



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BEATRIZ MARQUES VILELA SIMÕES

**CARACTERIZAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO
INTESTINO DELGADO DO LAGARTO TEIÚ, *Tupinambis
merianae*, EM RESPOSTA À DORMÊNCIA SAZONAL E
ALIMENTAÇÃO**



Rio Claro
2012

BEATRIZ MARQUES VILELA SIMÕES

**CARACTERIZAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO INTESTINO
DELGADO DO LAGARTO TEIÚ, *Tupinambis merianae*, EM RESPOSTA
À DORMÊNCIA SAZONAL E ALIMENTAÇÃO**

Orientador: DENIS OTÁVIO VIEIRA DE ANDRADE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio
Claro, para obtenção do grau de Bacharelado.

Rio Claro
2012

598.1 Simões, Beatriz Marques Vilela
S593c Caracterização histomorfométrica do intestino delgado do lagarto teiú, *Tupinambis merianae*, em resposta à dormência sazonal e alimentação / Beatriz Marques Vilela Simões. - Rio Claro : [s.n.], 2012
24 f. : il., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Denis Otávio Vieira de Andrade

1. Réptil. 2. Histologia. 3. Privação alimentar. 4. Adaptações intestinais. 5. Répteis. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Denis O. V. de Andrade, pela orientação do meu Trabalho de Conclusão de Curso. Agradeço também ao Flávio H. Caetano, não só por ter me ensinado as técnicas de histologia, mas também por toda a ajuda posterior que me foi dada.

Agradeço a todos os professores, funcionários e alunos dos Departamentos de Biologia e de Zoologia, e também a todo o pessoal do Jacarezário, pela boa convivência e por toda a ajuda.

Agradeço aos meus pais, Ademar Vilela Simões e M. Cristina Marques Vilela Simões, por todo apoio, financeiro e psicológico, que me foi concedido por toda a minha vida, e também por todo o amor e carinho que eu sempre tive. Aos meus irmãos, Tiago e Tulio, pelas brigas e brincadeiras que fizeram de mim quem eu sou hoje, e também pelos maravilhosos sobrinhos que sempre conseguem alegrar os meus dias, independentemente do que tenha acontecido.

Agradeço ao meu namorado e melhor amigo, Alexandre Castellar, por me fazer rir, por me apoiar, por brigar comigo quando eu tenho preguiça de fazer o que tem que ser feito e, principalmente, por me amar e me fazer muito feliz.

Um agradecimento em especial a todos os meus colegas de classe, por toda a diversão e farra dos intervalos de aula, que deixaram todas as aulas mais suportáveis durante esses quatro anos. E por todos os momentos que serão eternos e sempre lembrados com muito carinho.

E também agradeço a todos os meus demais amigos, professores e funcionários da UNESP de Rio Claro, por terem de alguma forma me ajudado e ensinado muitas coisas.

Obrigada.

The more I see the less I know for sure.

John Lennon

SUMÁRIO

Resumo.....	5
1. Introdução.....	6
2. Materiais e Métodos.....	8
2.1. Animais experimentais.....	8
2.2. Histologia.....	8
2.3. Morfometria.....	9
2.4. Análise Estatística.....	10
3. Resultados.....	11
3.1. Massa intestinal e Massa corpórea.....	11
3.2. Descrição do epitélio intestinal.....	12
3.3. Altura das vilosidades intestinais.....	14
3.4. Espessura da <i>tunica muscularis</i>	15
3.5. Perímetro do tubo intestinal.....	15
3.6. Contagem de células caliciformes.....	16
4. Discussão e Conclusão.....	18
5. Referências bibliográficas.....	21

RESUMO

O teiú, *Tupinambis merianae*, é um lagarto Teiidae comum na América do Sul, e conhecido por apresentar um ciclo anual de atividade bastante marcante. Reprodução e forrageio ocorrem nos meses quentes do ano e, com o início dos meses mais frios, os animais param de se alimentar, escondem-se em tocas escavadas no solo e hibernam de 4-5 meses consecutivos, em temperaturas médias por volta de 17°C. Considerando que durante a dormência sazonal o teiú permanece por um longo período sem se alimentar e que o epitélio do intestino pode responder à ausência/presença de nutrientes luminais através de ajustes morfológicos e funcionais importantes, no presente trabalho nós analisamos as alterações histomorfológicas do intestino delgado do lagarto teiú, *T. merianae*, em função do jejum sazonal e não sazonal, bem como em resposta à ingestão do alimento. Para tanto, acompanhamos as alterações dos parâmetros estudados em três grupos experimentais: G1, animais amostrados logo após a saída da dormência e antes (i.e., após o jejum sazonal) e após a primeira alimentação pós-dormência; G2, antes e após a segunda alimentação pós-dormência; e G3, grupo submetido a um jejum extra de 60 dias após o despertar da dormência. Foram analisados cortes de cada amostra de tecido, sendo que em cada corte foram realizadas as seguintes medidas morfométricas: altura de vilosidades, espessura da camada muscular, perímetro do intestino e contagem de células caliciformes por vilosidade. Nossos resultados indicam a ocorrência de uma atrofia da mucosa intestinal em resposta ao jejum suplementar (60 dias) e um aumento desta em resposta a alimentação (para todos os grupos). Houve também uma diminuição do perímetro intestinal com o jejum suplementar (60 dias) e uma diminuição do número de células caliciformes em animais em jejum. Também durante o jejum, o epitélio intestinal assumiu uma conformação pseudoestratificada. Durante a dormência há um aumento da espessura da *tunica muscularis*, a qual sofre uma redução após a alimentação. No geral, as alterações morfohistológicas observadas no intestino delgado de *T. merianae* são congruentes com a variação sazonal e não-sazonal na ingestão do alimento. Este equilíbrio entre demanda e resposta, muito provavelmente, confere importantes benefícios de ordem energética.

1. INTRODUÇÃO

Entre os vertebrados, muitas espécies experimentam um período sazonal de redução da taxa metabólica, o qual pode estender-se por muitos meses (Schmidt-Nielsen, 2002; Pough et al., 2008). Exemplos desta depressão metabólica sazonal, comumente referida como hibernação ou estivação, encontram-se bem documentados tanto em endotérmicos, como aves (Dawson et al., 1983) e mamíferos (Carey, 1990; Heldmaier et al., 2004), como em ectotérmicos, incluindo anfíbios (Cramp et al., 2005; Secor, 2005^A) e répteis (Abe, 1995). Nos répteis, em especial, a dormência sazonal assume importância por permitir a sobrevivência durante períodos em que a baixa disponibilidade de alimento e/ou condições climáticas adversas sejam impeditivas da atividade (Webb & Shine, 1997).

Por exemplo, no caso de *Tupinambis merianae*, popularmente conhecido como lagarto teiú, os animais permanecem ativos durante os meses quentes do ano, verão, primavera e parte do outono, mas entram em hibernação durante o inverno (Abe, 1995; Klein et al., 2006). Nesta estação, os animais buscam abrigo em tocas escavadas no solo nas quais permanecem, sem se alimentar, por um período de 3 a 4 meses, em geral até o início da primavera subsequente (Abe, 1995).

