

PRISCILA IZABEL SANTOS DE TÓTARO

**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA NA MORFOGÊNESE DO PÂNCREAS DO  
GAMBÁ *Didelphis aurita* DURANTE O DESENVOLVIMENTO  
INTRAMARSUPIAL**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013**

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

T

T717m  
2013

Tótaro, Priscila Izabel Santos de, 1987-  
Morfologia e morfometria na morfogênese do pâncreas  
do gambá *Didelphis aurita* durante o desenvolvimento  
intramarsupial / Priscila Izabel Santos de Tótaró. – Viçosa,  
MG, 2013.

xi, 57 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Cláudio César Fonseca.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Morfologia (Animais). 2. Pâncreas. 3. Gambá - Embrião.  
4. *Didelphis aurita*. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 573.377

PRISCILA IZABEL SANTOS DE TÓTARO

**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA NA MORFOGÊNESE DO PÂNCREAS DO  
GAMBÁ *Didelphis aurita* DURANTE O DESENVOLVIMENTO  
INTRAMARSUPIAL**

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

Aprovada: 15 de março de 2013.



Laércio dos Anjos Benjamin



Isabel R. S. Costa Maldonado



Cláudio César Fonseca

(Orientador)

*“Pois em verdade vos digo, se tivésseis a fé do tamanho de um grão de mostarda, diríeis a esta montanha: Transporta-te daí para ali e ela se transportaria, e nada vos seria impossível.”*

S. Mateus, cap. XVII, vv. 14 a 20.

***Dedico aos que assumiram o compromisso  
divino de me dar a vida e trilhar comigo o meu  
caminho: meus pais Geraldo e Izabel.***

***Á querida Vovó Darci.***

***A Lyn, irmã que eu amo.***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, em cujas mãos coloco, todos os dias, as minhas decisões e o meu destino, por estar sempre presente, em cada pequena coisa, em cada aprendizado, e em todas as bênçãos já derramadas sobre mim.

Aos meus pais Geraldo e Izabel que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Sem vocês eu nada seria.

A minha amada Vovó Darci, que me criou com um amor que eu nunca vi igual.

Ao meu avô José, que perdi muito cedo, mas cuja memória nunca se apagou, pelo exemplo que me dá força nos momentos difíceis. Sei que você ora a Deus por mim.

A minha irmã Ana Cecília por fazer parte da minha história. O caminho que trilhamos juntas é tão especial que ela chegou ao mundo onze meses depois de mim, para não me deixar sozinha. Obrigada por permitir que nossa relação e a nossa união amadureçam a cada dia.

Ao Felipe pelo apoio, pelos bons momentos, pela felicidade e pelo aprendizado que me proporcionou. Pelo amor e generosidade que me ajudam na tentativa diária de ser uma pessoa melhor.

Aos amigos Luiz Gustavo e Philipe pelos longos anos de amizade inabalável e amor fraternal.

À tia Julinha por todo o bem que me quer.

A minha prima Juliana pela torcida e por ser uma das pessoas que mais acreditam em mim.

Às amigas: Andressa, Bruna e Talita pelos laços que criamos e dos quais me orgulho todos os dias.

Aos incomparáveis Jansen, Felipe Eller, Joel e Eulálio por tornarem os meus dias (e noites) mais alegres, bonitos e especiais.

Aos eternos amigos de Viçosa: Felipe Cardoso, Mateus, Lica, Carol Minete, Letícia Minette, Aline Daniela, Paulo, Guilherme, e Leonardo Pimenta por fazerem parte dos melhores anos da minha vida.

A Wiviane, amiga que fiz no mestrado, pessoa especial e generosa que tornou esta etapa ainda mais importante e mostrou que a afinidade é algo inexplicável.

Ao queridíssimo Zizo, um anjo da guarda que cuida de mim desde o primeiro dia em Viçosa.

A excelente e maravilhosa amiga Vanessa Valente pelo seu imenso coração e sua boa vontade sem tamanho. É muito importante saber que posso sempre contar com o seu “algo mais.”

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural: Stéphanie Valente, Marli Cupertino, Tatiana Prata, Ana Cláudia Ferreira, Carolina Torre Morais, Suzana Puga,

Ao meu orientador, professor Cláudio Fonseca que mesmo em meio a tantas obrigações conseguiu estar presente e ser prestativo em todos os momentos. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos, pela exigência

À querida professora Izabel Regina Santos Costa Maldonado por todo o suporte dado nos momentos em que eu precisei. Pela atenção maternal, pelo cuidado solidário e pela enorme contribuição intelectual que deu à minha formação.

À professora Sirlene pela co-orientação, pela boa vontade, disposição em ajudar e pelos ensinamentos importantes que foram essenciais na elaboração deste trabalho.

Ao professor Laércio, que eu tive o imenso prazer de conhecer nas disciplinas VET 600 e VET 792, por aceitar participar da banca examinadora e por ter se mostrado tão disposto a participar da avaliação deste trabalho.

Ao Professor José Lino Neto pelo projeto de bolsa REUNI passado a mim.

Aos professores do Departamento de Biologia Geral da UFV, pelos ensinamentos durante o curso.

Aos amigos da secretaria do Departamento de Biologia Geral, Beth e Diana pela atenção e carinho em todos os momentos em que eu precisei de alguma ajuda.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso, e pelo crescimento profissional e pessoal.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao programa REUNI pela concessão da bolsa de pesquisa.

Aos técnicos do Laboratório de Histopatologia do DVT: Cláudio e Adão pela ajuda fundamental em todas as etapas do processamento histológico.

A todas as pessoas envolvidas nas duras coletas e no difícil transporte dos animais: Liliane, Eduarda, Luíza, Guta, e Tio Pedro por permitirem armadilhas em suas casas. Em especial a Lili e a Duda que trabalharam junto comigo, sem medo dos animais e com muita boa vontade. Sem vocês este trabalho não existiria.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>2</b>
2.1. O GAMBÁ <i>DIDELPHIS AURITA</i> .....	2
2.2. CICLO REPRODUTIVO DO GÊNERO <i>DIDELPHIS</i> .....	3
2.3. PÂNCREAS .....	4
2.4. DESENVOLVIMENTO DO PÂNCREAS.....	6
2.5. DESENVOLVIMENTO DO PÂNCREAS NOS MARSUPIAIS.....	6
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>8</b>
3.1. OBJETIVOS GERAIS .....	8
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	8
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>9</b>
<b>ARTIGO I.....</b>	<b>14</b>
DESENVOLVIMENTO PÓS NATAL DO PÂNCREAS DO GAMBÁ <i>DIDELPHIS AURITA</i> .....	14
RESUMO .....	14
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
2.1. Animais .....	17
2.2. Eutanásia e análises biométricas .....	18
2.3. Grupos Experimentais .....	18
2.4. Processamento histológico .....	19
2.5. Análises estatísticas .....	19
3. RESULTADOS .....	19
3.1 Parâmetros biométricos.....	19
3.2. Morfologia externa e interna dos animais.....	20
3.3. Parâmetros histológicos pancreáticos.....	23
4. DISCUSSÃO .....	28
5. CONCLUSÕES .....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
<b>ARTIGO II .....</b>	<b>35</b>
MORFOMETRIA E DIÂMETRO DAS ILHOTAS DAS REGIÕES ANATÔMICAS DO PÂNCREAS DO GAMBÁ <i>DIDELPHIS AURITA</i> DURANTE O DESENVOLVIMENTO INTRAMARSUPIAL .....	35
RESUMO .....	35
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	40
2.1. Animais .....	40

2.2. Eutanásia e análises biométricas .....	40
2.3. Grupos Experimentais .....	41
2.4. Processamento histológico .....	41
2.5. Obtenção das imagens e morfometria .....	41
2.6. Parâmetros Analisados.....	42
2.7. Análises estatísticas .....	42
3. RESULTADOS .....	43
3.1. Parâmetros morfométricos do pâncreas do gambá <i>Didelphis aurita</i> durante o desenvolvimento intramarsupial.....	43
3.2. Componentes das três regiões do pâncreas do gambá <i>Didelphis aurita</i> durante o desenvolvimento intramarsupial.....	44
3.3. Diâmetro das ilhotas do pâncreas do gambá <i>Didelphis aurita</i> durante o desenvolvimento intramarsupial.....	46
4. DISCUSSÃO .....	50
5. CONCLUSÕES .....	53
6. REFERÊNCIAS .....	54

## RESUMO

TÓTARO, Priscila Izabel Santos de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Morfologia e morfometria na morfogênese do pâncreas do gambá *Didelphis aurita* durante o desenvolvimento intramarsupial.** Orientador: Cláudio C. Fonseca. Coorientadora: Sirlene Souza Rodrigues Sartori.

Diversos estudos sobre os marsupiais relatam que o desenvolvimento de vários de seus órgãos internos, se completa depois do nascimento, durante o período em que os filhotes permanecem no marsúpio. Isto acontece com os órgãos do aparelho digestório, incluindo o pâncreas. Este estudo relatou os aspectos morfológicos relevantes encontrados no pâncreas do gambá-de-orelha-preta *Didelphis aurita* durante o seu desenvolvimento intramarsupial. Foram utilizados 12 filhotes provenientes de 3 fêmeas diferentes, capturadas em pequena região de mata situada na Vila Gianetti, na UFV. Os filhotes foram retirados da bolsa e divididos em 3 grupos de acordo com o seu comprimento CR médio: 10, 50, e 100mm. Após a eutanásia dos animais, foi realizada a biometria corporal, a pesagem e a medição do pâncreas. Com relação aos animais que mediam 10mm de comprimento CR e tinham, portanto, poucas horas de vida intramarsupial, o pâncreas pôde ser descrito como visivelmente imaturo, dada a ausência de ácinos e ilhotas, estruturas típicas do órgão adulto, e embora ambos os componentes endócrino e exócrino estivessem presentes, o aspecto que mais se destacou foi a presença de ductos primitivos com diâmetro e comprimento bastante grandes e a ocorrência de vasos sanguíneos, muito abundantes, com eritrócitos nucleados em seu interior. Nos indivíduos medindo em média 50mm as análises histológicas revelaram a presença dos componentes exócrinos arranjados em ácinos ainda em desenvolvimento e das células endócrinas já arranjadas em ilhotas (embora também estivessem presentes na forma de pequenos grupos ou isoladas). Os ductos assumiram um aspecto similar ao visto no adulto, com um ducto centro-lobular maior e vários outros ductos menores, próximos aos ácinos. A presença de tecido conjuntivo e a divisão do órgão em lóbulos se tornaram mais evidentes nesse estágio. Nos filhotes que mediam em média 100mm, se encontrando no terço final da gestação externa, a histologia do pâncreas mostrou a presença de ácinos mais bem estruturados e com lúmens relativamente menores. As ilhotas possuíam diâmetro notavelmente maior e a presença de tecido conjuntivo delimitando-as era mais evidente neste estágio. A morfometria mostrou variações consideráveis na proporção dos componentes pancreáticos entre as etapas do

desenvolvimento intramarsupial. Esta diferença está de acordo com o encontrado na literatura para outras espécies *Didelphis*, e indicam que de fato o pâncreas sofre modificações morfológicas durante o período de gestação externa. O diâmetro das ilhotas pancreáticas não variou entre os terços médio e final da gestação externa, mas foi significativamente diferente nas três regiões do pâncreas dos animais dos dois grupos, indicando o crescimento desigual dessa estrutura, entre as três regiões anatômicas do pâncreas, durante o desenvolvimento intramarsupial.

## ABSTRACT

TÓTARO, Priscila Izabel Santos de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **Morphology and morfometry in morphogenesis of pancreas during the intramarsupial period in the opossum *Didelphis aurita***. Adviser: Cláudio C. Fonseca. Co-adviser: Sirlene Souza Rodrigues Sartori.

Several studies have reported that marsupials development of various internal organs, is completed after birth, during the time the puppies remain in the pouch. This happens with the organs of the digestive system, including the pancreas. This study reported the morphological material found in the pancreas of the possum *Didelphis aurita* during its development intramarsupial. We used 12 puppies from 3 different females, captured in a small area of woodland located in Vila Gianetti at UFV. The pups were removed from the bag and divided into 3 groups according to their average CR length: 10, 50 and 100mm. After euthanasia, Biometry was performed body, weighing and measuring of the pancreas. With regard to animals which measured 10mm CR and therefore had few hours of life intramarsupial, the pancreas could be described as visibly immature, given the absence of acini and islets, typical structures of the adult body, and although both components endocrine and exocrine were present, the aspect that stood out was the presence of primitive ducts with diameter and length and the occurrence of very large blood vessels, very abundant, with nucleated erythrocytes inside. In individuals measuring 50mm on average histological analyzes revealed the presence of components arranged in exocrine acini and still in development of endocrine cells into islets have arranged (although also be present in the form of small groups or isolated). The ducts have assumed an aspect similar to that seen in adults, with a duct-lobular largest center and several other smaller ducts, close to the acini. The presence of tissue and organ in the division lobes became more evident at this stage. In chicks measured on average 100mm, meeting at the end of gestation outside the histology showed the presence of pancreatic acini better structured and relatively smaller lumens. The islets had significantly greater diameter and the presence of delimiting the tissue was more evident at this stage. Morphometry showed considerable variation in the proportion of the components between the stages of pancreatic development intramarsupial. This difference is consistent with findings in the literature for other species *Didelphis* and indicate that in fact the pancreas undergoes morphological changes during pregnancy outside. The diameter of the pancreatic islets did not vary between the middle and end of pregnancy outside, but was significantly different in the three regions of the pancreas

of animals in both groups, indicating the uneven growth of this structure among the three anatomical regions of the pancreas during development intramarsupial.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) é um marsupial com período de gestação intra-uterina de aproximadamente 12 dias. O gambá recém-nascido alcança o marsúpio da mãe, logo após o nascimento, onde continua o seu desenvolvimento aderido à papila mamária. Durante este período, que dura aproximadamente três meses, os filhotes têm como única alimentação o leite marsupial produzido pela mãe.

