In*: Crichton, E. G.; Krutzsch, P. H. **Reproductive Biology of Bats**. London: Academic Press, 2000. 523 p.

RAFACHO, A.; CESTARI, T.; TABOGA, S. R.; BOSCHERO, A. C.; BOSQUEIRO, J. R. High doses of dexamethasone induce increased β -cell proliferation in pancreatic rat islets. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 296, p. 681-689, 2009.

RAFACHO, A.; RIBEIRO, D. L.; BOSCHERO, A. C.; TABOGA, S. R.; BOSQUEIRO, J. R. Increased pancreatic islet mass is accompanied by activation of the insulin receptor substrate-2/serine-threonine kinase pathway and augmented cyclin D2 protein levels in insulin-resistant rats. **International Journal of Experimental Pathology**, [s.l.], v. 89, n. 4, p. 264-275, 2008.

RAMÍREZ-CHAVES, H. E.; MEJÍA-EGAS, O.; ZAMBRANO, G. Anotaciones sobre dieta, estado reproductivo, actividad y tamaño de colonia del murciélago mastín común (*Molossus molossus*: Molossidae) en la zona urbana de Popayán, Departamento del Cauca, Colombia. **Chiroptera Neotropical**, v. 14, n. 2, p. 384-390, 2008.

RAMNANAN, C. J. *et al.* Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. **Diabetes, Obes. Metab.**, v. 13, p. 118–125, 2011.

RASK-MADSEN, C.; KAHN, C. R. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 32, p. 2052–2059, 2012.

REIS, N. R. **Estudos ecológicos dos quirópteros de matas primárias e capoeiras da região de Manaus, Amazonas**. 1981. 242 f. Tese (Doutorado) – Universidade do Amazonas, 1981.

REIS, N. R.; SHIBATTA, O. A.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. Sobre os Morcegos Brasileiros. *In*: REIS, N. R.; PERACCHI A. L. PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (eds) **Morcegos do Brasil**. Londrina: [s.n], 2007. 256 p.

RICHTER, E. A.; HARGREAVES, M. Exercise, GLUT4, and Skeletal Muscle Glucose Uptake. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 3, p. 993–1017, jul. 2013.

RODRÍGUEZ-PEÑA, N. *et al.* Effects of Sugar Composition and Concentration on Food Selection by Saussure's Long-nosed Bat (*Leptonycteris curasoae*) and the Long-tongued Bat (*Glossophaga soricina*). **Journal of Mammalogy**, v. 88, n. 6, p. 1466–1474, dez. 2007.

ROJAS, D. *et al.* When did plants become important to leaf-nosed bats? Diversification of feeding habits in the family Phyllostomidae. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 10, p. 2217–2228, maio 2011.

RUMPOLD, B.A.; SCHLÜTER, O.K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 57, iss: 5, p. 802-823, 2013.

SCHERMERHORN, T. Normal glucose metabolism in carnivores overlaps with diabetes pathology in non-carnivores. **Front. Endocrinol.**, v. 4, [s.n.], 2013.

SHEN, B. *et al.* Adaptive Evolution in the Glucose Transporter 4 Gene Slc2a4 in Old World Fruit Bats (Family: Pteropodidae). **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, e33197, 2012.

SIMMONS, N. B. Bat phylogeny: an evolutionary context for comparative studies. *In*: Adams, R. A.; Pedersen, S. C. **Ontogeny, Functional Ecology and Evolution of Bats**. New York: Cambridge University Press, 2000. 407 p.

SIMMONS, N. B. Order Chiroptera. *In*: Wilson, D. E.; Reeder, D. M. **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. 3. ed. v.1. Baltimore: Johns Hopkins University Press, p. 312-529, 2005.

SOTERO-CAIO, C. G.; BAKER, R. J.; VOLLETH, M. Chromosomal Evolution in Chiroptera. **Genes**, [s.l.], v. 272, n. 8, p. 1-25, 2017.

STEINER, D. J.; KIM, A.; MILLER, K.; HARA, MANAMI. Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition. **Islets**, v. 2, n. 3, p. 135-145, 2010.

SUAREZ, R. K.; M., L. G. HERRERA; WELCH, K. C., Jr. The sugar oxidation cascade: aerial refueling in hummingbirds and nectar bats. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 2, p. 172–178, 15 jan. 2011.

SUAREZ, R. K.; WELCH, K. C. Sugar Metabolism in Hummingbirds and Nectar Bats. **Nutrients**, v. 9, n. 7, p. 743, jul. 2017.

SUJATHA, S. R.; PULIMOOD, A.; GUNASEKARAN, S. Comparative immunocytochemistry of isolated rat and monkey pancreatic islet cell types. **Indian Journal of Medical Research**, [s.l.], v. 119, p. 38-44, 2004.