A dormência sazonal de *T. merianae* envolve uma série de ajustes morfológicos, comportamentais e fisiológicos ocorrendo de maneira orquestrada. Durante a hibernação, a taxa metabólica do teiú é severamente diminuída e torna-se bastante insensível a variações da temperatura (i.e., Q_{10} é diminuído) (Abe, 1995; Milsom et al., 2008). Isto é associado a alterações no comportamento termorregulatório (Milsom et al., 2008) e a ajustes na cascata de transporte dos gases respiratórios (Andrade et al., 2004) e no uso de substratos metabólicos (de Souza et al., 2004).

O trato intestinal dos vertebrados possui uma alta flexibilidade fenotípica sendo capaz de responder rapidamente às variações no influxo de alimento (Clench, 1995; Lignot et al., 2005; Secor, 2000, 2001, 2005; Cramp, 2005). Por exemplo, em algumas espécies de serpentes que alimentam-se de presas relativamente grandes após longos períodos de jejum, o trato gastro-intestinal experimenta modificações morfológicas e funcionais drásticas caracterizadas pela atrofia e hipertrofia dos órgãos associados em resposta à ausência ou presença de alimento, respectivamente (Starck & Beese, 2001; 2002). Como a manutenção do intestino em níveis funcionais tem um alto custo energético, que pode chegar a 20-30% do metabolismo basal (Starck, 2005) a capacidade de modulação da atividade deste órgão pode

ser vital para que os animais consigam manter a homeostase energética durante períodos em que não haja influxo de energia, como observado durante o jejum sazonal experimentado por *T. merianae* durante a hibernação. Se por um lado, uma possível atrofia do sistema gastrointestinal durante o período de dormência pode auferir uma economia de energia, por outro, quando do despertar do animal e retomada da alimentação, o trato intestinal necessitará de um maior investimento energético para a sua re-organização. Ou seja, dentro deste raciocínio, a primeira alimentação pós-dormência possivelmente demanda uma reestruturação do aparato gastrointestinal mais marcante do que aquela observada nos episódios alimentares subsequentes.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi acompanhar as possíveis alterações do intestino delgado do lagarto teiú, *T. merianae*, em resposta ao jejum sazonal de longa duração, ao jejum com duração relativamente curta observado durante o período de atividade e também avaliar, partindo destas condições de jejum, o grau de re-organização morfológica do intestino em resposta a ingestão de alimento. Para tanto, nós analisamos diversos parâmetros histomorfométricos do epitélio intestinal de jovens de *T. merianae* antes e após a primeira e segunda alimentação após o despertar da dormência sazonal. Os animais amostrados antes e após a primeira alimentação pós-dormência forneceram informações sobre as possíveis alterações associadas ao jejum sazonal e a retomada da alimentação. Os animais amostrados antes e após a segunda alimentação forneceram informações sobre as respostas à ingestão regular de alimentos seguindo-se a períodos de jejum de curta duração. Finalmente, para investigar se o despertar, *per se*, poderia desencadear alguma resposta histomorfométrica do intestino independente da ingestão do alimento, um terceiro grupo de animais foi submetido a um período de jejum suplementar de 60 dias após o despertar da dormência e avaliado antes e após a ingestão de sua primeira alimentação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. *Animais Experimentais*

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal – CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro (protocolo número 010/2011). Para o presente experimento, foram utilizados 22 indivíduos de *Tupinambis merianae*, obtidos junto ao Laboratório de Criação de Jacarés e Fisiologia Animal, IB, UNESP, Rio Claro, SP (Registro IBAMA 1/35/94/1088-8), o qual mantém uma colônia destes animais em cativeiro.

Durante o período de atividade, meses quentes do ano, os animais foram mantidos em caixas plásticas (120 litros), contendo cerca de 20 indivíduos por caixa. As caixas foram forradas com maravalha e continham tocas de madeira para abrigo dos animais. Uma lâmpada incandescente de 100 W suspensa no topo da caixa foi mantida ligada durante o dia (12 h) para permitir a termorregulação dos animais, durante a noite a temperatura foi mantida em torno de 25°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). Os animais foram alimentados três vezes por semana com uma mistura de carne e suplemento mineral e vitamínico, e tinham livre acesso à água. No início do período de dormência, por volta de maio, a alimentação e o tempo em que a lâmpada permanecia acesa foram progressivamente reduzidas, ao longo de duas semanas, até que os animais enterraram-se na maravalha e toda atividade alimentar e termorregulatória cessou. Nestas condições, a temperatura média de manutenção ficou em torno de 17°C ($\pm 3^\circ\text{C}$).

Os animais experimentais foram divididos nos seguintes grupos: (G1) amostrados antes e após a primeira alimentação pós-dormência (n= 8); (G2) amostrados antes e após a segunda alimentação pós-dormência (n= 8), e; (G3) amostrados após um período suplementar de 60 dias de jejum após o despertar da dormência, também amostrados antes e após a primeira alimentação (n= 6).

Cada grupo experimental foi sub-dividido em dois sub-grupos, “alimentados” e “jejum”, sendo que os animais do grupo alimentados receberam quantidades controladas de alimento (pescoço de frango moído) após 30 horas do momento da alimentação, o qual corresponde ao pico da atividade metabólica pós-prandial (KLEIN et al., 2006). Os animais, tanto em jejum quanto alimentados, foram pesados e sacrificados por decapitação.

2.2. *Histologia*

Após o sacrifício, foram coletadas amostras do intestino delgado médio de cada indivíduo, que foram pesados e fixados em Bouin por 48h, tamponados em tampão fosfato e mantidos em álcool 70% até o momento da inclusão. Os tecidos foram incluídos em *paraplast* MECKORMICS® e cortados em micrótomo.

Cada amostra de tecido foi cortada em micrótomo Leica RM2145 com espessura de 5 µm. Os cortes foram aderidos a lâminas de vidro previamente revestidas por uma solução de Albumina. Após a adesão dos cortes, as lâminas ficaram pelo menos 24h em estufa a 37°C.

Os cortes foram submetidos às seguintes técnicas histoquímicas de coloração:

Hematoxilina-Eosina (rotina): esta técnica é composta dos reagentes Hematoxilina, que possui características basófilas e cora o núcleo celular de azul, e Eosina, que possui características acidófilas e cora o citoplasma da célula de rosa. Os cortes foram desparafinados e hidratados, corados com hematoxilina (5-15 min), lavados em água corrente (10 min) e corados com eosina (1-10 min). Em seguida, os cortes foram lavados, desidratados em álcool 70%, diafanizados e montados em bálsamo do Canadá (Adaptado de JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

Ácido Periódico de Schiff (PAS): o ácido periódico quando atua nos polissacarídeos, oxida-os, dando lugar à formação de aldeídos, os quais podem ser detectados pelo reativo de Schiff. Os cortes foram corados na solução do Ácido Periódico 0,4% por 5 minutos, lavados em água destilada e colocados no reagente de Schiff (15 min no escuro). Em seguida, o material foi lavado em água destilada (3 min), água corrente (10 minutos) e montado em bálsamo do Canadá (Adaptado de JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

Após a coloração do material a partir das técnicas histoquímicas listadas e a montagem em bálsamo do Canadá, o material foi fotografado com auxílio de um microscópio Leica CM 2000.