Os gambás recém-nascidos pesam aproximadamente 0,2g medem 12mm de comprimento, possuem uma aparência externa imatura e órgãos internos, como os pulmões (KRAUSE et al., 1973 e 1975; KRAUSE et al., 1976a), fígado (CUTTS et al., 1973; KRAUSE et al., 1975) e o canal alimentar (KRAUSE et al., 1976b, 1976c, 1977), incluindo o pâncreas (KING et al., 1978) apresentam características de desenvolvimento incompleto no momento do nascimento. Trabalhos realizados anteriormente abordaram aspectos relacionados exclusivamente aos componentes endócrinos do pâncreas adulto (THOMAS, 1938; MUNGER et al., 1965) ou à organogênese do pâncreas durante o período embrionário (pré-natal) (McCRADY, 1938).

King et al. (1978) descreveram o desenvolvimento pós-natal do pâncreas do gambá-norte-americano (*Didelphis virginiana*) durante as várias fases do período de vida intramarsupial, enfatizando a presença ou ausência dos componentes endócrino, exócrino e tubular do pâncreas nos diferentes estágios de desenvolvimento.

Além disso, Fonseca et al. (2002) conduziram um trabalho que objetivou medir o diâmetro das ilhotas do pâncreas do gambá *Didelphis albiventris* adulto, e Edwin (1982) quantificou o tecido endócrino do pâncreas de *Trichosurus vulpecula* através da quantificação das ilhotas pancreáticas de três diferentes regiões do órgão: cabeça (duodenal), corpo (ânulo) e cauda (esplênica).

O presente trabalho descreve morfológica e histologicamente o desenvolvimento pós-natal do pâncreas do gambá *Didelphis aurita*, buscando quantificar os componentes

do órgão, bem como comparar a sua frequência, e o diâmetro das ilhotas pancreáticas nas diferentes regiões anatômicas do pâncreas: duodenal (cabeça), do ânulo (corpo) e esplênica (cauda).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. O gambá *Didelphis aurita***

Os gambás pertencem ao Filo Chordata, Ordem Marsupialia e Família Didelphidae. A Ordem dos Marsupiais (Marsupialia) tem mais de 60 milhões de anos e é observada na América do Norte, América do Sul, na África e Austrália (McALESTER, 2002).

No Brasil, o gambá-de-orelha-preta, *Didelphis aurita*, e o gambá-de-orelha-branca, *Didelphis albiventris*, são espécies de marsupiais didelfídeos, extensamente distribuídas na Região Neotropical onde existe pelo menos uma das duas espécies em cada bioma (EMMONS e FEER, 1990).

A espécie *D. albiventris* possui um período gestacional de aproximadamente 12 dias. Os filhotes terminam seu desenvolvimento no marsúpio, sendo este período chamado de gestação externa (GE), com duração de 90 dias (SAMOTO et al., 2006).

A alimentação do gambá é composta de fontes animais, como insetos, pequenos mamíferos e pássaros, além de fontes vegetais, como frutas, folhas e sementes. Alguns autores relatam que esses animais ingerem uma proporção de 40% de sua dieta na forma de vegetais, e 60% na forma de fontes animais (STEVENS e HUME, 1995), sendo assim o gambá tem um espectro alimentar importante, pois o seu tubo digestivo é tipicamente onívoro, contendo glândulas salivares grandes, com exceção da parótida. O estômago do gambá se apresenta como uma estrutura dilatada do tubo digestivo cuja principal função é a liquefação do bolo alimentar e a digestão de alimentos. A mucosa gástrica apresenta grande quantidade de glândulas fúndicas e células entero-endócrinas.

Estas, junto com as células endócrinas dos intestinos e do pâncreas, contêm peptídeos específicos e aminas biogênicas que regulam a atividade digestiva (KRAUSE et al., 1985; STEVENS e HUME, 1995; FONSECA et al., 1998).

Os estudos experimentais constituem passos essenciais para a aplicação dos ensaios clínicos em humanos e dependem, sobretudo, da adequação experimental em animais. Segundo NOGUEIRA (1989), o gambá é um animal que permite o estudo da ontogênese de diferentes sistemas orgânicos e de aspectos fisiológicos importantes, o que faz dele objeto de pesquisas que buscam soluções para questões relacionadas à saúde humana.

Alguns trabalhos abordam aspectos morfológicos do tubo digestivo de marsupiais (TAKAGI et al., 1990; FONSECA et al., 1998; FONSECA et al., 2002; CHRISTENSEN, 2003; RIBEIRO, 2009), sendo a maioria referente ao pâncreas e à mucosa gástrica (COUTINHO et al., 1982; EDWIN, 1982; SOUZA et al., 1982; COUTINHO et al., 1984; KRAUSE et al., 1986; EDWIN, 1987; BARBOSA et al., 1987; KRAUSE et al., 1989 e FONSECA et al., 2002a).

## **2.2. Ciclo reprodutivo do gênero *Didelphis***

Poucas são as informações a respeito da história natural das espécies de *Didelphis* no Brasil (DAVIS, 1945; VALLE et al., 1981; STREILEN, 1981; STREILEIN, 1982 e FONSECA et al., 1982; ROCHA & MIRANDA, 1978).

Rigueira et al. (1987) realizaram um estudo com o gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*), em que 104 espécimes foram coletados aleatoriamente em diversos municípios do estado de Minas Gerais durante seis anos. Este trabalho mostrou a ocorrência de fêmeas em populações naturais, com filhotes na bolsa, nos meses de agosto a março, sendo que nos meses de fevereiro a março as fêmeas com filhotes na bolsa foram capturadas com menos frequência. De agosto a setembro todas as fêmeas

capturadas possuíam filhotes na bolsa, ao passo que nos meses de abril a junho nenhuma fêmea foi capturada com filhotes na bolsa, e são registradas fêmeas em estro nos meses de julho, outubro e novembro, e em anestro de fevereiro a junho (MASCARENHAS, 1980).

Com relação à biometria corporal do aparelho genital masculino de *D. albiventris* durante o ciclo reprodutivo anual, Nogueira (1985) salienta que o peso da próstata e das glândulas bulbo-uretrais (COWPER) laterais e intermediárias apresenta acentuado aumento ponderal de junho a janeiro, período considerado como o de reprodução. Considerando que as fêmeas apresentam estro a partir de julho, o período de acasalamento seria entre julho e janeiro (RIGUEIRA et al., 1987).

Hill (1918), capturando fêmeas de *D. marsupialis* entre julho e outubro no estado do Rio De Janeiro, encontrou fêmeas gestantes e fêmeas com filhotes na bolsa durante o mês de julho. Em agosto e setembro ele somente encontrou fêmeas com filhotes na bolsa. Estes achados são semelhantes aos encontrados para *D. albiventris* em Minas Gerais, o que demonstra haver um sincronismo na atividade reprodutiva destas duas espécies nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro (RIGUEIRA et al., 1987).

### **2.3. Pâncreas**

O pâncreas é uma glândula anfícrina que produz enzimas digestivas e hormônios. A porção exócrina, produtora do suco pancreático é organizada em ácinos, enquanto os hormônios são sintetizados na porção endócrina, que por sua vez é composta de grupamentos de células, denominados de ilhotas pancreáticas, ou de Langherans (**NOMENCLATURA ANATÔMICA VETERINÁRIA ILUSTRADA, 1999**).

Anatomicamente o pâncreas se divide em três regiões: duodenal (cabeça), ânulo (corpo) e esplênica (cauda). Histologicamente se assemelha a glândula parótida, da qual

se diferencia pela presença das ilhotas e das células centroacinares e pela ausência de ductos estriados.

Uma cápsula de tecido conjuntivo reveste o pâncreas e envia septos para o seu interior, separando-o em lóbulos. O pâncreas possui uma extensa rede capilar, essencial para o processo de secreção. O ácino pancreático exócrino é constituído por várias células serosas que circundam um lúmen. Estas células são polarizadas, com núcleo esférico, e são típicas células produtoras de proteína. O número de grânulos de zimogênio presentes em cada célula varia de acordo com a fase digestiva, sendo máxima em animais em jejum (EURELL e FRAPPIER, 2006).

Além de água e íons, o pâncreas exócrino secreta diversas proteinases, sendo esta secreção controlada principalmente por meio dos hormônios secretina e colecistoquinina, produzidos por células da mucosa intestinal. O estímulo do nervo vago aumenta a secreção pancreática (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

As ilhotas pancreáticas são microorgãos endócrinos localizados no pâncreas, onde são vistos como grupos arredondados de cordões de células imersos no tecido exócrino. A ilhota é separada do tecido exócrino por uma fina camada de tecido conjuntivo, e possui uma extensa rede de capilares. O tamanho das ilhotas varia em um mesmo indivíduo e entre espécies. O número total de ilhotas também é variável entre as regiões do pâncreas (EURELL e FRAPPIER, 2006).

Histologicamente, as ilhotas se apresentam menos coradas do que a porção exócrina do pâncreas. Colorações rotineiras permitem o reconhecimento de células acidófilas ( $\alpha$ ) e basófilas ( $\beta$ ). Por meio de colorações especiais e por imunocitoquímica, distinguem-se quatro tipos de células nas ilhotas: A (produtoras de glucagon), B (produtoras de insulina), D (produtoras de somatostatina) e PP (produtoras de polipeptídeo pancreático). (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004).

## **2.4. Desenvolvimento do pâncreas**

A organogênese do pâncreas compreende uma combinação de eventos de sinalização altamente complexos e coordenados. Redes transcricionais guiam o desenvolvimento do órgão desde os estágios iniciais até o estágio maduro (FONG e WRIGHT, 2011).

O pâncreas se origina do endoderma, na forma de brotos dorsal e ventral que se fundem para formar um único órgão. Mamíferos, aves, répteis e anfíbios possuem o pâncreas com o desenvolvimento embrionário similar (SLACK, 1995).

No pâncreas primitivo, as células endócrinas começam a se diferenciar antes das constituintes da porção exócrina, e a produção de diferentes hormônios pela mesma célula é freqüente nos estágios iniciais do desenvolvimento. Estudos de cultura in vivo mostraram que as células do pâncreas endócrino têm origem endógena e não na crista neural, como se acreditava anteriormente. Além disso, estudos observacionais sugerem fortemente que as porções endócrina e exócrina do pâncreas se originam do mesmo endoderma rudimentar, e o seu desenvolvimento seria dependente de estímulos provenientes do mesênquima adjacente (SLACK, 1995).

## **2.5. Desenvolvimento do pâncreas nos marsupiais**

O gambá *Didelphis albiventris* mede aproximadamente 10mm ao nascer termina o seu desenvolvimento no marsúpio, onde o leite materno é a principal fonte de nutrientes (COUTINHO et al., 1982). Sabe-se que o aparelho digestório, incluindo glândulas anexas, como o pâncreas, sofre um extensivo período de diferenciação e desenvolvimento durante o período pós natal do gambá *Didelphis virginiana* (KING et al., 1978).

O pâncreas do gambá *Didelphis virginiana* recém nascido consiste de uma região central formada por ilhotas circundadas por túbulos primitivos que terminam em

células proacinares. Quatro dias após o nascimento, ductos intralobulares, ácinos e células centroacinares definitivos são observados. Em adição às ilhotas centrais em expansão (ilhotas primárias), são observadas células endócrinas isoladas ou em pequenos grupos próximos ao epitélio dos ductos (KING et al., 1978).

Com a proliferação simultânea dos componentes exócrino e endócrino, a partir do sistema de ductos, a maioria das ilhotas observadas 24 dias após o nascimento, parece ser envolvida por uma camada simples de células acinares. Com o desenvolvimento dos ácinos e expansão dos ductos para a periferia, esta camada de células acinares se separa das ilhotas em desenvolvimento. Neste momento, a maior parte das ilhotas em desenvolvimento permanece no centro dos lóbulos para formar as ilhotas secundárias após 59 dias de desenvolvimento. À medida que o desenvolvimento progride os lóbulos se desenvolvem e se tornam mais evidentes, enquanto as células acinares se tornam preenchidas com grânulos de zimogênios (KING et al., 1978).

Com relação ao tamanho dos filhotes no interior do marsúpio, as ilhotas pancreáticas aparecem somente no estágio de 45mm. Entretanto, células positivas para aldeído-fucsina produtoras de insulina são observadas no estágio de 70mm. Antes disso as células marcadas com aldeído-fucsina são observadas apenas nas porções do pâncreas exócrino (COUTINHO et al., 1982).

Estudos imunohistoquímicos do pâncreas endócrino em desenvolvimento mostraram que, no gambá *D. virginiana*, células imunorreativas a insulina, glucagon, somatostatina, polipeptídeo pancreático bovino, e 5-hidroxitriptamina (serotonina) são encontradas em estágios mais tardios do desenvolvimento. Todos os tipos de células imunorreativas estão presentes em ilhotas primárias e secundárias, e entre os elementos do pâncreas exócrino. Células imunorreativas a glucagon, somatostatina, polipeptídeo pancreático bovino e serotonina estão confinadas à periferia das ilhotas secundárias (intralobulares), enquanto células imunorreativas à insulina ocupam a região central. As

células endócrinas dentro das ilhotas primárias (interlobulares) se encontram aleatoriamente espalhadas. O pâncreas endócrino continua seu desenvolvimento e diferenciação ao longo da vida pós natal e durante a vida adulta. Pequenas diferenças foram observadas entre as regiões duodenal e esplênica do pâncreas do gambá *D. virginiana* com relação á células imunorreativas (KRAUSE et al., 1989).