SZEWCZAK, J. M. Matching Gas Exchange in the Bat from Flight to Torpor. **American Zoologist**, v. 37, p. 92-100, 1997.

TRACY, C. R. *et al.* Absorption of sugars in the Egyptian fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*): a paradox explained. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 10, p. 1726–1734, 15 maio 2007.

VILCHES-PIÑONES, K.I.; MATUS-OLIVARES, C.; CATALÁN, G.; LISÓN, F. Effect of forest areas configuration on the community of insectivorous bats in agroforestry landscapes. **Austral. Ecology**, v. 00, p. 1–13, 2022.

VOIGT, C. C. *et al.* Nutrient routing in omnivorous animals tracked by stable carbon isotopes in tissue and exhaled breath. **Oecologia**, v. 157, n. 1, p. 31–40, 1 ago. 2008c.

- VOIGT, C. C. *et al.* Stable carbon isotopes in exhaled breath as tracers for dietary information in birds and mammals. *Journal of Experimental Biology*, v. 211, n. 14, p. 2233–2238, 15 jul. 2008a.
- VOIGT, C. C.; GRASSE, P.; REX, K. *et al.* Bat breath reveals metabolic substrate use in free-ranging vampires. **J Comp Physiol B**, v. 178, p. 9–16, 2008b.
- VOIGT, C. C.; SÖRGEL, K.; DECHMANN, D. K. N. Refueling while flying: Foraging bats combust food rapidly and directly to power flight. **Ecology**, v. 91, n. 10, p. 2908–2917, 2010.
- VOIGT, C.C.; SPEAKMAN, J.R. Nectar-feeding bats fuel their high metabolism directly with exogenous carbohydrates. **Functional Ecology**, v. 21, iss: 5, p. 913-921, 2007.
- WEBSTER, W. D. **Systematics and evolution of bats of the genus *Glossophaga***. Lubbock, Special Publications of the Museum of Texas Tech University, v. 36, n. 1, p. 1-184, 1993.
- WELCH JR., K. C. *et al.* Carbon stable-isotope tracking in breath for comparative studies of fuel use. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1365, n. 1, p. 15–32, 2016.
- WELCH, K. C.; HERRERA, L. G.; SUAREZ, R. K. Dietary sugar as a direct fuel for flight in the nectarivorous bat *Glossophaga soricina*. **J Exp Biol**, v. 211, n. 3, p. 310-316, 2008.
- WHITE, A. W.; HARROP, C. J. F. The Islets of Langerhans of the Pancreas of Macropodid Marsupials: a Comparison with Eutherian Species. **Australian Journal of Zoology**, [s.l.], n. 23, p. 309-319, 1975.
- WILSON, D. E. Bat Faunas: A trophic comparison. **Systematic Zoology**, Londres, v. 22, n.1, p. 14-29, 1973.
- YACOE, M. E.; CUMMINGS, J. W.; MYERS, P.; CREIGHTON, G. K. Muscle enzyme profile, diet, and flight in South American bats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 242 n. 3, p. 189-194, 1982.
- ZORTÉA, M.; CHIARELLO, A. G. Observations on the big fruit-eating bat, *Artibeus lituratus* in an urban reserve of south east Brazil. **Mammalia**, Paris, v. 58, n. 4, p. 665-670, 1994.
- ZORTÉA, M.; MENDES, S. L. Folivory in the big fruit-eating bat, *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae) in eastern Brazilian. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 9, p. 117-120, 1993.

8 – Anexos

**Anexo 1. Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal do IBILCE –
Universidade Estadual de São Paulo**


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

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
IBILCE

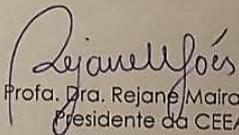
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Morfo-fisiologia da Próstata de Morcegos: Estudo comparativo nas Famílias Phyllostomidae, Molossidae e Vespertilionidae" (protocolo no. 017/09 CEEA), sob responsabilidade de Sebastião Roberto Taboga, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado "ad referendum" da Comissão de Ética na Experimentação Animal, em 28/07/09.

CERTIFICATE

UNESP / IBILCE Ethical Committee for Animal Research (CEEA) hereby certify that the scientific investigation entitled "Morfo-fisiologia da Próstata de Morcegos: Estudo comparativo nas Famílias Phyllostomidae, Molossidae e Vespertilionidae" (protocol n. 017/09 CEEA), on Sebastião Roberto Taboga responsibility, is in accordance with Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and it was approved by the Committee of this Institute, on July 28th, 2009.

São José do Rio Preto, July 28th, 2009.


 Profa. Dra. Rejane Maira Góes
 Presidente da CEEA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Departamento de Biologia
 Rua Cristóvão Colombo, 2265 CEP 15054-000 São José do Rio Preto – SP – Brasil
 Tel 17 221 2429 fax 17 221 2390
 E-mail:ceea@ibilce.unesp.br