2.3. Morfometria

Analizamos seis cortes para cada amostra. As medidas histomorfométricas realizadas para cada segmento intestinal através da técnica de Hematoxilina-Eosina foram: altura da vilosidade (da camada muscular ao topo da vilosidade), espessura da camada muscular (*tunica muscularis*) e circunferência do intestino. Foram medidas 10 vilosidades intestinais (ou quantas forem possíveis) escolhidas aleatoriamente. Além disso, foram feitas medições de 10 regiões distintas da camada muscular, em corte transversal, as quais foram escolhidas de forma aleatória. Através da técnica de PAS, foi contado o número de células caliciformes de cinco vilosidades escolhidas de forma aleatória. A partir da obtenção destes dados, calculamos o número médio de células caliciformes por vilosidade. Todas as medidas foram feitas com o auxílio do software *ImageJ*® versão 1.44.

2.4. *Análise Estatística*

As análises estatísticas foram feitas com auxílio do programa SigmaPlot[®] 11.0. Foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk e, para a detecção de possíveis diferenças em cada parâmetro avaliado entre os diferentes grupos de tratamento, foi utilizada uma análise de variância para um fator (ONE WAY ANOVA). Nos casos em que houve significância estatística, os dados foram analisados pela aplicação do teste *post-hoc* de Bonferroni. Quando os dados não se conformaram às premissas de normalidade e/ou igualdade de variâncias, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis, com a aplicação do teste *post-hoc* de Dunn.

As diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. *Massa intestinal e Massa corpórea*

Não houve diferenças na massa dos animais entre nenhum dos grupos experimentais (Tabela I). Por outro lado, a massa do intestino delgado dos animais alimentados aumentou significativamente quando comparada à massa intestinal dos animais em jejum em todos os grupos experimentais (Tabela I, Figuras 1 e 2).

Tabela I

Valores de massa intestinal (MI) e massa corporal (MC) para teiús *Tupinambis merianae* em jejum e alimentados.

	Jejum		
	G1	G2	G3
MI (g)	0,3009 ± 0,1480 ^d	0,3999 ± 0,1107 ^e	0,3085 ± 0,1421 ^f
MC (g)	24,413 ± 0,15	27,217 ± 8,91	21,660 ± 3,99
	Alimentado		
	G1	G2	G3
MI (g)	0,5119 ± 0,0800 ^a	0,7196 ± 0,2477 ^b	0,5505 ± 0,1023 ^c
MC (g)	25,245 ± 4,78	32,815 ± 7,84	24,210 ± 3,81

Valores expressos como média ± desvio padrão. a ≠ G1 jejum; b ≠ G2 jejum; c ≠ G3 jejum; d ≠ G1 alimentado; e ≠ G2 alimentado; f ≠ G3 alimentado. (ANOVA-one way, *post-hoc* Bonferroni; Kruskal-Wallis, *post-hoc* Dunn; $p \leq 0,05$).

Figura 1 - Peso dos indivíduos (g)

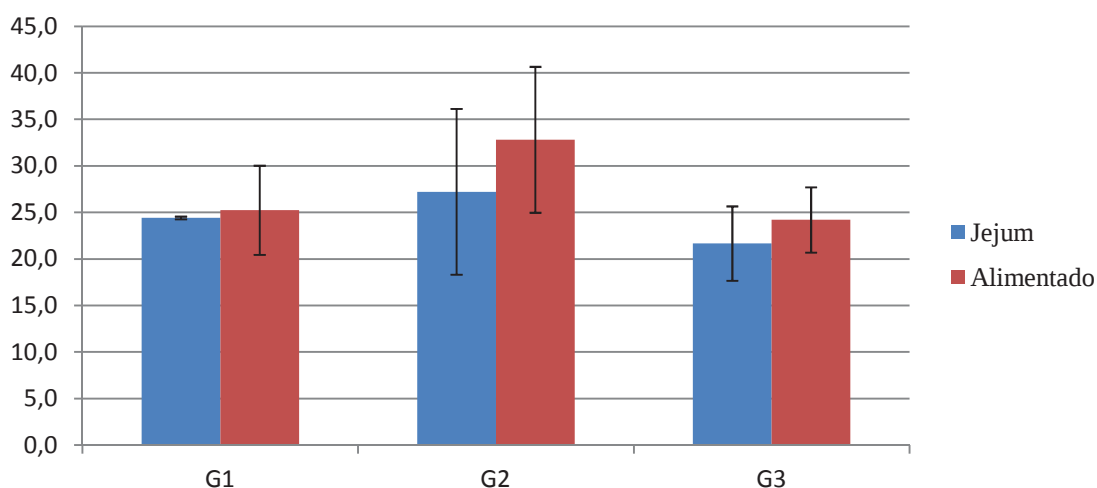
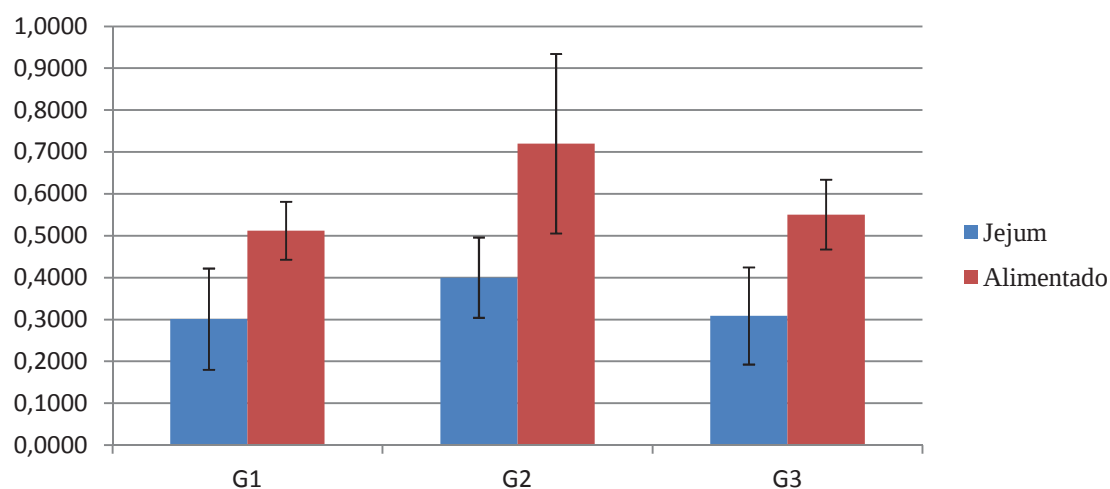


Figura 2 - Peso do intestino (g)



3.2. Descrição do Epitélio Intestinal

As características morfológicas do intestino delgado de *Tupinambis merianae* estão apresentadas na *Figura 3A* e *3B* e *Figura 4*. O epitélio do intestino médio é do tipo colunar simples, formado por células caliciformes e enterócitos. As vilosidades intestinais são recobertas por este epitélio e repousam sobre a submucosa. O interior da vilosidade é preenchido por fibras musculares lisas e tecido conjuntivo, que juntos formam a lâmina própria do intestino delgado. Separando a lâmina própria da submucosa, pode-se observar a camada muscular da mucosa, um conjunto de fibras musculares lisas. Abaixo da submucosa pode-se observar uma camada muscular interna e uma camada muscular longitudinal externa. A camada serosa, que normalmente recobre a superfície externa do intestino, ficou mal preservada neste material.

Nos animais em jejum, pode se notar um epitélio pseudoestratificado (*Figura 4*) na base das vilosidades, ao invés do epitélio simples, morfologia normal esperada para o intestino.