O diâmetro das ilhotas foi analisado e comparado entre as fases do desenvolvimento intramarsupial, mostrando que não houve variação neste parâmetro entre os terços médio e final de desenvolvimento. Entretanto a área de ilhota diminuiu significativamente no pâncreas dos animais do terço médio para aqueles do terço final da gestação (FONSECA et al., 2002b).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos Gerais**

O presente estudo descreve a morfologia e realiza a morfometria do pâncreas de gambás *Didelphis aurita* durante as três fases do desenvolvimento intramarsupial.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Descrever macroscopicamente a morfologia externa dos animais obtidos nas três etapas do desenvolvimento intramarsupial;
- Determinar a relação peso e tamanho do pâncreas com o peso e tamanho do animal;
- Quantificar a morfometria dos componentes e estruturas do pâncreas em cada uma das três etapas do desenvolvimento intramarsupial;
- Mensurar o diâmetro das ilhotas pancreáticas em cada uma das três etapas do desenvolvimento intramarsupial;
- Comparar a frequência dos componentes pancreáticos e do diâmetro das ilhotas entre as três regiões anatômicas do órgão (duodenal, do ânulo e esplênica).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbosa A. J. A., Nogueira J. C., Penna F. J., Polak J. M. 1987. Distribution of enteroglucagon- and polypeptide YY-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the white-belly opossum (*Didelphis albiventris*). Journal of Histochemistry 88: 37-40.
- Christensen, J. 2003. The forms of argyrophilic ganglion cells in the myenteric plexus throughout the gastrointestinal tract of the opossum. Journal of the Autonomic Nervous System 24: 251-260.
- Coutinho, H. B., Beck, F., Santiago, M. A. A., Pessoa, R. G., Pinheiro P. B. N., Coutinho, V. B. 1982. Some aspects of the development of the pancreas in the marsupial *Didelphis albiventris*. Revista Brasileira de Biologia 42: 15-19.
- Coutinho, H. B., Sewell, H. F., Smith, D. I., Coutinho, V. B., Pinheiro, P. B. N. 1984. Demonstration of insulin in the pancreas of *Didelphis albiventris* (opossum) by immunocytochemical techniques. Anatomischer Anzeiger 157:167-175.
- Cutts, J. H.; Lesson, C. R.; Krause, W. J. 1973. The postnatal development of the liver in a marsupial, *Didelphis virginiana*. I. Light microscopy. Journal of Anatomy 115: 327-346.
- Davis, R. 1954. The annual cycle of plants mosquitoes, birds, and mammals in two Brazilian forests. Ecological Monographs 15: 244-295.
- Dezonne, M.F.M; Carreira, J.C.A.; Franco, A.M.R. 1984. Estudo do desenvolvimento extra uterino de *Didelphis marsupialis* e estabelecimento de uma tabela de classes etárias. Anais do XI Congresso Brasileiro de Zoologia. Belém.
- Edwin, N. 1982. Quantitative estimation of islet tissue of pancreas in possums (*Trichosurus vulpecula*). Journal of Zoology 197: 455-461.

- Edwin, N. 1987. Quantitative estimation of pancreatic polypeptide (PP) cells of islet tissue of pancreas in Australian mammals. *Journal of Zoology* 213: 665-671.
- Emmons, L., Feer, F. 1990. Neotropical rainforest mammals a field guide. The University of Chicago Press 340pp.
- Eurell, A.E., Frappier, B.L. 2006. Textbook of Veterinary Histology. Blackwell Publishing. Ames.
- Fong, C.P.; Wright, C. 2011. Pancreas Organogenesis: From Bud to Plexus to Gland. *Developmental Dynamics* 240: 530-565.
- Fonseca, C.C.; Nogueira, J.C.; Barbosa, A.J.A. 2002. Diâmetro das ilhotas pancreáticas do gambá *Didelphis albiventris* em desenvolvimento intramarsupial. *Archives of Veterinary Science* 7: 129-134.
- Fonseca C. C., Nogueira J. C., Barbosa A. J. A. 2002a. Argrophilic and Glucagon-Immunoreactive cells in the ileum and colon of the developing opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). *Cells Tissues and Organs* 170: 20-33.
- Fonseca C. C., Nogueira J. C., Barbosa A. J. A. 1998. Ultrastructural pattern of glucagon producing-cells in the gastric mucosa of the developing opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). *Annals of Anatomy* 180: 477-480.
- Fonseca, C.C., G.A.B.; Redford, K.H., Pereira, L.A. 1982. Notes on *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) of central Brazil. *Ciência Cultura* 34: 1359-1362.
- Hill, J.P. 1918. Some observations on the early development of *Didelphis aurita*. *Journal of Microscopy Science* 63: 91-139.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J. 2004. *Histologia básica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 540p.
- King, F.C, Krause, W.J., Cutts. 1978. Postnatal development of the pancreas in the opossum. *Acta Anatomica* 101: 259-274.

- Krause, W. J.; Leeson, C. R. 1973. Postnatal development of the respiratory system of the opossum. I. Light and scanning electron microscopy. *American Journal of Anatomy* 137: 337-356.
- Krause, W. J.; Leeson, C. R. 1975. Postnatal development of the respiratory system of the opossum. II. Electron microscopy of the epithelium and pleura. *Acta Anatomica* 92: 28-44.
- Krause, W.J.; Cutts, J.H.; Leeson, C.R. 1976a. The postnatal development of the alimentary canal in the opossum. I. Oesophagus. *Journal of Anatomy* 122: 393-414.
- Krause, W.J.; Cutts, J.H.; Leeson, C.R. 1976b. The postnatal development of the alimentary canal in the opossum. II. Stomach. *Journal of Anatomy* 122: 499-519.
- Krause, W.J.; Cutts, J.H.; Leeson, C.R. 1976c. Type II pulmonary cells of the newborn opossum lung. *American Journal of Anatomy* 146: 181-188.
- Krause, W.J.; Cutts, J.H.; Leeson, C.R. 1977. The postnatal development of the alimentary canal in the opossum. III. Small intestine and colon. *Journal of Anatomy* 123: 21-45.
- Krause W. J., Yamada J., Cutts H. 1985. Quantitative distribution of enteroendocrine cells in the gastrointestinal tract of adult opossum, *Didelphis virginiana*. *Journal of Anatomy* 140: 591-605.
- Krause, W. J., Cutts, J. H., Yamada, J. 1989. Immunohistochemical study of the developing endocrine pancreas of the opossum (*Didelphis virginiana*). *Acta Anatomica* 135: 84-96.
- Krause, W. J., Yamada, J., Cutts, J. H. 1986. Enteroendocrine cells in the developing opossum stomach. *Journal of Anatomy* 148: 47-56.
- Mascarenhas, A.E.A.S. 1980. Histologia e inervação do sistema genital feminino na fase de anestro no gambá *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) – Didelphidae –

- Marsupialia. Dissertação (mestrado). Departamento de Morfologia, ICB/UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, 87p.
- McCrary, E. The Embryology of the opossum. 1938. American Anatomical Memory Service, (Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia).
- McAlester, A. História geológica da vida. São Paulo: E. Blucher. 2002.
- Munger, B.L.; Caramia, F.; Lacy, P.E. 1965. The ultrastructural basis for the identification of cell types in the pancreatic islets. II. Rabbit, dog, and opossum. *Z. Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 67: 776-798.
- Nogueira, J. C. 1985. Biometria do sistema genital masculino do gambá *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) durante o ciclo reprodutivo anual, *Revista Brasileira de Zoologia* 9: 199-237.
- Nogueira, J. C. Reprodução do gambá *D. albiventris*. 1989. *Ciência Hoje* 53: 8-9.
- Nomeclatura Anatômica Veterinária Ilustrada. 1999. Editora Manoli. São Paulo. 614p.
- Ribeiro, G.M.F. 2009. Análise histológica e morfométrica de componentes neuroendócrinos do intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa. 60p.
- Rigueira, S.E.; Valle, C.M.C.; Varejão, J.B.M.; Albuquerque, P.V.; Nogueira, J.C. 1987. Algumas observações sobre o ciclo reprodutivo anual de fêmeas do gambá *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) (Marsupialia, Didelphidae) em populações naturais no estado de Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 4: 129-137.
- Rocha-Miranda, C.E.; Lent, R. Opossum neurobiology. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 293 pp.

- Samoto, V. Y., Miglino, M. A., Ambrósio, C., Pereira, F. T. V., Lima, M. C., Carvalho, A.F. 2006. Morfologia da Glândula Mamária de Marsupiais da Espécie *Didelphis SP.* Associada ao Modelo Marsupial. *Biota neotropica* 6: 234: 243.
- Slack, J.M.W. 1995. Developmental biology of the pancreas. *Development* 121, p. 1569-1580.
- Souza, A. M. F., Coutinho, H. B., Hunter, R. L., Carvalho Jr., L. B., Pessoa, R. G. 1982. Insulin-like proteins during the development of the pâncreas in the Brazilian opossum *Didelphis albiventris*. *Comparative Biochemistry Physiology* 72: 149-151.
- Stevens C. E., Hume, I. D. 1995. Comparative physiology of the vertebrate digestive system. 2. ed. New York: Cambridge. University Press.
- Streilein, K.E.; In Mares, M.A.; Genoways, H.H. 1981. Behavior, ecology and distribution of South American marsupials. *Mammalian Biology In South America* 6: 231-250.
- Streilein, K.E. 1982. Ecology of small mammals in semiarid Brazilian caatinga. I. Climate and faunal composition. *Annals Carnegie Museum* 51: 79-107.
- Takagi, C. Yamada, J., Krause, W. J., Kitamura, N., Yamashita, T. 1990. An immunohistochemical study of endocrine cells in the proximal duodenum of eight marsupial species. *Journal of Anatomy* 168: 49-56.
- Thomas, T.B. 1938. Cellular components of the mammalian islets of Langerhans. *American Journal of Anatomy* 62: 31-57.
- Valle, C.M.C.; Varejão, J.B.M.; Rigueira, S.E.; Albuquerque, P.V. 1981. Contribuição ao conhecimento do ciclo reprodutivo anual em populações naturais de *Didelphis marsupialis* (Linnaeus, 1758) e *D. albiventris* (Lund, 1841) em Minas Gerais. *Anais do VIII Congresso Brasileiro de Zoologia* 130:130-13

## ARTIGO I

---

### DESENVOLVIMENTO PÓS NATAL DO PÂNCREAS DO GAMBÁ *Didelphis aurita*

#### RESUMO

Foram utilizados neste estudo 12 exemplares de *Didelphis aurita* machos, pertencentes aos terços inicial, médio e final da gestação externa (GE). Os animais foram eutanasiados poucos minutos após a sua retirada do marsupio, o pâncreas foi removido e foram realizadas as análises biométricas dos espécimes e dos órgãos. A morfologia externa dos animais mostrou que os indivíduos do terço inicial da GE se assemelhavam muito com os embriões, fato que, aliado ao seu tamanho médio (10,25mm) permite concluir que se tratam de recém nascidos. Os espécimes do terço médio da GE possuem aparência externa bastante similar aos do terço inicial, porém é notável o seu tamanho corporal aumentado. Em contrapartida, os animais do terço final da GE apresentam morfologia externa madura e característica do animal adulto, fato que corrobora os dados da literatura que apontam o estágio próximo aos 100mm de comprimento como sendo o momento de saída dos animais da bolsa. A relação peso do pâncreas/peso do animal diminui à medida que o desenvolvimento intramarsupial prossegue. A histologia dos órgãos mostrou que o pâncreas do gambá recém nascido é caracterizado pela ausência de ácinos organizados, sendo a porção exócrina formada essencialmente por células pró-acinares. Os ductos são muito grandes em diâmetro e em comprimento, terminando em extremidades cegas. Seu epitélio é do tipo simples cúbico, mas em alguns locais pode apresentar áreas de estratificação, associada às quais ocorre uma população de células endócrinas (papilas peritubulares). É possível identificar a presença de vasos sanguíneos grandes e preenchidos com hemácias nucleadas, uma

característica do embrião. Nos animais do terço médio da GE é possível observar ilhotas e ácinos em desenvolvimento. A presença de tecido conjuntivo e a divisão do órgão em lóbulos podem ser evidenciadas. Nos indivíduos do terço final do desenvolvimento é possível encontrar pâncreas com ilhotas localizadas no centro dos lóbulos, agora melhor definidos. Os ductos ocorrem em um padrão mais próximo ao do animal adulto e os vasos sanguíneos, assim como no terço médio da GE, possuem hemácias anucleadas em seu interior. Foi possível concluir que o período de gestação externa é fundamental para o desenvolvimento do pâncreas em *Didelphis aurita*.

**Palavras-chave:** Pâncreas, *Didelphis aurita*, desenvolvimento intramarsupial, histologia.

## 1. INTRODUÇÃO

O pâncreas é um órgão particularmente importante em relação à saúde humana, pois é o local de ocorrência de duas importantes doenças: o diabetes e o câncer de pâncreas. Apesar da sua importância médica, a biologia do desenvolvimento do pâncreas tem sido alvo de estudos de um pequeno número de pesquisadores nos últimos anos (SLACK, 1995).