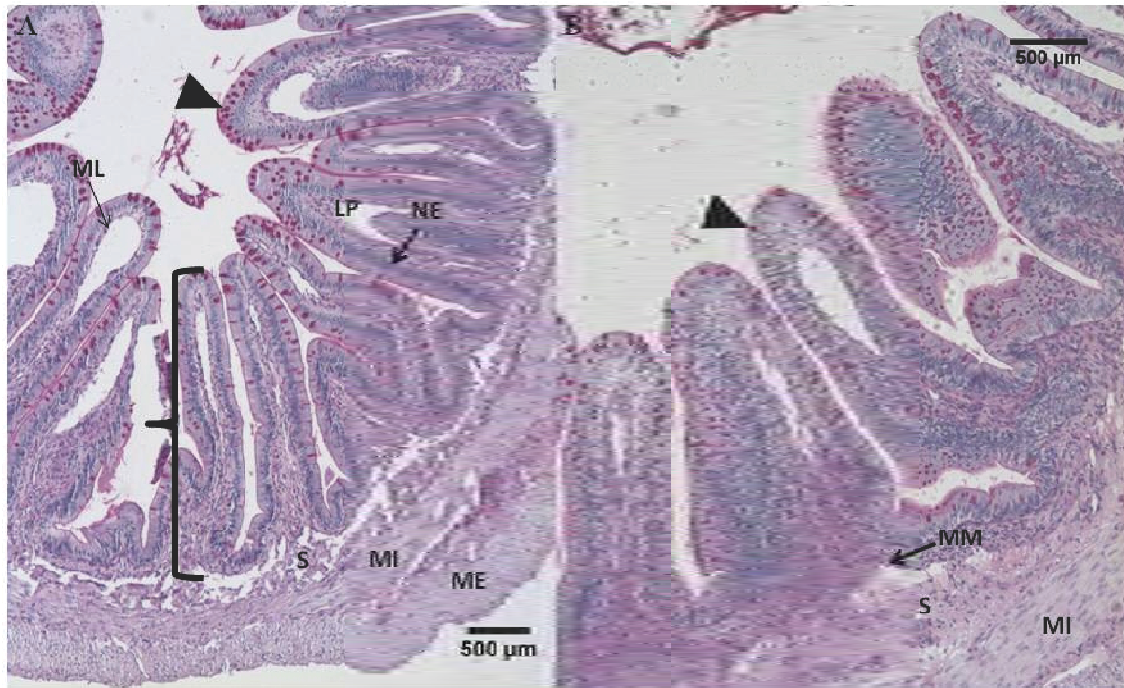


Figura 3 – Corte da porção média do intestino delgado de teiú *Tupinambis merianae* em aumento médio. Chave = vilosidade; Ponta da seta = célula caliciforme; NE = núcleo do enterócito; MI = muscular interna; ME = muscular externa; ML = fibra muscular lisa; MM = muscular da mucosa; S = submucosa; LP = lâmina própria (tecido mal preservado devido à fixação). Técnica PAS.

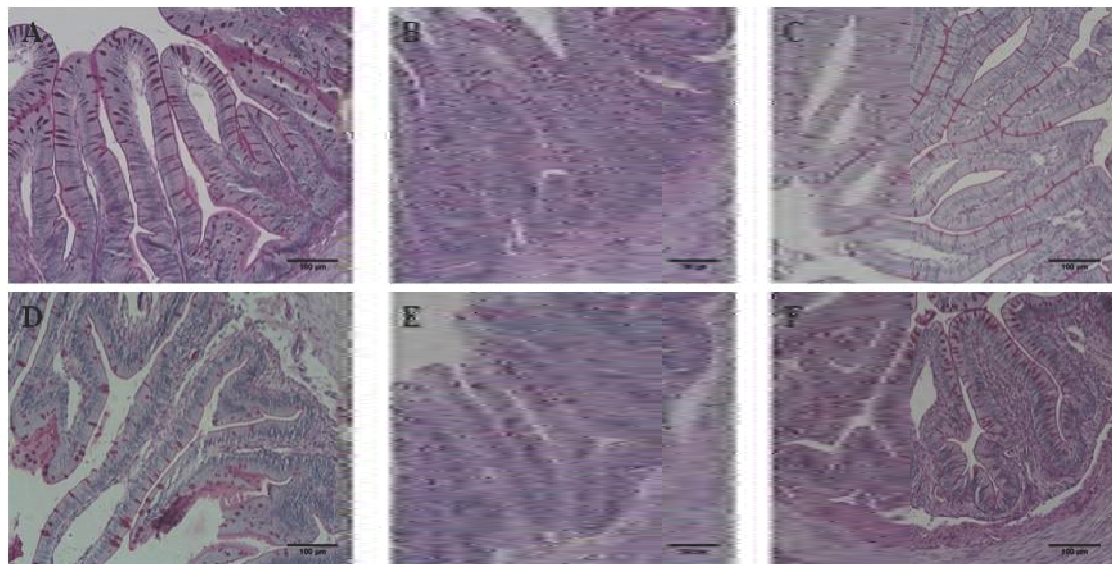


Figura 4 – Cortes do intestino delgado médio de teiús *Tupinambis merianae* em aumento médio. A = alimentado G1; B = alimentado G2; C = alimentado G3; D = jejum G1; E = jejum G2; F = jejum G3. Técnica PAS.

3.3. Altura das vilosidades intestinais

As alturas médias das vilosidades intestinais de *T. merianae* são apresentadas na *Tabela II* e na *Figura 5*. No jejum, houve diferença significativa de G1 quando comparado a G2 e G3, sendo G1 o grupo com a menor média de altura de vilosidades ($P \leq 0,001$). A altura das vilosidades sofreu um aumento significativo como resposta à alimentação nos grupos G2 e G3 ($P \leq 0,001$) quando comparados à G1.

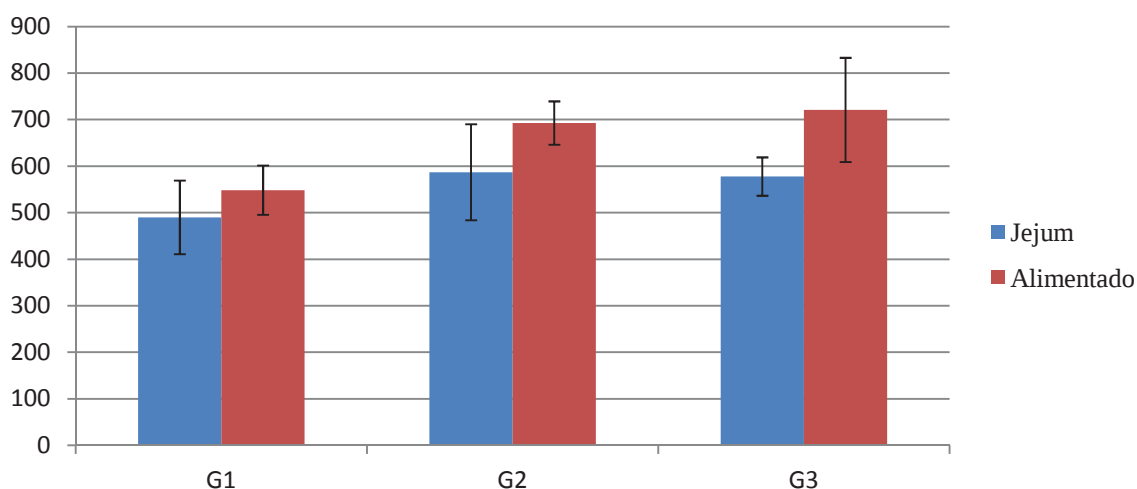
Tabela II

Valores de altura de vilosidade (AV), espessura da camada muscular (EM), perímetro do tubo intestinal (PI) e número de células caliciformes por vilosidade (CC) para teiús *Tupinambis merianae* em jejum e alimentados.