Nos mamíferos marsupiais, o pâncreas é um dos órgãos que se apresentam imaturos no momento do nascimento e completam o seu desenvolvimento durante o período chamado de “gestação externa”, em que os indivíduos permanecem cerca de 90 dias no marsúpio (KING et al., 1978).

É sabido que em *Didelphis virginiana*, o pâncreas do recém nascido, que mede aproximadamente 12mm CR (Crown-rump length: da protuberância localizada entre os olhos à base da cauda), é composto de células pró-acinares, e ductos muito grandes, localizados na região periférica do órgão, além de células endócrinas isoladas ou em pequenos grupos na forma de cordões na região central. É comum a ocorrência de uma área de epitélio estratificado nos ductos. Estas regiões mostram uma intensa divisão celular e constituem o local de formação de estruturas chamadas “papilas peritubulares”, que são características do pâncreas do gambá recém nascido (KING et al., 1978).

A organização das células endócrinas em ilhotas pancreáticas é vista a partir do estágio em que o animal mede 35mm, ao passo que os ácinos exócrinos já são encontrados nos indivíduos de 20mm, estágio no qual são vistas pela primeira vez, células centro-acinárias. À medida que o desenvolvimento progride, a divisão do órgão em lóbulos separados por tecido conjuntivo se torna mais evidente. Ocorre também o aumento do diâmetro das ilhotas pancreáticas e a maturação dos ácinos que tendem a apresentar um lúmen menor com o passar do tempo (KING et al., 1978).

Coutinho et al. (1982) conduziram um estudo semelhante com a espécie brasileira *Didelphis albiventris*, onde foram observadas ilhotas somente no estágio de 45mm. Células endócrinas marcadas pela aldeído-fucsina só foram identificadas a partir do estágio de 70mm, o que segundo os autores, sugere a secreção exócrina de insulina, ou proteínas similares, no lúmen do intestino, de onde o hormônio seria transferido para a circulação do animal, já que nesse estágio o intestino tem a capacidade de endocitar e transferir macromoléculas através do epitélio (intestino aberto).

Assim, o desenvolvimento do pâncreas do gambá-de-orelha-preta *Didelphis aurita* pode ser estudado a título de comparação com as outras espécies do gênero, bem como com indivíduos adultos da mesma espécie. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi descrever as principais modificações macroscópicas observadas nos animais durante a vida intramarsupial, relacionando o seu tamanho com as dimensões do pâncreas, e descrever a histologia deste órgão durante o período.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Animais**

Foram capturados três exemplares de gambás *Didelphis aurita*, fêmeas, de aproximadamente 700g, considerados adultas, segundo Dezone-Mota (1984). Para sua captura, foram utilizadas armadilhas tipo gancho (75x31x31cm) iscadas com banana e óleo de fígado de bacalhau, sendo as iscas renovadas diariamente. A captura aconteceu em pequeno fragmento de mata, situada no Museu de Zoologia João Moojen - Vila Gianetti, UFV, em Viçosa, Minas Gerais. As capturas de animais foram autorizadas pelo IBAMA (licença nº 31328-1), e os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais da UFV (CEUA/UFV) sob protocolo 98/2011.

## **2.2. Eutanásia e análises biométricas**

As fêmeas capturadas foram contidas anestésica (Tiopental sódico, 30mg/mL intra-peritoneal) e mecanicamente com auxílio de luva de raspa. A cavidade marsupial foi aberta para exposição dos filhotes que foram sexados, e removidos. Após a remoção dos filhotes, as fêmeas foram devolvidas ao local de coleta. A média foi de seis filhotes por fêmea, os quais foram pesados e medidos em seus comprimentos CR para verificação do estágio de desenvolvimento em que se encontravam. A posterior eutanásia dos filhotes foi procedida com a administração intracardíaca de cloreto de potássio a 0,25%, em função do peso corporal. O pâncreas foi retirado, com o auxílio de lupa, e fixado em solução de Bouin por 24 horas.

## **2.3. Grupos Experimentais**

Os animais retirados do marsúpio foram divididos em três grupos de acordo com o seu comprimento CR:

- Grupo 1: aproximadamente 0 dias de vida intramarsupial e terço inicial da gestação externa (tamanho médio de 10mm CR);
- Grupo 2: aproximadamente 30 dias de vida intramarsupial e terço médio da gestação externa (tamanho médio de 50mm CR);
- Grupo 3: aproximadamente 90 dias de vida intramarsupial e terço final da gestação externa (tamanho médio de 100mm CR).

Para as análises biométricas e a morfometria foram utilizados 4 espécimes de cada um dos grupos.

## **2.4. Processamento histológico**

As amostras foram processadas e incluídas em parafina histológica e em resina metacrilato. Os fragmentos incluídos em parafina foram seccionados com espessura de 5 µm em micrótomo rotativo manual (SPENCER, American Optical Co.), tendo sido os cortes corados segundo as técnicas de Hematoxilina e Eosina. Os fragmentos incluídos em metacrilato foram seccionados a espessura de 3 µm em micrótomo rotativo Leica® RM2255, e corados segundo a técnica de Azul de Toluidina-Borato de Sódio. O processamento dos fragmentos analisados por microscopia óptica foi realizado nos laboratórios de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral, e de Histopatologia Veterinária do Departamento de Veterinária do CCBS.

As preparações histológicas obtidas foram analisadas em microscópio de luz Olympus BX60 acoplado com câmera digital QColor3 (Olympus).

## **2.5. Análises estatísticas**

Os dados foram organizados em planilha eletrônica para a análise de variância (Anova), segundo o programa estatístico SigmaStat®. Os dados foram expressos em média±desvio padrão e a significância estatística foi estabelecida para  $p < 0,05$ .

# **3. RESULTADOS**

## **3.1 Parâmetros biométricos**

O peso corporal aumentou significativamente durante o desenvolvimento intramarsupial, assim como o peso do pâncreas. A razão entre o peso do pâncreas e o peso corporal, entretanto, diminuiu no decorrer do período. As medidas biométricas dos indivíduos dos três grupos experimentais estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros biométricos de indivíduos da espécie *Didelphis aurita* durante as fases inicial, média e final do desenvolvimento intramarsupial.

	G1	G2	G3
<b>PC</b>	0,1±0,50g	7,69±1,20g	53,7±3,60g
<b>CR</b>	10,25±0,30mm	46,25±0,80mm	93,25±1,10mm
<b>PP</b>	0,0005±0,00g	0,12±0,002g	0,28±0,03g
<b>IPS</b>	0,05±0,001	0,015±0,003	0,005±0,002

PC = Peso corporal (g); CR = comprimento CR(mm); PP = peso do pâncreas (g); IPS = índice pancreatossomático. G1, G2, G3 = fases inicial, média e final do desenvolvimento intramarsupial. Dados expressos em média±desvio-padrão.

### 3.2. Morfologia externa e interna dos animais

Os animais do grupo 1 (com 0 dias de vida intramarsupial e com tamanho médio de 10,25±0,300mm de comprimento CR) possuem uma aparência visivelmente imatura, com ausência total de pêlos, olhos não totalmente formados e membros pélvicos semelhantes ao do embrião. A diferenciação sexual não está completa, de modo que o aparelho reprodutor externo é representado pela cloaca, não sendo possível identificar o sexo dos indivíduos (Figura 1A).

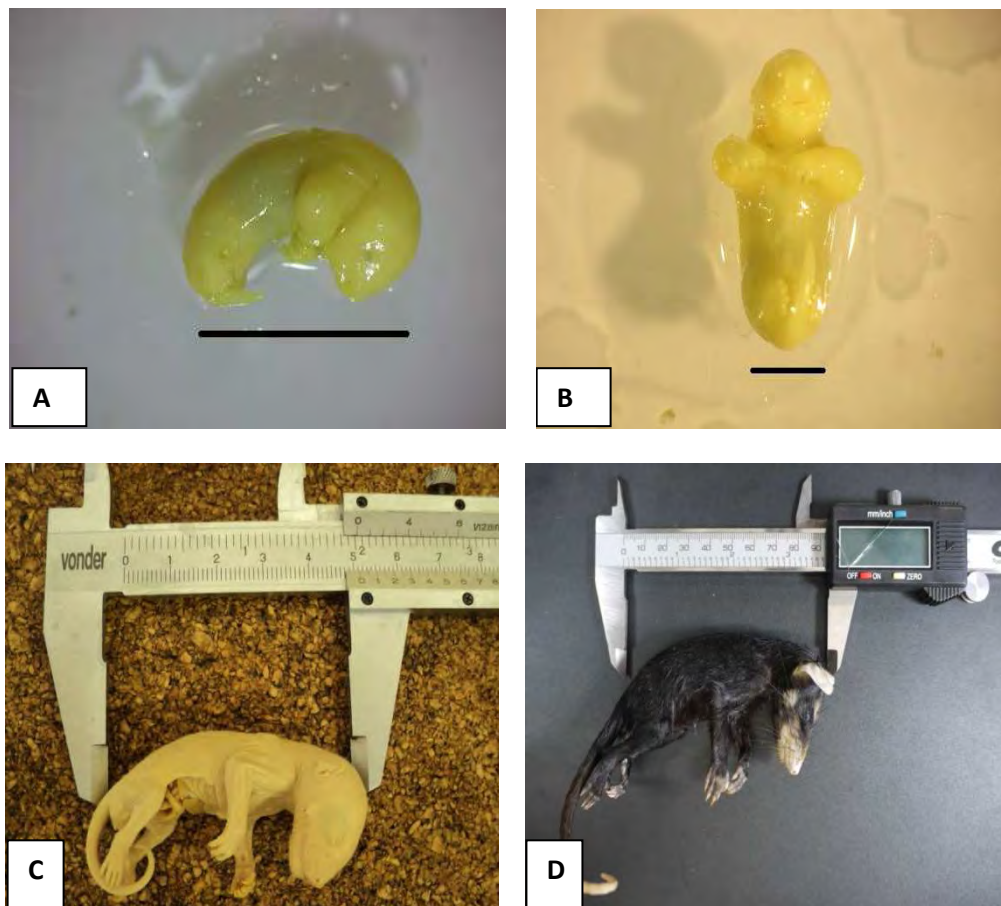
A cavidade abdominal é composta pelo estômago e pelos intestinos delgado e grosso, recobertos por uma estrutura bastante grande que preenche quase todo o espaço: o mesonefro, que neste estágio do desenvolvimento é consideravelmente maior que o rim do animal adulto. O fígado também está presente. O pâncreas pôde ser encontrado devido a sua localização entre o duodeno e o baço

Nos indivíduos pertencentes ao grupo 2 (com cerca de 30 dias de vida intramarsupial e com média de 46,25±0,80mm de comprimento CR) a principal mudança é o tamanho corporal visivelmente aumentados. Neste estágio os olhos permanecem fechados. Os membros torácicos e pélvicos apresentam a conformação característica do animal adulto e nestes últimos já é possível notar a presença de garras.

Os pêlos, entretanto, continuam ausentes e a conformação corporal desses animais ainda é similar à posição fetal (Figura 1B).

A cavidade abdominal possui os mesmos componentes já descritos para os animais do grupo 1, porém é possível observar a involução do mesonefro.

Nos animais do grupo 3 (com cerca de 90 dias de vida intramarsupial e com média de  $93,25 \pm 1,10$ mm de comprimento CR) a aparência externa é marcada pela ocorrência da pelagem já no padrão característico do animal adulto (Figura 1C). Os animais retirados do marsúpio têm capacidade de locomoção, embora reduzida. A cavidade abdominal assemelha-se muito a do animal adulto, e a presença de rins com morfologia adulta pode ser identificada.



**Figura 1.** Gambá *Didelphis aurita* de vida intramarsupial. **A:** animal recém nascido em vista lateral. Barra = 10mm. **B:** animal recém nascido em vista ventral. Barra = 3mm. **C:** animal do terço médio da gestação externa em vista lateral. **D:** animal do terço final da gestação externa em vista lateral.

### 3.3. Parâmetros histológicos pancreáticos

A observação das lâminas histológicas mostrou que nos indivíduos do grupo 1 o pâncreas é visivelmente imaturo e o arranjo típico das porções endócrina e exócrina não existe. É possível notar a presença de vasos sanguíneos de tamanho considerável, preenchidos com um grande número de hemácias nucleadas, características do embrião (Figura 2A). As células exócrinas (ou pró-acinares) estão dispostas na periferia do órgão e são caracterizadas por uma forma próxima à piramidal. O núcleo destas células é esférico e localizado na região basal do citoplasma. As células pró-acinares não estão arranjadas em ácinos, mas sim dispostas em pequenos grupos (Figura 2B).

O sistema de ductos é bastante peculiar, sendo possível notar a presença de um único ducto grande, alcançando quase toda a extensão do órgão. As células do epitélio que reveste o ducto são cubóides e possuem um núcleo arredondado (Figura 2B). Em alguns locais do revestimento do ducto ocorre uma camada dupla ou tripla de células. O tecido adjacente a esta região é rico em células endócrinas e, devido à sua semelhança às papilas dérmicas, é chamado de papila peritubular (Figura 2B).

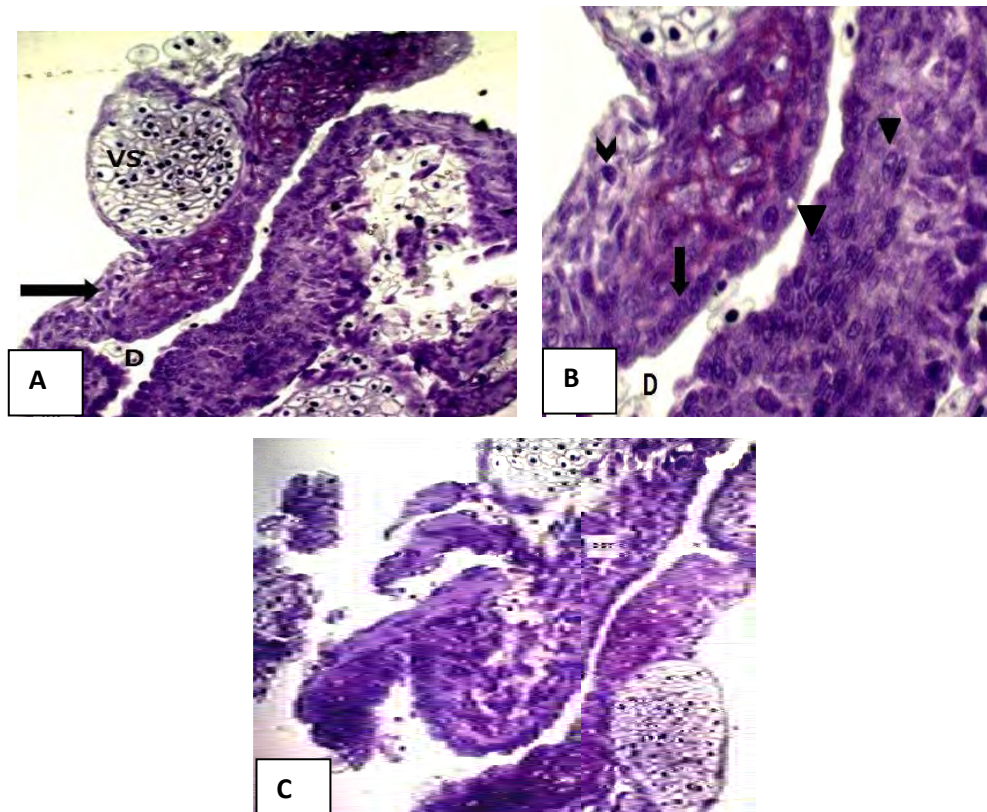
As células endócrinas podem ocorrer isoladas ou em pequenos grupos. A porção endócrina ocorre na região central do órgão e na área das papilas peritubulares. (Figura 2C).

No pâncreas dos animais do grupo 2 é possível caracterizar a presença de ácinos em desenvolvimento, com lúmen relativamente amplo. As células acinares mantêm a forma piramidal e o núcleo arredondado e basal (Figura 3A). Os grandes ductos dão lugar a ductos maiores e ductos menores cujo epitélio se mantém do tipo simples cúbico (Figura 3B). Os vasos sanguíneos são menores e contêm hemácias anucleadas em seu interior e as ilhotas pancreáticas estão presentes.

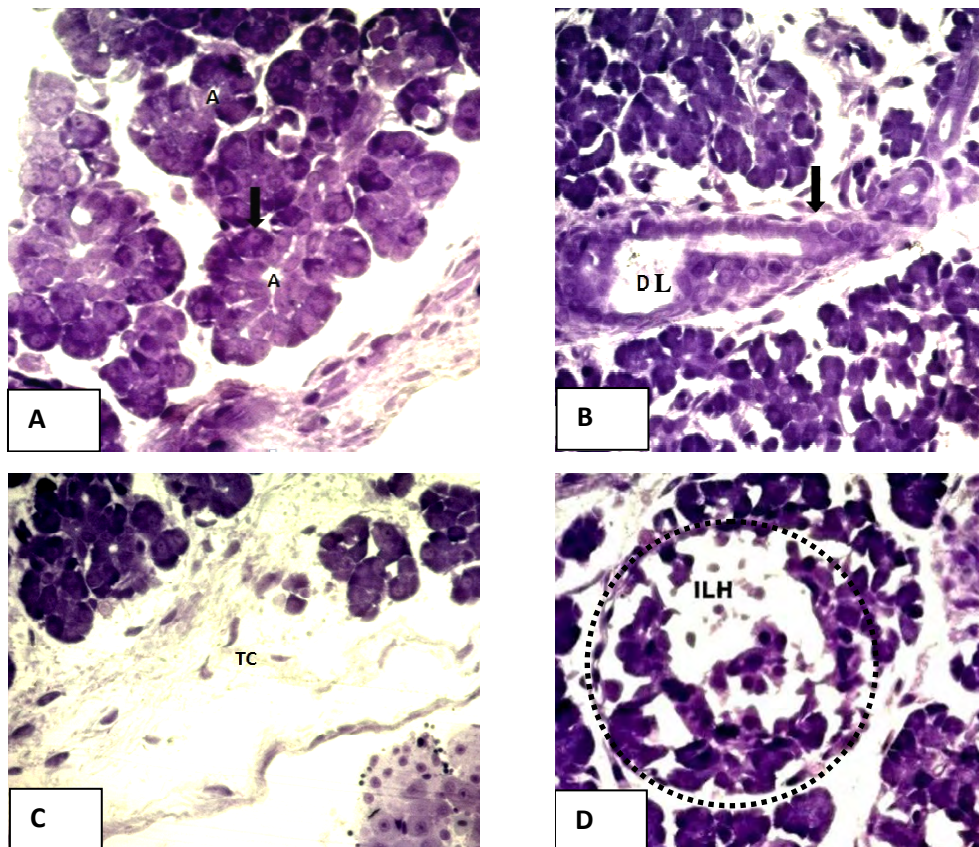
A presença do tecido conjuntivo, na forma de septos ou entre os ácinos, é mais evidente nos indivíduos do grupo 2 (Figura 3C).

Nos animais do grupo 3 os ácinos estão mais bem estruturados possuem um lúmen menor, as células acinares possuem formato piramidal com núcleo arredondado (Figura 4A). O tecido conjuntivo está presente também nos septos que separam o órgão em lóbulos e os vasos sanguíneos e ductos seguem o padrão usual já visto no grupo 2 (Figura 4B).

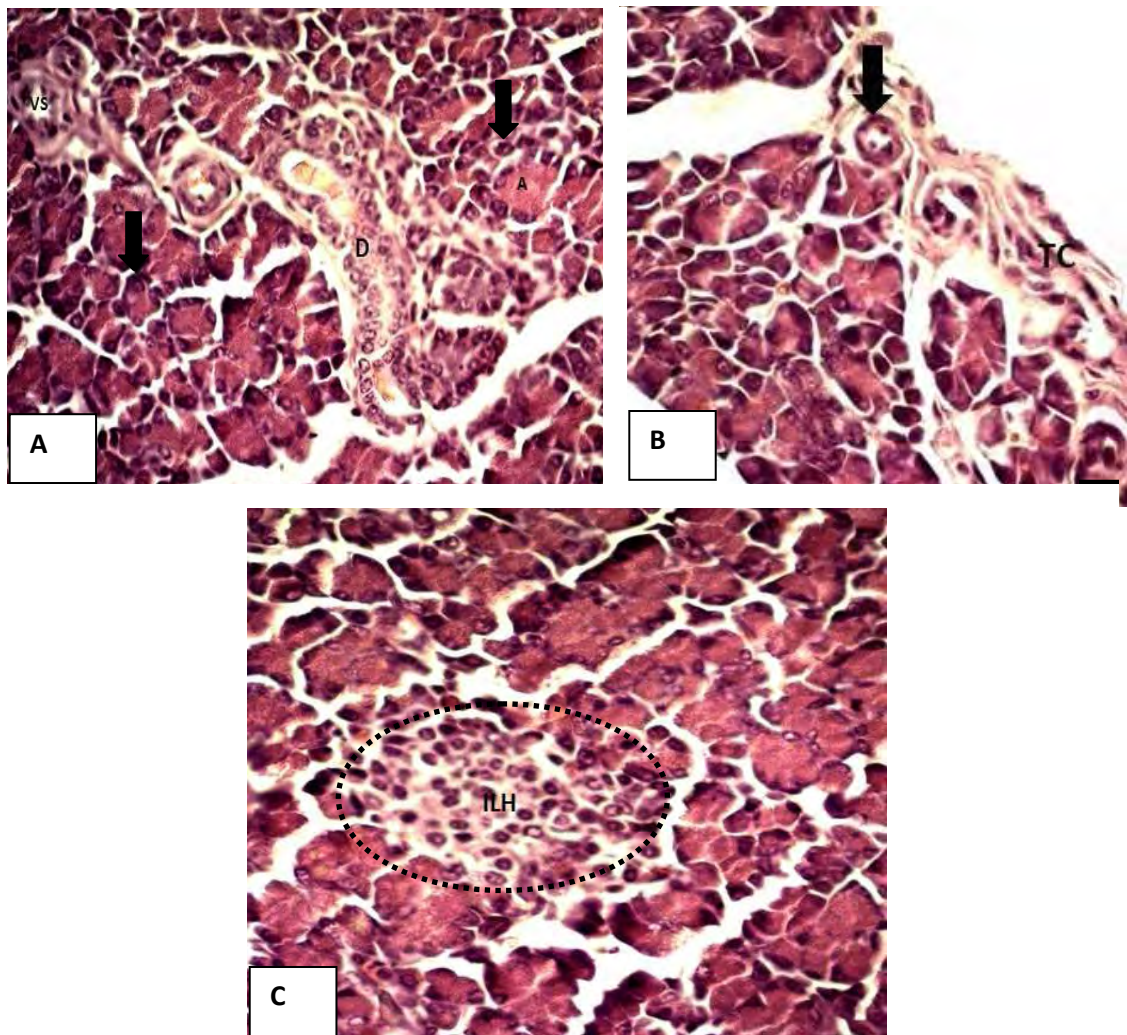
As ilhotas pancreáticas se mostram maiores e mais bem estruturadas, sendo possível notar a presença de tecido conjuntivo delimitando-as (Figura 4C).



**Figura 2:** Pâncreas do gambá *Didelphis aurita* recém nascido. **A:** VS = vasos sanguíneos; D = ducto exócrino; ➡ = papila peritubular. Aumento: 200X. **B:** D = ducto exócrino; ♥ = núcleo de célula endócrina; ▼ = núcleo de célula proacinar; ↓ = núcleo de célula epitelial do ducto exócrino. Aumento: 400X. **C:** PPT = papila peritubular. Aumento: 200X. Azul de Toluidina + Borato de Sódio.



**Figura 3:** Pâncreas do gambá *Didelphis aurita* durante o terço médio da gestação externa. **A:** A = lúmen de ácinos; ↓ = núcleo de célula ácinar. Aumento: 200X. **B:** LD = lúmen de ducto exócrino. ↓ = núcleo de célula epitelial do ducto exócrino. Aumento: 100X. **C:** TC = tecido conjuntivo. Aumento: 200X. **D:** ILH = ilhota pancreática. Aumento: 200X. Azul de Toluidina + Borato de Sódio.



**Figura 4:** Pâncreas do gambá *Didelphis aurita* durante o terço final da gestação externa. **A:** D = ducto exócrino; A = ácino; VS = vaso sanguíneo; ↓ = núcleo de célula acinar. Aumento: 200X. **B:** TC = tecido conjuntivo; ↓ = vaso sanguíneo. Aumento: 200X. **C:** ILH = ilhota pancreática. Aumento: 200X. Hematoxilina e Eosina.

#### 4. DISCUSSÃO

Os indivíduos retirados do marsúpio medindo em média  $10,25 \pm 0,30$ mm (grupo 1) podem ser considerados recém nascidos e, portanto, pertencentes ao terço inicial da gestação externa (primeiros 30 dias do desenvolvimento intramarsupial), ao passo que os animais com média de  $46,25 \pm 0,80$ mm (grupo 2) podem ser incluídos no terço intermediário do período de bolsa. Os exemplares retirados do marsúpio com média de  $93,25 \pm 1,10$ mm (grupo 3) encontram-se no final do período de gestação externa e o seu tamanho caracteriza o momento aproximado de saída da bolsa (DEZONNE-MOTA, 1984).

A aparência externa, semelhante a do animal adulto, observada nos indivíduos do grupo 3 (caracterizada pela presença de pêlos corporais, olhos funcionais e capacidade de locomoção) vai de acordo com o trabalho científico que considera este o estágio em que ocorre a saída dos animais da bolsa, visto que os mesmos possuem as características corporais necessárias para a vida fora do marsúpio (DEZONNE-MOTA, 1984).

A histologia do pâncreas do gambá *Didelphis aurita* durante o desenvolvimento intramarsupial mostrou que a característica principal do desenvolvimento deste órgão é o considerável espaço de tempo requerido para que as porções endócrina e exócrina alcancem a maturidade estrutural. Esses resultados confirmam os achados de King et al. (1978) que reportaram que o pâncreas do gambá norte americano (*Didelphis virginiana*) não alcança o estágio maduro antes do período pré-púbere da vida do animal (280mm).

Em ratos (MORI e HOGA, 1968) o arranjo do epitélio do ducto similar ao do animal adulto aparece no 16º dia pré-natal. Esses eventos no gambá norte americano ocorrem 4 dias antes da saída dos animais do útero (KING et al., 1978), o que está de acordo com os resultados observados para gambás-de-orelha-preta recém nascidos, cujo pâncreas também possui ductos com epitélio simples cúbico.

A formação dos ácinos em ratos ocorre de 3 a 5 dias antes do nascimento e o epitélio exócrino do pâncreas de ratos e camundongos se mostra morfológicamente maduro já no momento do nascimento, embora ocorra um certo grau de desenvolvimento pós natal (MORI e HOGA, 1968). Em contraste, o pâncreas do gambá-de-orelha-preta recém nascido é caracterizado por um epitélio exócrino primitivo aparentemente não funcional.