	<i>Jejum</i>		
	G1	G2	G3
AV (μm)	490,1 $\pm$ 78,9 ^c	587,1 $\pm$ 102,9 ^{a, f}	577,7 $\pm$ 41,2 ^b
EM (μm)	236,2 $\pm$ 7,9 ^d	212,7 $\pm$ 9,2 ^e	207,0 $\pm$ 38,8 ^f
PI (μm)	921,4 $\pm$ 179,6 ^c	950,8 $\pm$ 332,7 ^c	640,1 $\pm$ 166,4 ^{a, b, f}
CC	51,1 $\pm$ 9,5 ^d	44,5 $\pm$ 6,1 ^e	41,4 $\pm$ 3,1
	<i>Alimentado</i>		
	G1	G2	G3
AV (μm)	548,6 $\pm$ 52,7 ^e	692,8 $\pm$ 46,6 ^f	721,1 $\pm$ 111,7 ^{c, d}
EM (μm)	176,8 $\pm$ 24,6 ^{a, e, f}	248,3 $\pm$ 39,7 ^{b, d, f}	284,7 $\pm$ 36,9 ^{c, d, e}
PI (μm)	926,2 $\pm$ 207,5 ^f	882,8 $\pm$ 44,5	928,2 $\pm$ 120,5 ^{c, d}
CC	66,2 $\pm$ 9,2 ^{a, e, f}	56,6 $\pm$ 12,5 ^{b, d, f}	39,1 $\pm$ 14,7 ^{d, e}

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. a $\neq$ G1 jejum; b $\neq$ G2 jejum; c $\neq$ G3 jejum; d $\neq$ G1 alimentado; e $\neq$ G2 alimentado; f $\neq$ G3 alimentado. (ANOVA-one way; Kruskal-Wallis, *post-hoc* Dunn; $p \leq 0,05$).

Figura 5 - Altura das vilosidades (μm)

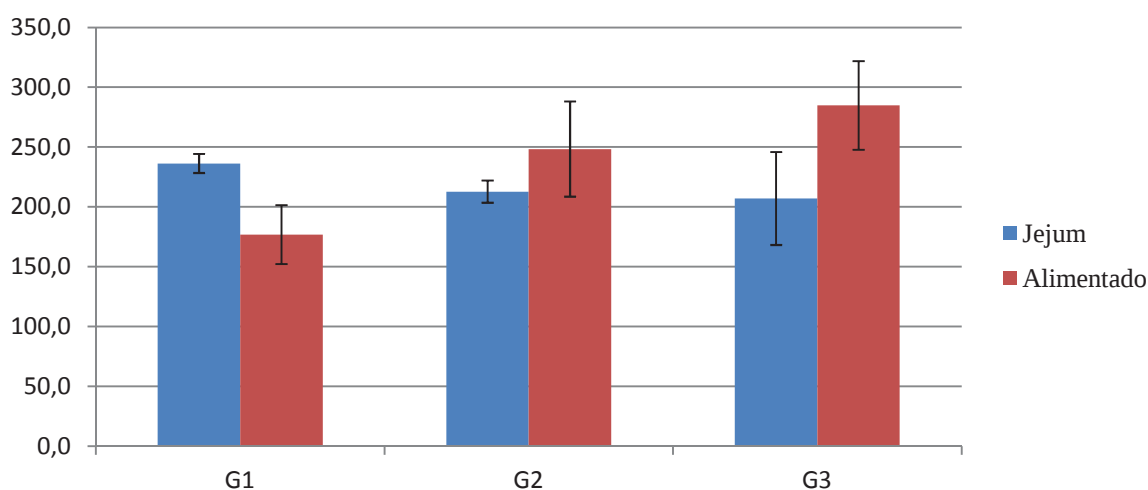


3.4. *Espessura da tunica muscularis*

As médias de espessura da *Tunica muscularis* podem ser observadas na *Figura 6*. Houve diminuição da espessura da camada muscular do intestino dos animais em jejum (G1 jejum = $236,2 \mu\text{m} \pm 7,9$; G2 jejum = $207,0 \mu\text{m} \pm 38,8$; G3 jejum = $248,3 \mu\text{m} \pm 39,7$), porém sem significância estatística ($P = 0,077$). No entanto, os grupos alimentados tiveram um aumento significativo da espessura da camada muscular ($P \leq 0,001$), sendo a espessura da *tunica* menor no grupo G1 alimentado ($212,7 \mu\text{m} \pm 9,2$) e maior no G3 alimentado ($284,7 \mu\text{m} \pm 36,9$).

Todos os grupos (G1, G2 e G3) apresentam diferenças significativas na espessura da camada muscular entre jejum e alimentação ($P = <0,001$).

Figura 6 - Espessura da camada muscular (μm)



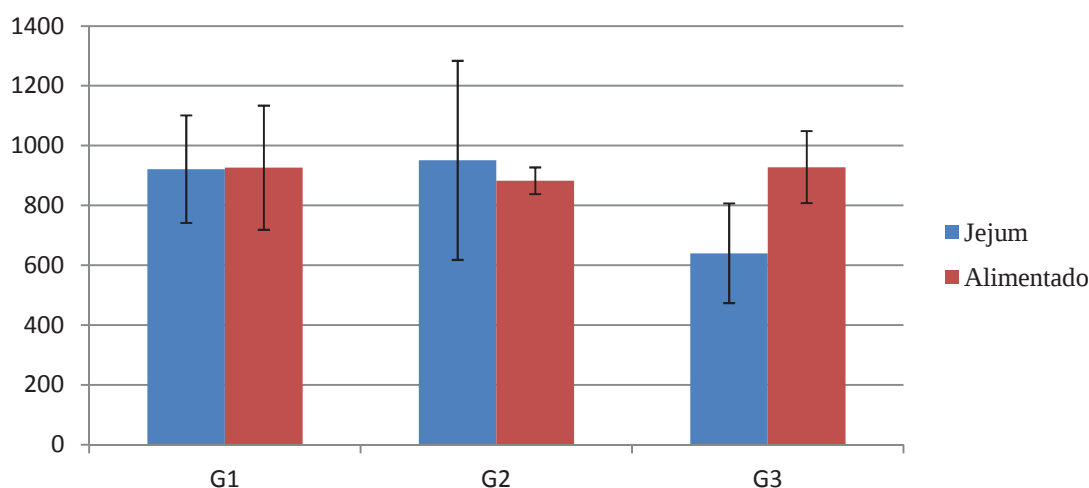
3.5. *Perímetro do tubo intestinal*

As médias de perímetro intestinal podem ser observadas na *Figura 7*. As diferenças nos valores médios do perímetro do tubo intestinal entre os grupos de tratamento G1 jejum ($921,4 \mu\text{m} \pm 179,6$) e G2 jejum ($950,8 \mu\text{m} \pm 332,7$), quando comparados ao grupo G3 jejum ($640,1 \mu\text{m} \pm 166,4$), foram maiores do que o esperado por acaso ($P = <0,001$). Pode-se notar que o perímetro médio do intestino do grupo G3 jejum é menor do que dos outros grupos em jejum. Não houve significância estatística quando comparados os perímetros dos grupos G1 jejum e G2 jejum.