King et al. (1978) afirmam que o pâncreas do gambá norte americano encontra-se em desenvolvimento durante os primeiros 75 dias após o nascimento, período durante o qual ocorre a formação dos ácinos e dos ductos. O mesmo parece ocorrer no gambá-de-orelha-preta, visto que os achados histológicos para os animais dos terços médio e final da gestação interna mostram ácinos e ductos ainda em desenvolvimento.

O arranjo típico das células endócrinas em ilhotas não ocorre nos gambás do grupo 1 deste estudo, visto que as mesmas se organizam em cordões ou pequenos grupos associados ao epitélio do ductos (papilas tubulares). Em *Didelphis virginiana* King et al. (1978) usam o termo “ilhotas em desenvolvimento” para descrever a organização das células endócrinas. Observações similares foram feitas no homem (PEARCE, 1903; LAGUESSE, 1904-1906; HARD, 1944). Nos animais do grupo 2 (com aproximadamente 46,25mm) as ilhotas podem ser identificadas e o seu diâmetro é mensurável. Essas observações estão de acordo com as feitas por King et al (1978) que observaram o aparecimento das ilhotas no estágio em que os animais possuem aproximadamente 25mm de comprimento CR. Nos espécimes do grupo 3 essas ilhotas podem ser encontradas na região central dos lóbulos pancreáticos, assim como em *Didelphis virginiana* (KING et al., 1978).

Laguesse (1896) descreveu duas gerações de ilhotas no pâncreas de ovelhas. As “ilhotas” primárias teriam origem nas células endócrinas isoladas ao longo do pâncreas primitivo ou dos túbulos pancreáticos em desenvolvimento. King et al, (1978)

observaram ilhotas semelhantes no pâncreas do gambá norte americano recém nascido, mas o presente estudo não fez a mesma observação em *Didelphis aurita*. Ainda de acordo com Laguesse (1896) as ilhotas primárias sofreriam degeneração, fato que ocorreria concomitante com a diferenciação dos ácinos secretórios. A degeneração das ilhotas não foi observada em nenhum estágio do desenvolvimento do pâncreas em *Didelphis aurita*.

Ilhotas do pâncreas adulto localizadas entre os lóbulos e não no centro deles, seriam ilhotas primárias que não completaram o seu processo de degeneração, ou seja, seriam “ilhotas secundárias” (LAGUESTE, 1896). Em várias espécies de gambá ocorrem duas gerações de ilhotas (KING et al., 1978).

Estes dados morfológicos sugerem que o gambá-de-orelha-preta tem um pâncreas exócrino não funcional no momento do nascimento, assim como postulado por King et al., (1978) para o gambá norte americano.

Adicionalmente a aparência imatura do pâncreas e do fígado, todo o aparelho digestório se apresenta imaturo ao nascimento (KRAUSE et al., 1976a, 1976b, 1977). É possível que essa imaturidade do pâncreas exócrino esteja relacionada com a transferência de imunoglobulina. O desenvolvimento tardio dessas estruturas permitiria a absorção de macromoléculas intactas (imunoglobulinas) pelo epitélio intestinal do gambá lactante (KING et al., 1978). Alguns marsupiais australianos, entre eles o gambá (*Trichosurus vulpecula*), possuem imunoglobulinas maternas derivadas do leite, absorvidas no intestino (YADAV, 1971).

A glândula submandibular também mostra vários pontos em comum com o desenvolvimento do pâncreas (LEESON et al., 1978). Ao nascimento, ambos consistem em uma série de túbulos primitivos que terminam em extremidades “cegas” compostas por células proacinares, e ambos mostram o desenvolvimento de ácinos e ductos durante a primeira semana de vida, seguido por consideráveis mudanças que ocorrem durante o

extenso período pós-natal. A diferenciação tardia da glândula submandibular vai de acordo com a maturação do pâncreas e do restante do aparelho digestório.

Etapas posteriores do desenvolvimento do pâncreas do animal jovem são caracterizadas, a partir desse momento, pelo crescimento das estruturas do órgão (KING et al., 1978).

## **5. CONCLUSÕES**

O período de gestação externa em *Didelphis aurita* é crucial no desenvolvimento desses animais.

A relação peso do pâncreas/peso do animal diminui durante o desenvolvimento intramarsupial.

O pâncreas do gambá *Didelphis aurita* completa o seu desenvolvimento estrutural e funcional durante o período de gestação externa.

Ácinos e ilhotas pancreáticas se formam durante esse período de tempo, entretanto, a formação madura do pâncreas só é encontrada em animais pré-púberes.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Coutinho, H. B., Beck, F., Santiago, M. A. A., Pessoa, R. G. 1982. Some aspects of the development of the pancreas in the marsupial *Didelphis albiventris*. Revista Brasileira de Biologia 42: 15-19.
- Cutts, J.H., Leeson, C.R., Krause, W.J. 1973. The postnatal developmental of the liver in a marsupial *Didelphis virginiana*. I. Light microscopy. Journal of Anatomy 115: 327-346.
- Dezzone, M.F.M, Carreira, J.C.A., Franco, A.M.R. 1984. Estudo do desenvolvimento extra uterino de *Didelphis marsupialis* e estabelecimento de uma tabela de classes etárias. Anais do XI Congresso Brasileiro de Zoologia. Belém.
- Hard, W. L. 1944. The origin and differentiation of the alpha and beta cells in the pancreatic islets of the rat. American Journal of Anatomy 75: 369-403.
- King, F. C., Krause, W. J., Cutts, J. H. 1978. Postnatal developmental of the pancreas in the opossum. Light microscopy. Acta Anatomica 101: 259-274.
- Krause, W. J., Cutts, J. H., Leeson, C.R. 1975. The postnatal developmental of the liver in a marsupial *Didelphis virginiana*. II. Electron microscopy. Journal of Anatomy 120: 191-205.
- Krause, W. J, Cutts, J. H., Leeson, C.R. 1976a. The postnatal developmental of the alimentary canal in a marsupial the Opossum. I. Oesophagus. Journal of Anatomy 122: 393-414.
- Krause, W. J., Cutts J. H., Leeson, C.R. 1976b. The postnatal developmental of the alimentary canal in a marsupial the Opossum. II. Stomach. Journal of Anatomy 122: 499-519.
- Krause, W. J.; Cutts, J. H.; Leeson, C.R. 1977. The postnatal developmental of the alimentary canal in a marsupial the Opossum. III. Small intestine and colon. Journal of Anatomy 123: 21-45.

- Krause, W. J.; Cutts, J. H.; Leeson, C.R. 1973. The postnatal development of the respiratory system of the opossum. I. Light and scanning electron microscopy. *American Journal of Anatomy* 137: 337-356.
- Krause, W. J.; Cutts, J. H.; Leeson, C.R. 1975. The postnatal development of the respiratory system of the opossum. II. Electron microscopy of the epithelium and pleura. *Acta anatomica* 92: 28-44.
- Krause, W. J.; Cutts, J. H.; Leeson, C.R. 1976c. Type II pulmonary epithelial cells of the newborn opossum lung. *American Journal of Anatomy* 146: 181-188.
- Laguesse, E. 1896. Recherches sur l'histogenie du pâncreas chez le mouton. II. Formation et remanient des cavites secretantes. *Anatomie e Physiologie* 32: 171-198.
- Laguesse, E. 1904-1906. Le pancreas: la glande nouvelle ou endocrine. *Revue générale Histologie* 2: 1-288.
- Leeson, C. R.; Cutts, J. H., Krause, W. J. 1978. Postnatal development of the submandibular gland in the opossum (*Didelphis virginiana*). *Journal of Anatomy* 122: 393-414.
- Mori, T.; Hoga, M. 1960. Histological and histochemical observations on the developing pancreas of fetal mouse. *Tohoku Journal of experimental Medicine* 72: 42-58.
- Pearce, R.M. 1903. The development of the islets of Langerhans in the human embryo. *American Journal of Anatomy* 2: 445-455.
- Slack, J. M. W. 1995. Developmental biology of the pancreas. *Development* 121: 1569-1580.
- Thomas, T. B. 1938. Cellular components of the mammalian islets of Langerhns. *American Journal of Anatomy* 62: 31-57.

Yadav, M. 1971. The transmission of antibodies across the gut of pouch-young marsupials. *Immunology* 21: 839-851.

## ARTIGO II

---

### MORFOMETRIA E DIÂMETRO DAS ILHOTAS DAS REGIÕES ANATÔMICAS DO PÂNCREAS DO GAMBÁ *Didelphis aurita* DURANTE O DESENVOLVIMENTO INTRAMARSUPIAL

#### RESUMO

Foram utilizados neste estudo 12 exemplares de *Didelphis aurita* machos, pertencentes aos terços inicial, médio e final da gestação externa (GE). Os animais foram eutanasiados poucos minutos após a sua retirada da bolsa marsupial, o pâncreas foi removido e foram realizadas as análises histológicas e a morfometria do órgão. A porcentagem de ácinos variou significativamente entre os animais do estágio inicial e final do período intramarsupial, sendo maior neste último. A proporção de ilhotas mostrou o mesmo comportamento, porém foi menor nos animais do terço final da GE, tendo o mesmo acontecido com a porcentagem de ductos. A média percentual de vasos sanguíneos variou significativamente entre os três grupos, tendo diminuído progressivamente com o avançar do desenvolvimento intramarsupial. A proporção de tecido conjuntivo nos três grupos mostrou comportamento semelhante.

Entre as regiões do pâncreas dos animais do terço médio da GE houve variação na porcentagem de ácinos entre as regiões duodenal e esplênica, enquanto a média de ilhotas não variou significativamente entre as regiões. O número médio de ductos variou entre as três regiões, tendo o mesmo ocorrido com a porcentagem de vasos sanguíneos.

A quantidade de tecido conjuntivo variou somente entre as regiões duodenal e esplênica. Não houve variação na proporção de componentes pancreáticos entre nenhuma das regiões anatômicas do pâncreas nos animais do terço final da GE. Com relação ao diâmetro das ilhotas durante o desenvolvimento intramarsupial não foi observada variação significativa entre os terços médio e final da gestação externa. Entre as regiões anatômicas do pâncreas (duodenal, do corpo e esplênica), nos animais do

terço médio da GE foi verificada diferença significativa entre todas as regiões. A região esplênica possui ilhotas maiores, seguida da região do corpo e da região duodenal. No terço final da GE o diâmetro das ilhotas também variou significativamente entre as três regiões anatômicas do pâncreas. Neste caso, a região com ilhotas maiores foi a duodenal, seguida da região do corpo e esplênica. As ilhotas pancreáticas do gambá *Didelphis aurita* em desenvolvimento são consideradas pequenas, não sendo, portanto ideais para doação em transplantes. O diâmetro das ilhotas varia significativamente entre as regiões do pâncreas, mas esta diferença pode ser atribuída ao desenvolvimento desigual de diferentes regiões do pâncreas.

**Palavras-chave:** Pâncreas, desenvolvimento intramarsupial, morfometria, *Didelphis aurita*.

## 1. INTRODUÇÃO

O pâncreas dos mamíferos marsupiais tem sido alvo de estudos que abordam diferentes pontos da histologia e morfologia deste órgão. A maioria das pesquisas realizadas é referente à histologia das ilhotas pancreáticas normais (BONNEVIE-NIELSEN et al., 1984; EDWIN, 1984 e 1985; ELAYAT et al., 1995; HASTINGS et al., 1992; KRAUSE et al., 1989; KROUSTROUP et al., 1983; STEFAN et al., 1980) com alterações histopatológicas (KLESANG et al., 1997; PRADO et al., 1983; SAITO et al., 1979; STEFAN et al., 1980) e à quantificação das suas células endócrinas constituintes (EDWIN et al., 1984 e 1985; FONSECA et al., 1998; KLENSANG et al., 1997; KRAUSE et al., 1989; PETKOV et al., 1981; REDDY et al., 1986; WIRDMAN et al., 1981). Estes estudos referem-se à morfometria e variação numérica das células endócrinas, e à distribuição das ilhotas nas três regiões anatômicas (região duodenal, região do corpo, e região esplênica) do pâncreas.

No geral, estudos da morfometria do pâncreas exócrino e endócrino são raros. Entretanto, Kroustrup e Gundersen (1983) verificaram a porcentagem de volume das ilhotas pancreáticas e dos seus constituintes (células endócrinas e tecido intersticial). Tsuboushi et al. (1987) verificaram que as células acinares e endócrinas do pâncreas do camundongo adulto aumentavam de tamanho, mostrando assim se tratar de tipos celulares em expansão.

Kaung (1994) demonstrou que em ratos ocorre crescimento diferencial de células endócrinas e exócrinas durante o desenvolvimento do pâncreas, e que as perdas celulares ocorridas durante esse processo seriam importantes na modulação das populações de células endócrinas e exócrinas.

Warnock et al. (1990) quantificaram o colágeno do interstício pancreático com o objetivo de verificar a qualidade do pâncreas endócrino de doadores.

Os estudos morfométricos do pâncreas de marsupiais englobam a porção endócrina em animais nativos da Austrália e no gambá norte americano (*Didelphis virginiana*) (KRAUSE et al., 1989). Fonseca et al. (2004) realizaram a morfometria dos componentes do pâncreas endócrino e exócrino da espécie sul-americana *Didelphis albiventris* durante o desenvolvimento intramarsupial e no animal adulto.

O objetivo deste estudo foi quantificar e determinar a distribuição dos componentes nas três regiões anatômicas (duodenal, corpo e esplênica) do pâncreas do gambá-de-orelha-preta *Didelphis aurita* durante o seu desenvolvimento intramarsupial.

A quantificação e a morfometria das ilhotas pancreáticas tem sido feitas com diferentes finalidades. Warnock et al (1990), verificaram o tamanho médio das ilhotas pancreáticas de caninos e humanos, enquanto Carnazzo et al (1993) realizaram um estudo semelhante com porcos, objetivando verificar a viabilidade do tecido pancreático para uso em transplantes endógenos.

Haeyeck e Woodside (1979) correlacionaram o diâmetro das ilhotas com a produção de insulina e glucagon no pâncreas. Eles definiram como ilhotas grandes as maiores que 0,45mm e ilhotas pequenas as que possuíam diâmetro inferior a 0,12mm. Foi verificado que as ilhotas grandes produziam mais insulina do que as ilhotas menores. Um estudo semelhante foi conduzido por Kaihoh et al. (1986) que verificaram a existência de ilhotas grandes e pequenas no pâncreas humano. As ilhotas grandes, neste caso, eram responsáveis pela maior parte das funções endócrinas.

Alguns estudos estabelecem uma relação entre o diâmetro das ilhotas pancreáticas e diversos parâmetros corporais e fisiológicos. Colella et al. (1985) relacionaram diferentes tamanhos de ilhotas pancreáticas com a quantidade de utilização de glicose, mostrando que as ilhotas maiores utilizavam mais glicose que as menores. A produção de insulina, entretanto, não apresentou o mesmo comportamento.

De maneira inversa, Reaven et al. (1981) demonstraram que o aumento do diâmetro, volume ou área das ilhotas pancreáticas acarretava em uma maior produção de insulina.

Boa parte dos trabalhos sobre a morfometria das ilhotas pancreáticas tem como objetivo verificar a qualidade do pâncreas para transplantes. Hering et al. (1989) descreveram métodos de quantificação de ilhotas em bovinos, com o intuito de verificar uma nova fonte de transplantes de porções endócrinas do pâncreas.

El Naggar et al. (1993), com o objetivo de fornecer subsídios para estudos de transplantes de ilhotas pancreáticas em ratos, verificaram diferentes tamanhos de ilhotas no pâncreas. Foi possível verificar também que durante o isolamento destas ilhotas ocorreu perda celular, principalmente em sua região periférica, com conseqüente redução do diâmetro. Esta alteração pode provocar um controle metabólico incompleto e ocorrência de hipoglicemia após o transplante.

É sabido que a quantificação das ilhotas pancreáticas é de vital importância para o estabelecimento de comparações, antes da realização de um possível transplante de tecido pancreático. Seguindo essa teoria, Fonseca et al (2002) realizaram a quantificação das ilhotas pancreáticas do gambá *Didelphis albiventris* adulto e nos filhotes durante a vida intramarsupial.

Assim, a morfometria das ilhotas pancreáticas do gambá *Didelphis aurita* pode ser realizada no intuito de promover uma comparação com os achados já descritos na literatura para outras espécies de marsupiais. O objetivo do presente trabalho é estabelecer o diâmetro médio das ilhotas do pâncreas do gambá-de-orelha-preta durante as três fases do desenvolvimento intramarsupial, estabelecendo uma comparação entre as três regiões do pâncreas (duodenal, do corpo, e esplênica).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Animais**

Foram capturados três exemplares de gambás *Didelphis aurita*, fêmeas, de aproximadamente 700g, considerados adultas, segundo Dezonne-Mota (1984). Para sua captura, foram utilizadas armadilhas tipo gancho (75x31x31cm) iscadas com banana e óleo de fígado de bacalhau, tendo sido as iscas renovadas diariamente. A captura aconteceu em pequeno fragmento de mata, situada no Museu de Zoologia João Moojen - Vila Gianetti, UFV, em Viçosa, Minas Gerais. As capturas de animais foram autorizadas pelo IBAMA (Licença n° 31328-1) e os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais da UFV (CEUA/UFV) sob protocolo n° 98/2011.

### **2.2. Eutanásia e análises biométricas**

As fêmeas capturadas foram contidas anestésica (Tiopental sódico, 30mg/mL intraperitoneal) e mecanicamente com o auxílio de luvas de raspa. A cavidade marsupial foi aberta para exposição dos filhotes que foram sexados, e removidos os machos. Os animais foram pesados e medidos em seu comprimento CR para verificação do estágio de desenvolvimento em que se encontravam. A posterior eutanásia foi procedida com a administração intracardíaca de cloreto de potássio a 0,25%, em função do peso corporal. O pâncreas foi retirado e dividido em três regiões anatômicas. Esta divisão foi feita segundo a localização anatômica do órgão na cavidade abdominal: a região duodenal é que está em contato com o duodeno, a do corpo é a região média e a região esplênica está em contato com o baço. Os fragmentos foram fixados em solução de Bouin por 24 horas.

### **2.3. Grupos Experimentais**

Os animais retirados do marsúpio foram divididos em três grupos de acordo com o seu comprimento CR:

- Grupo 1: aproximadamente 0 dias de vida intramarsupial e terço inicial da gestação externa (aproximadamente 10mm CR);
- Grupo 2: aproximadamente 30 dias de vida intramarsupial e terço médio da gestação externa (aproximadamente 50mm CR);
- Grupo 3: aproximadamente 90 dias de vida intramarsupial e terço final da gestação externa (100mm CR).

Para as análises biométricas e a morfometria foram utilizados 4 espécimes de cada um dos grupos.

### **2.4. Processamento histológico**

As amostras foram processadas e incluídas em parafina e em resina metacrilato. Os fragmentos incluídos em parafina foram seccionados com espessura de 5  $\mu$ m em micrótomo rotativo manual (SPENCER, American Optical Co.), tendo sido os cortes corados segundo as técnicas de Hematoxilina e Eosina. Os fragmentos incluídos em metacrilato foram seccionados a espessura de 3  $\mu$ m em micrótomo rotativo Leica® RM2255, e corados segundo a técnica de Azul de Toluidina-Borato de Sódio. O processamento dos fragmentos analisados por microscopia óptica foi realizado nos laboratórios de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral, e de Histopatologia Veterinária do Departamento de Veterinária do CCBS.

### **2.5. Obtenção das imagens e morfometria**

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico Olympus BX60 acoplado com câmera digital QColor3 (Olympus) e a morfometria das imagens foi

realizada com o uso do programa ImageJ®. Para a contagem de pontos utilizou-se uma gradícula com 225 pontos (intersecções). Foram analisados 10 campos por região (duodenal, corpo e esplênica) do pâncreas de cada animal, totalizando 2250 pontos por região e 6750 pontos por animal.

Foram mensuradas 10 ilhotas pancreáticas para cada uma das três regiões do pâncreas de cada animal dos diferentes grupos, sendo obtidos os dois maiores diâmetros para o cálculo do diâmetro médio.

## **2.6. Parâmetros Analisados**

A morfometria quantificou os seguintes parâmetros pancreáticos: ácinos exócrinos, ilhotas, ductos, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. No caso dos animais do Grupo 1, foram quantificadas células pró acinares e células endócrinas, visto que não foram identificados ácinos e ilhotas neste estágio do desenvolvimento intramarsupial. Todos esses componentes foram quantificados e seu valor percentual comparado entre os três grupos, e entre as diferentes regiões anatômicas do pâncreas dos indivíduos de cada grupo.

## **2.7. Análises estatísticas**

Os dados foram organizados em planilha eletrônica para a análise de variância (Anova), segundo o programa estatístico SigmaStat®. Os dados foram expressos em média/desvio padrão e a significância estatística foi estabelecida para  $p < 0.05$ . As médias estatisticamente diferentes foram comparadas com o uso do teste t.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Parâmetros morfométricos do pâncreas do gambá *Didelphis aurita* durante o desenvolvimento intramarsupial

Com relação à porção exócrina no pâncreas, a média percentual das células pró-acinares nos animais desse estudo, houve diferença significativa entre os valores percentuais de células exócrinas nos grupos 1 e 3, indicando um aumento do número dessas células com relação ao primeiro e último terço da gestação externa, não sendo verificada diferença significativa para este parâmetro entre os grupos 1 e 2.

A média percentual de células endócrinas foi significativamente diferente somente entre os grupos 1 e 3.

Os valores das médias percentuais para ductos foram estatisticamente diferentes entre os grupos 1 e 3, ao passo que para os vasos sanguíneos houve diferença significativa entre todos os grupos.

Para o tecido conjuntivo, a proporção foi de  $27,61 \pm 0,07\%$  no grupo 1;  $46,18 \pm 2,38\%$  no grupo 2, e  $28,57 \pm 0,10\%$  no grupo 3. Novamente, houve diferença significativa entre os três grupos.

Os parâmetros morfométricos do pâncreas do gambá *Didelphis aurita* durante o desenvolvimento intramarsupial estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros morfométricos do pâncreas do gambá *Didelphis aurita* durante o desenvolvimento intra marsupial.

	G1	G2	G3
<b>ACI</b>	27,56±0,244% <sup>a</sup>	40,53±2,34% <sup>ab</sup>	65,23±0,1% <sup>b</sup>
<b>ILH</b>	29,61±0,12% <sup>a</sup>	5,32±0,23% <sup>ab</sup>	2,87±0,04% <sup>b</sup>
<b>DUC</b>	6,82±0,12% <sup>a</sup>	4,25±1,15% <sup>ab</sup>	1,93±0,08% <sup>b</sup>
<b>VAS</b>	8,4±0,2% <sup>a</sup>	4,22±1,62% <sup>b</sup>	1,40±0,87% <sup>c</sup>
<b>CON</b>	27,61±0,07% <sup>a</sup>	46,18±2,38% <sup>b</sup>	28,57±0,10% <sup>c</sup>

G1 = grupo 1; G2 = grupo 2; G3 = grupo 3; ACI = ácidos; ILH = ilhotas; DUC = ductos; VAS = vasos; CON = tecido conjuntivo. Dados expressos em média± desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos.

### 3.2. Componentes das três regiões do pâncreas do gambá *Didelphis aurita* durante o desenvolvimento intramarsupial

Os pâncreas dos animais do grupo 1 não foram divididos anatomicamente devido ao seu tamanho reduzido. Os resultados da comparação entre a frequência dos componentes pancreáticos em suas três regiões anatômicas, nos grupos 2 e 3 estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

No grupo 2 foi observada diferença significativa entre as médias percentuais dos ácidos nas regiões duodenal e do corpo, e duodenal e esplênica. Não houve diferença estatística entre as regiões do corpo e esplênica. A porcentagem de ilhotas pancreáticas não diferiu estatisticamente entre nenhuma das três regiões pancreáticas, ao passo que a média percentual dos ductos exócrinos foi significativamente maior na região do corpo. Com relação à frequência de tecido conjuntivo, os valores foram significativamente maiores na região duodenal em relação à do corpo e à esplênica, não havendo diferença significativa entre as regiões do corpo e esplênica. Por fim, com relação à presença de

vasos sanguíneos, a variação foi significativa entre todas as regiões, sendo estas estruturas mais abundantes na região duodenal (Tabela 2).

No grupo 3 a média percentual dos ácinos não variou estatisticamente entre nenhuma das três regiões do pâncreas, ao passo que as porcentagens de ilhotas pancreáticas, ductos, vasos sanguíneos, e tecido conjuntivo não apresentaram variação significativa entre as regiões do pâncreas no grupo 3.

Tabela 2. Parâmetros morfométricos do pâncreas do gambá *Didelphis aurita* separado em três regiões anatômicas.

	<b>G2a</b>	<b>G2i</b>	<b>G2d</b>	<b>G2tc</b>	<b>G2vs</b>
<b>RD</b>	36,06±3,97% <sup>a</sup>	4,90±0,15% <sup>a</sup>	1,58±0,04% <sup>a</sup>	50,40±0,55% <sup>a</sup>	7,15±0,25% <sup>a</sup>
<b>RC</b>	41,62±0,26% <sup>bc</sup>	5,37±0,04% <sup>a</sup>	5,48±0,09% <sup>b</sup>	45,97±0,44% <sup>bc</sup>	1,56±0,02% <sup>b</sup>
<b>RE</b>	43,93±0,22% <sup>c</sup>	5,69±0,05% <sup>a</sup>	4,23±0,05% <sup>c</sup>	42,18±0,29% <sup>c</sup>	3,97±0,06% <sup>c</sup>

G2a = ácinos no grupo 2; G2i = ilhotas no grupo 2; G2d = ductos no grupo 2; G2tc = tecido conjuntivo no grupo 2; G2vs = vasos sanguíneos do grupo 2; RD = região duodenal; RC = região do corpo; RE = região esplênica. Dados expressos em média±desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística entre os grupos.

Tabela 3. Parâmetros morfométricos do pâncreas do gambá *Didelphis aurita* separado em três regiões anatômicas.

	<b>G3a</b>	<b>G3i</b>	<b>G3d</b>	<b>G3tc</b>	<b>G3vs</b>
<b>RD</b>	65,23±0,06% <sup>a</sup>	2,87±0,03% <sup>a</sup>	1,93±0,01% <sup>a</sup>	28,50±0,03% <sup>a</sup>	1,47±0,02% <sup>a</sup>
<b>RC</b>	65,37±0,03% <sup>a</sup>	2,93±0,02% <sup>a</sup>	1,97±0,02% <sup>a</sup>	28,43±0,04% <sup>a</sup>	1,30±0,03% <sup>a</sup>
<b>RE</b>	65,10±0,02% <sup>a</sup>	2,80±0,05% <sup>a</sup>	2,18±0,03% <sup>a</sup>	28,75±0,02% <sup>a</sup>	1,17±0,03% <sup>a</sup>

G3a = ácinos no grupo 3; G3i = ilhotas no grupo 3; G3d = ductos no grupo 3; G3tc = tecido conjuntivo no grupo 3; G3vs = vasos sanguíneos do grupo 3; RD = região duodenal; RC = região do corpo; RE = região esplênica. Dados expressos em média±desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística entre os grupos.