Nos animais alimentados, houve diferença significativa de perímetro do tubo intestinal entre os grupos G1 alimentado ($926,2 \mu\text{m} \pm 207,5$) e G3 alimentado ($928,2 \mu\text{m} \pm 120,5$) para o grupo G2 alimentado ($882,8 \mu\text{m} \pm 44,5$) ($P = 0,006$).

Quando comparados entre si, tanto os subgrupos G1 jejum ($921,4 \mu\text{m} \pm 179,6$) e G1 alimentado ($926,2 \mu\text{m} \pm 207,5$) quanto os subgrupos G2 jejum ($950,8 \mu\text{m} \pm 332,7$) e G2 alimentado ($882,8 \mu\text{m} \pm 44,5$), não há diferenças significantes. Porém, quando comparados os subgrupos G3 jejum ($640,1 \mu\text{m} \pm 166,4$) e G3 alimentado ($928,2 \mu\text{m} \pm 120,5$), estes apresentam diferença significativa ($P = <0,001$) no perímetro do intestino.

Figura 7 - Perímetro do Intestino (μm)



3.6. Contagem de células caliciformes

O número médio de células caliciformes por vilosidade sofreu uma diminuição tanto nos animais em jejum quanto nos alimentados (*Figura 8*), porém, só há significância estatística na diferença de quantidade de células caliciformes nos grupos alimentados ($P \leq 0,001$).

Tanto os subgrupos G1 jejum ($51,1 \text{ células por vilosidade}^* \pm 9,5$) e G1 alimentado ($66,2 \text{ cpv}^* \pm 9,2$) quanto os subgrupos G2 jejum ($44,5 \text{ cpv}^* \pm 6,1$) e G2 alimentado ($56,6 \text{ cpv}^* \pm 12,5$), apresentaram diferenças significativas na quantidade de células caliciformes entre os tratamentos jejum e alimentado ($P < 0,001$), enquanto não houve diferenças significativas entre os tratamentos do grupo G3 (jejum = $41,4 \text{ cpv}^* \pm 3,1$; alimentado = $39,1 \text{ cpv}^* \pm 14,7$) ($P = 0,552$).

Além da diminuição do número de células caliciformes no grupo G3 quando comparado aos outros, também pode se observar uma diminuição na quantidade de muco por célula caliciforme nos subgrupos alimentados (*Figura 9*).

Figura 8 - Número de células caliciformes

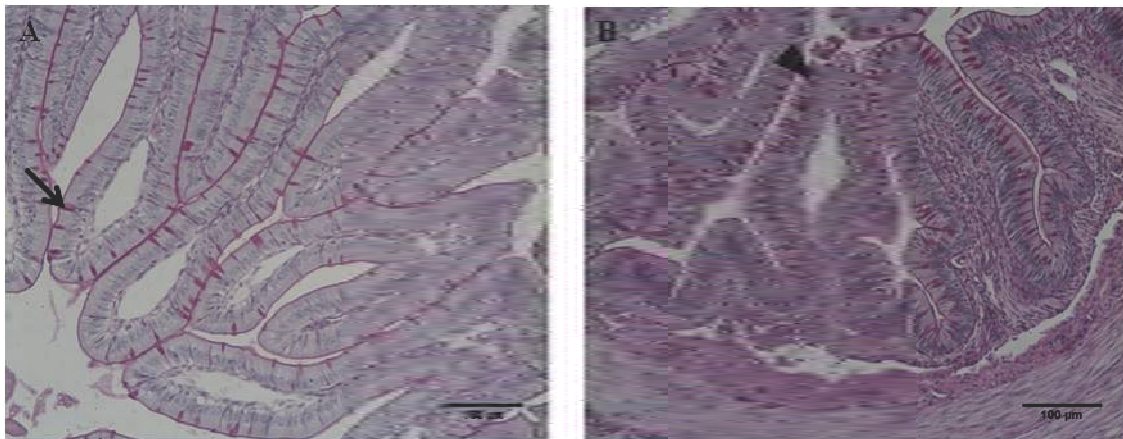
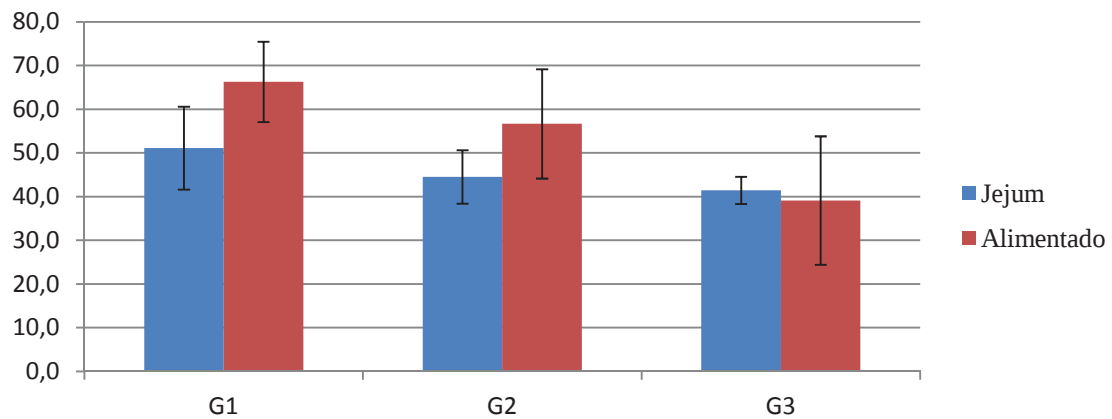


Figura 9 – Cortes da porção média do intestino delgado de teiús *Tupinambis merianae* em aumento médio. Seta = célula caliciforme Alimentado G3; Cabeça de seta = célula caliciforme Jejum G3. A = alimentado G3; B = jejum G3. Técnica PAS.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A estrutura morfológica do intestino delgado do lagarto *Tupinambis merianae* tem grande semelhança à estrutura intestinal de mamíferos (LEAKE, L.D., 1975; WHEATER et al., 1982; PANIAGUA, R. & NISTAL, M., 1983; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004; KÜHNEL, W., 2005; JUNQUEIRA, 2005; ROSS E PAWLINA, 2006). Observamos que o epitélio da base das vilosidades tem uma conformação pseudoestratificada nos animais em jejum de todos os grupos. O mesmo resultado foi observado por Stark & Beese (2001), Lignot et al (2005), Lignot et al (2009^a) em cobras píton. Os autores acreditam que, assim como o epitélio da bexiga urinária de mamíferos, o epitélio da mucosa intestinal combina a características de um epitélio de transição com o surgimento de um epitélio pseudoestratificado.

Embora a massa corpórea dos teiús não tenha variado significativamente entre os grupos experimentais, a massa do intestino dos animais após a alimentação sofreu um aumento significativo em todos os grupos. Este aumento pós-prandial da massa do intestino está associado ao intumescimento das células da mucosa intestinal, a partir da condição pseudo estratificada comentada acima, devido ao aumento da pressão sanguínea e linfática na lâmina própria do intestino, além da deposição de lipídeos (CAREY, 1995; STARCK, 1996; DURNEL-ERB et al., 2001; STARCK e BEESE, 2002; SECOR, 2005). O intestino sofre um aumento do peso após a alimentação devido ao crescimento da mucosa intestinal. O aumento da mucosa intestinal pode ocorrer por hiperplasia ou por inchaço, no entanto, neste estudo não foram feitos testes para determinar a causa do crescimento da mucosa intestinal. Este padrão de variação da massa intestinal associado à ingestão do alimento é comumente encontrado em outros grupos de vertebrados (CAREY, 1995; STARCK, 1996; DURNEL-ERB et al., 2001; STARCK e BEESE, 2002; SECOR, 2005).

Como foi demonstrado em mamíferos por Carey (1990; 1995), a atrofia do intestino durante a hibernação está principalmente relacionada com a diminuição da altura dos vilos, e consequentemente, diminuição da mucosa intestinal. Esta mesma resposta foi observada para *T. merianae* após o jejum sazonal e ao jejum prolongado de 60 dias (G3) e pode representar um importante ajuste em termos energéticos. Seguindo-se a ingestão do alimento, todos os animais, independente do tratamento, apresentaram um aumento considerável das vilosidades (de até 22,5%) que ocorreu de forma bastante rápida (ca. 30 h pós-prandial). Este aumento das vilosidades coincide com o pico do aumento metabólico pós-prandial observado em *T.*

merianae, porém, sua contribuição para o custo total da digestão é provavelmente baixo como sugerido por Starck e Beese (2001). O aumento das vilosidades em *T. merianae* teve magnitude menor do que aquele observado em outros répteis de alimentação infrequente, como serpentes por exemplo (). Esta diferença talvez esteja relacionada à biologia alimentar de *T. merianae*, o qual pode ser considerado um forrageador bastante oportunista que ingere itens alimentares com relativa frequência quando ativos. Desta forma, em termos energéticos, talvez não seja vantajoso para os teiús exibirem uma resposta intestinal tão profunda em resposta à variação a tomada de alimento como àquela observada em animais de alimentação infrequente (ver Starck e Beese, 2001; Lignot et al, 2005; Cramp et al, 2005; Secor, 2001).

A camada muscular do intestino delgado dos teiús em jejum do grupo G1 foi significativamente mais espessa do que observado após a alimentação. Embora esta alteração não tenha sido observada em serpentes (LIGNOT et al., 2005; STARCK e BEESE, 2001; STARCK e BEESE, 2002), Cramp et al (2005) reporta uma resposta similar em rãs durante a estivação. Tanto para as rãs (Cramp et al., 2005) quanto para os teiús, a alteração da camada muscular parece estar relacionada à redução do tamanho do epitélio intestinal (observado durante o período de inatividade), o que resulta em um rearranjo da musculatura intestinal para um estado mais compacto.

Nos demais grupos, a espessura da muscular foi significativamente aumentada após a alimentação sugerindo a ocorrência de ajustes na camada muscular em resposta ao primeiro evento alimentar pós-dormência (G2) e mesmo em resposta ao despertar da dormência *per se*, ainda que o animal não seja alimentado (G3). No presente, o significado funcional destas alterações é incerto.

Quanto aos valores de perímetro do tubo intestinal, estes apresentaram uma redução significativa de tamanho nos animais do grupo G3 em jejum, quando comparado aos demais grupos em jejum. Os grupos G1 e G2, em jejum, não apresentaram grandes diferenças no perímetro intestinal. Assim, os teiús parecem ser capazes de manter o perímetro intestinal durante todo o período de dormência, porém, havendo a persistência do jejum após o despertar (G3), este perímetro diminui rapidamente. É possível que a manutenção do perímetro intestinal seja viável durante o período de dormência quando o metabolismo encontra-se significativamente reduzido. Porém, após o despertar da dormência e retorno da taxa metabólica a níveis mais elevados, um jejum extra de 60 dias (G3) pode ter causado uma

depleção das reservas energéticas a ponto de inviabilizar a manutenção do perímetro intestinal.

A quantidade de células caliciformes por vilosidade para os teiús em jejum foi pequena e não diferiu entre os diferentes grupos experimentais. Após a alimentação, o número destas células foi consideravelmente aumentado, provavelmente devido à hiperplasia do tecido e migração das células das criptas intestinais para as vilosidades (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Esta resposta deve estar associada ao importante papel das células caliciformes durante a digestão responsáveis pela produção do mucinogênio (muco), o qual lubrifica e protege o epitélio intestinal contra atrito causado pela passagem do bolo alimentar e contra a ação enzimática (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; ROSS & PAWLINA, 2008). Por outro lado, a diminuição no número das células caliciformes durante o jejum indica que a manutenção desse tipo de célula talvez não seja vantajosa, do ponto de vista energético, durante os períodos nos quais os animais não estejam se alimentando.

Em resumo, as alterações morfohistológicas observadas no intestino delgado de *T. merianae* parecem refletir um compromisso entre a variação na demanda associada à alimentação e os custos de manutenção (ou regulação) do trato digestório. Este balanço inclui tanto uma variação de curto prazo, associada à ingestão do alimento durante o período de atividade, quanto uma variação circanual associada ao padrão de atividade sazonal de *T. merianae*. Enquanto a variação de natureza sazonal é mais marcante e assemelha-se àquela observada em outros répteis de alimentação bastante infrequente, como as serpentes, a variação associada à alimentação/jejum durante o período de atividade é menos acentuada e congruente com uma alimentação mais frequente como, de fato, observada em *T. merianae*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, A. S. Estivation in South-American Amphibians and Reptiles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 28(11-12), 1241-1247, 1995.
- Abe, A. S.; Johansen, K. Ventilation and Gas-Exchange in the Tegu Lizard *Tupinambis Tequixin* at Different Temperatures. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 14(6), 449-449, 1981.
- Andrade, D. V.; Brito, S. P.; Toledo, L. F.; Abe, A. S. Seasonal changes in blood oxygen transport and acid–base status in the tegu lizard, *Tupinambis merianae*. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. 140, 197–208, 2004.
- Andrade, D. V.; Toledo, L. F.; Brito, S. P.; Milsom, W. K.; Abe, A. S. Effects of Season, Temperature, and Body Mass on the Standard Metabolic Rate of Tegu Lizards (*Tupinambis merianae*). **Physiological and Biochemical Zoology** 81(2), 158–164, 2008.
- Ávila-Pires, T. C. S. Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata). **Zoologische Verhandelingen Leiden**, 1995.
- Bauwens, D.; Garland, T.; Castilla, A. M.; Van Damme, R. Evolution of Sprint Speed in Lacertid Lizards: Morphological, Physiological and Behavioral Covariation. : **Evolution**, 49(5), 848-863, 1995.
- Carey, H. V. **Gut Feelings About Hibernation**. News in Physiological Sciences, 1055-61, 1995.
- Cassidy, M. M.; Lightfoot, F.G.; Grau, L.E.; Story, J.A.; Kritchevsky, D; Vahouny, G. Effect of chronic intake of dietary fibers on the ultrastructural topography of rat jejunum and colon: a scanning electron microscopy study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 34, 218-228, 1981.
- Clench, M. H.; Mathias, J. R. Motility responses to fasting in the gastrointestinal tract of three avian species. **The condor**, 97, 1041-1047, 1995.
- Cox, C. L.; Secor, S. M. Matched regulation of gastrointestinal performance in the Burmese python, *Python molurus*. **The Journal of Experimental Biology**, 211, 1131-1140, 2008.
- Cramp, R. L.; Franklin, C. E.; Meyer, E. A. The impact of prolonged fasting during aestivation on the structure of the small intestine in the green-striped burrowing frog, *Cyclorana alboguttata*. **Acta Zoologica**, 86, 13-24, 2005.
- Dawson, W. R.; Marsh, R. L.; Yacoe, M. E. Metabolic adjustments of small passerine birds for migration and cold. **AJP - Regu Physiology**, 245 (6), 755-767, 1983.
- Dunel-Erb, S.; Chevalier, C.; Laurent, P.; Bach, A; Decrock, F.; Le Maho, Y. Restoration of the jejunal mucosa in rats refed after prolonged fasting. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, 129, 933-947, 2001.

- Habold, C.; Chevalier, C.; Dunel-Erb, S.; Foltzer-Jourdainne, C.; Le Maho, Y.; Lignot, J-H. Effects of Fasting and Refeeding on Jejunal Morphology and Cellular Activity in Rats in Relation to Depletion of Body Stores. **Scand J Gastroenterol**, 39, 531–539, 2004.
- Jenssen, T. A.; Congdon, J. D.; Fischer, R. U.; Estes, R.; Kling, D.; Edmonds, S.; Berna, H. Behavioural, thermal, and metabolic characteristics of a wintering lizard (*Anolis carolinensis*) from South Carolina. **Functional Ecology**, 10, 201-209, 1996.
- Junqueira, L. C. U.; Junqueira, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. Editora Santos, São Paulo / Brasil, 1983.
- Kiefer, M. C.; Sazima, I. Diet of juvenile tegu lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae) in southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, 23, 105-108, 2002.
- Klein, W.; Perry, S. F.; Abe, A. S.; Andrade, D. V. Metabolic response to feeding in *Tupinambis merianae*: Circadian rhythm and a possible respiratory constraint. **Physiological and Biochemical Zoology**, 79(3), 593-601, 2006.
- Kühnel, W. **Citologia, histologia e anatomia microscópica**. Artmed, Porto Alegre / Brasil, 2005.
- Leake, L. D. **Comparative Histology: An introduction to the microscopic structure of animals**. Academic Press, Londres / Inglaterra, 1975.
- Lignot, J-H., Helmstetter, C., Secor, S. M. Postprandial morphological response of the intestinal epithelium of the Burmese python (*Python molurus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 141, 280 – 291, 2005.
- Lignot, J-H., Helmstetter, C., Reix, N., T’Flaschebba, M., Pope, R. K., Secor, S. M., Le Maho, Y. Functional Changes with Feeding in the Gastro-Intestinal Epithelia of the Burmese Python (*Python molurus*). **Zoological Science** 26(9):632-638. 2009^a.
- Lignot, J-H., Helmstetter, C., Pope, R. K., T’Flaschebba, M., Secor, S. M. The effects of feeding on cell morphology and proliferation of the gastrointestinal tract of juvenile Burmese pythons (*Python molurus*). **Canadian Journal of Zoology**, 87(12): 1255-1267, 10.1139/Z09-110. 2009^b.
- Martins, M. J.; Hipólito-Reis, C.; Azevedo, I. Effect of fasting on rat duodenal and jejuna microvilli. **Clinical Nutrition**, 20(4), 325-331, 2001.
- Milsom, W. K.; Andrade, D. V.; Brito, S. P.; Toledo, L. F.; Wang, T.; Abe, A. S. Seasonal Changes in Daily Metabolic Patterns of Tegu Lizards (*Tupinambis merianae*) Placed in the Cold (17°C) and Dark. **Physiological and Biochemical Zoology**. 81(2):165 – 175. 2008.
- Overgaard, J.; Andersen, J. B.; and Wang, T. The effects of fasting duration on the metabolic response to feeding in *Python molurus*: An evaluation of the energetic costs

- associated with gastrointestinal growth and upregulation. **Physiological and Biochemical Zoology**, 75(4), 360-368, 2002.
- Paniagua, R.; Nistal, M. **Introducción a la histología animal comparada**. Labor Universitaria, Calabria / Barcelona, 1983.
- Pough, F. H. Lizard Energetics and Diet. **Ecology**, 54(4) 837-844, 1973.
- Secor, S. M. Evolutionary and cellular mechanisms regulating intestinal performance of amphibians and reptiles. **Integrative and Comparative Biology**, 45(2), 282-294, 2005.
- Secor, S. M. Regulation of digestive performance: a proposed adaptive response. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, 128, 565-577, 2001.
- Secor, S. M.; Diamond, J. Maintenance of Digestive Performance in the Turtles *Chelydra serpentina*, *Sternotherus odoratus*, and *Trachemys scripta*. **Copeia**, 1, 75-84, 1999.
- Seebacher, F. A review of thermoregulation and physiological performance in reptiles: what is the role of phenotypic flexibility? **Journal of Comparative Physiology B Biochemical Systemic and Environmental Physiology**, 175(7), 453-461, 2005.
- Sherman, P.; Forstner, J.; Roomi, N.; Khatri, I.; Forstner, G. Mucin depletion in the intestine of malnourished rats. **American Journal of Gastrointestinal Liver Physiology**. 248: G418-G423, 1985.
- Souza, S. C. R.; Carvahio, J. E.; Abe, A. S.; Bicudo, J. E. P. W.; Bianconcini, M. S. C. Seasonal metabolic depression, substrate utilisation and changes in scaling patterns during the first year cycle of tegu lizards (*Tupinambis merianae*). **The Journal of Experimental Biology** 207, 307-318 307, 2004.
- Starck J. M. Structural flexibility of the digestive system of tetrapods—Patterns and processes at the cellular and tissue level. In: Starck JM, Wang T, editors. **Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates**. Enfield: Science Publishers. pp 175–200, 2005.
- Starck, J. M.; Beese, K. Structural flexibility of the intestine of Burmese python in response to feeding. **Journal of Experimental Biology**, 204(2), 325-335, 2001.
- Starck, J. M.; Beese, K. Structural flexibility of the small intestine and liver of garter snakes in response to feeding and fasting. **Journal of Experimental Biology**, 205(10), 1377-1388, 2002.
- Stevens, C. E.; Hume, I. D. **Comparative physiology of the vertebrate digestive system**. New York : Cambridge University Press, 1995.
- Van Damme, R.; Bauwens, D.; Verheyen, R. F. The Thermal Dependence of Feeding Behaviour, Food Consumption and Gut-Passage Time in the Lizard *Lacerta vivipara* Jacquin. **Functional Ecology**, 5(4), 507-517, 1991.

- Vanzolini, P. E.; Ramos-costa, A. M. M.; Vitt, L. J. **Répteis das caatingas**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1980.
- Webb, J. K.; Shine, R. Using thermal ecology to predict retreat-site selection by na endangered snake species. **Biological Conservation**, 86(2), 233-242, 1998.
- Wheater, P. R.; Burkitt, H. J.; Daniels, V. G. **Histologia funcional: texto e atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
- Winck, G. R.; Cechin, S. Z. Hibernation and emergence pattern of *Tupinambis merianae* (Squamata : Teiidae) in the Taim Ecological Station, southern Brazil. **Journal of Natural History**, 42(3-4), 239-247, 2008.
- Yamauchi , K.; Tarachai, P. Changes in intestinal villi, cell area and intracellular autophagic vacuoles related to intestinal function in chickens. **British Poultry Science**, 41, 416 – 423., 2000.
- Zug, G. R.; Vitt, L. J.; Caldwell, J. P. **Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**. London : Academic Press Limited, 1993.