### 3.3. Diâmetro das ilhotas do pâncreas do gambá *Didelphis aurita* durante o desenvolvimento intramarsupial

O diâmetro médio das ilhotas pancreáticas do gambá *Didelphis aurita* durante os terços médio e final (grupos 2 e 3) da gestação externa foi de  $39,52 \pm 5,10 \mu\text{m}$  e  $34,86 \pm 3,10 \mu\text{m}$ , respectivamente, não havendo diferença significativa entre o diâmetro das ilhotas entre o terço médio e final do desenvolvimento intramarsupial (Figuras 1 e 2). Os valores estão listados na tabela 1.

Com relação às regiões anatômicas do pâncreas, animais do grupo 2 obtiveram, para a região duodenal diâmetro médio das ilhotas igual a  $30,15 \pm 0,6 \mu\text{m}$ . As regiões do corpo e esplênica possuem ilhotas com diâmetro médio de  $47,70 \pm 1,4 \mu\text{m}$  e  $40,73 \pm 1,98 \mu\text{m}$  respectivamente. Foi verificada diferença significativa entre todas as regiões. Os resultados estão listados na tabela 2.

No grupo 3 a região duodenal obteve o diâmetro médio das ilhotas igual a  $37,67 \pm 1,40 \mu\text{m}$ . A região do corpo registrou diâmetro médio de  $39,14 \pm 1,88 \mu\text{m}$  e a região esplênica de  $28,86 \pm 0,6 \mu\text{m}$ . Novamente, foi detectada a diferença significativa entre todas as regiões (Figura 2). Os resultados estão sumarizados na tabela 2.

Tabela 1. Diâmetro das ilhotas pancreáticas do gambá *Didelphis aurita* durante o desenvolvimento intramarsupial

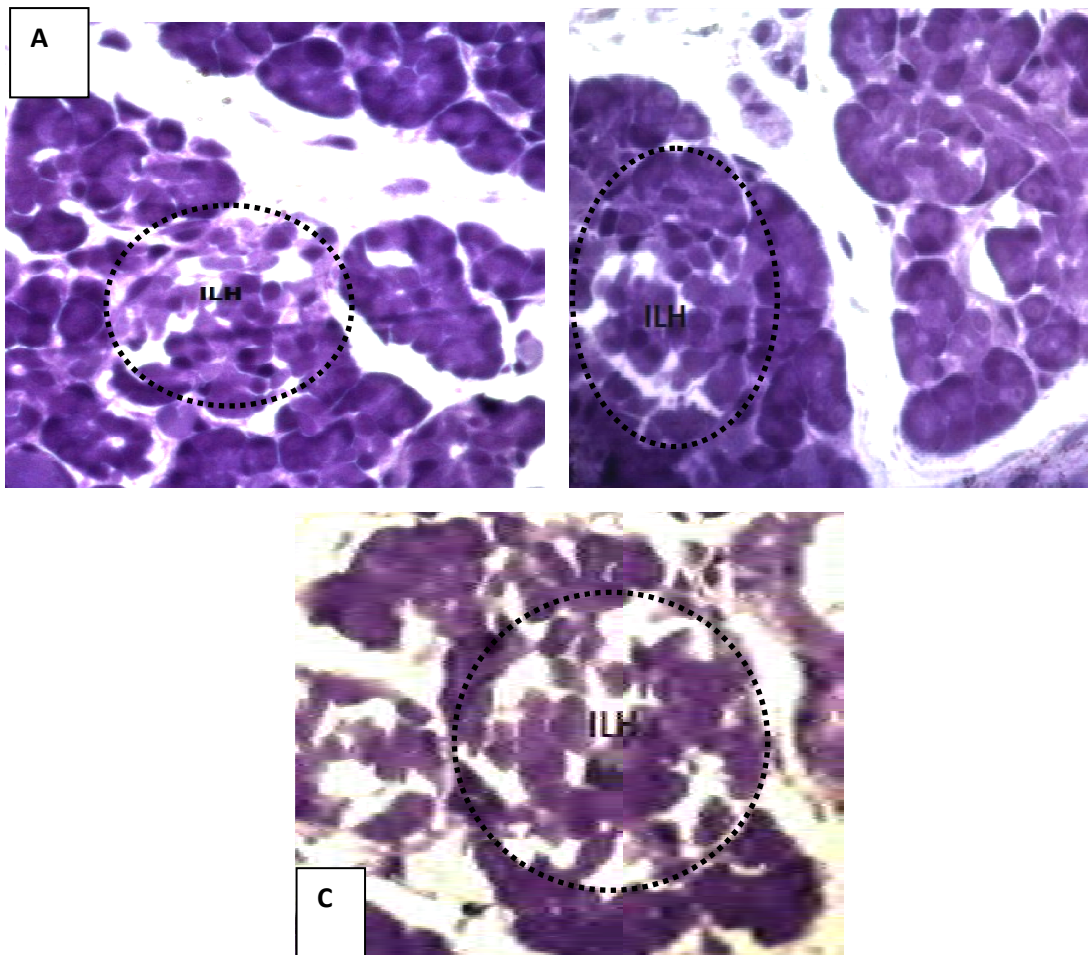
	G2	G3
D. ILH	$39,52 \pm 5,104 \mu\text{m}^a$	$34,86 \pm 3,101 \mu\text{m}^a$

D. ILH = Diâmetro das ilhotas; G2 = Grupo 2; G3 = Grupo 3. Dados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos.

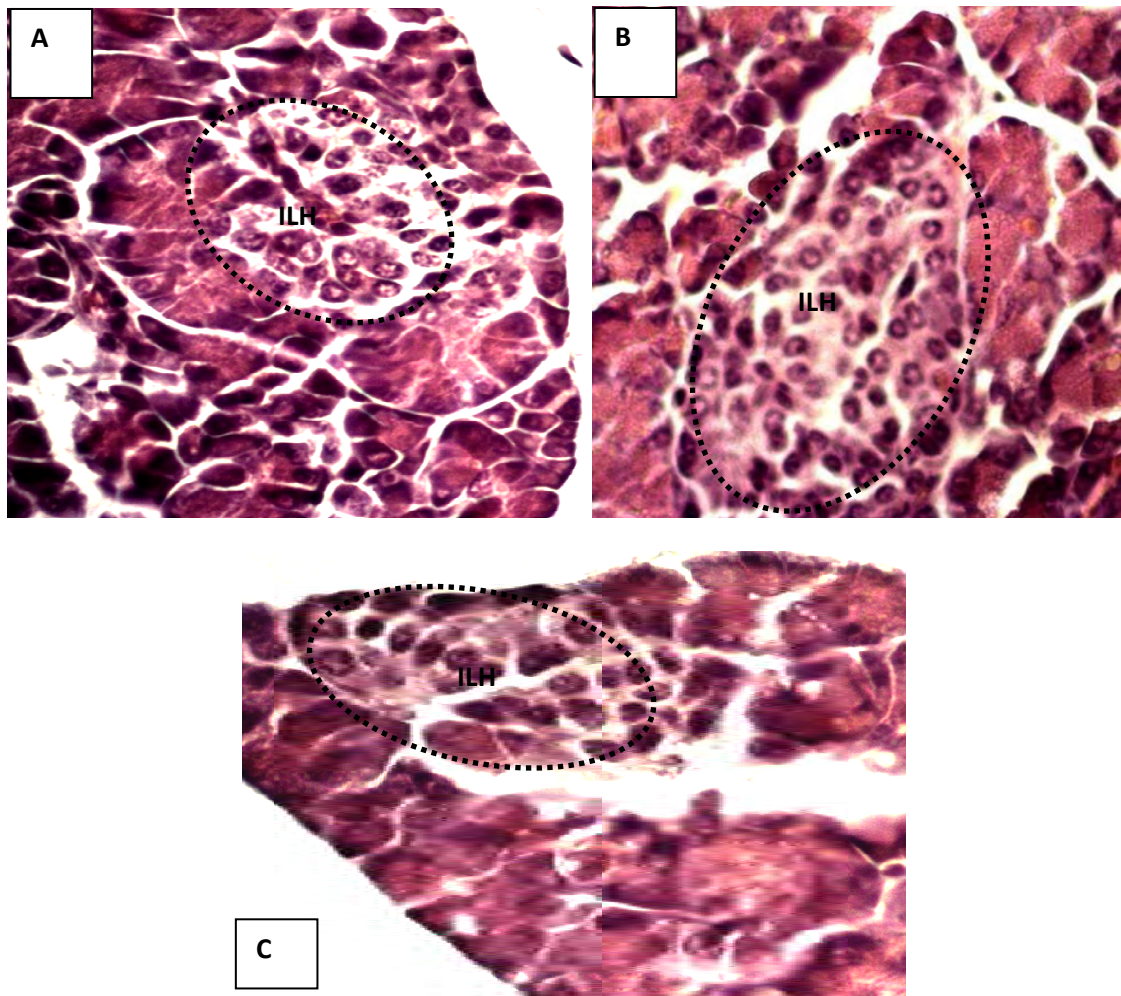
Tabela 2. Diâmetro das ilhotas pancreáticas do gambá *Didelphis aurita* nas três regiões anatômicas do pâncreas.

<b>D. ILH</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>
<b>RD</b>	30,15 ± 0,60µm <sup>a</sup>	36,67 ± 1,40µm <sup>a</sup>
<b>RC</b>	47,70 ± 1,40µm <sup>b</sup>	39,14 ± 1,88µm <sup>b</sup>
<b>RE</b>	40,73 ± 1,98µm <sup>c</sup>	28,86 ± 0,60µm <sup>c</sup>

D. ILH = Diâmetro das ilhotas; G2 = Grupo 2; G3 = Grupo 3; RD = Região Duodenal; RC = Região do Corpo; RE = Região Esplênica. Dados expressos em média±desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística entre os grupos.



**Figura 1.** Pâncreas do gambá *Didelphis aurita* durante o terço médio da gestação externa. **A:** ILH = ilhota da região duodenal do pâncreas; **B:** ILH = ilhota da região do corpo do pâncreas. **C:** ILH = ilhota da região esplênica do pâncreas. 200X. Barra = 10 $\mu$ . Azul de Toluidina+Borato de sódio.



**Figura 2.** Pâncreas do gambá *Didelphis aurita* no terço final da gestação externa. **A:** ILH = ilhota da região do corpo do pâncreas; **B:** ILH = ilhota da região duodenal do pâncreas; **C:** ILH = ilhota da região esplênica do pâncreas. 200X. Barra = 10 $\mu$ . Hematoxilina e Eosina.

#### 4. DISCUSSÃO

As observações deste estudo mostraram que a proporção de ácinos tende a aumentar com o avanço do desenvolvimento intramarsupial. Estes achados estão de acordo com os resultados encontrados por Fonseca et al. (2004), que verificaram a mesma ocorrência em *Didelphis albiventris*, sendo justificado por Tsubouchi et al. (1987) que afirmaram que a porção exócrina do pâncreas de camundongos sofre constante renovação celular.

A porcentagem de ilhotas pancreáticas ou células endócrinas diminui à medida que a gestação externa progride. Esta idéia pode ser explicada pelo fato de que, nos animais dos grupos 1 e 2, as ilhotas ainda não estão organizadas ou se encontram em processo de desenvolvimento, podendo ocorrer células endócrinas isoladas ou em pequenos grupos entre as células da porção exócrina, o que pode aumentar o seu valor percentual final (KING et al., 1978).

Para o gambá *Didelphis albiventris*, Fonseca et al. (2004) verificaram uma diminuição na proporção de ilhotas no pâncreas dos animais adultos em relação àqueles do último mês de vida intramarsupial. Este fato ajuda a corroborar a idéia de que a fase final de bolsa é a última na qual as ilhotas pancreáticas sofrem proliferação numérica, passando apenas a aumentar em tamanho nas fases seguintes do crescimento.

Pode-se, portanto, estabelecer uma relação inversa entre o desenvolvimento das porções endócrina e exócrina do pâncreas: enquanto a primeira diminui ao longo do desenvolvimento intramarsupial, a segunda permanece aumentando, o que indica a sua constante renovação.

A diminuição na proporção dos ductos durante o desenvolvimento intramarsupial pode ser explicada pelo que foi descrito por King et al. (1978). Segundo os autores, a principal característica histológica do pâncreas do gambá recém nascido é a presença de ductos muito grandes, se comparados com os dos animais adultos e dos

terços médio e final da gestação externa. Isso explicaria a porcentagem elevada de ductos no pâncreas dos animais do grupo 1, em comparação com os animais do grupo 2 e 3. Além disso, a ramificação dos ductos, evento que pode ser observado nos animais do grupo 2 e , torna algumas de suas porções extremamente reduzidas.

A diminuição da vascularização que ocorre à medida que o desenvolvimento intramarsupial prossegue pode ter uma relação de causa e conseqüência com a diminuição na porção endócrina do pâncreas. Uma vez que as ilhotas pancreáticas possuem vascularização abundante, uma diminuição em sua freqüência poderia inclusive refletir significativamente na diminuição do número de vasos sanguíneos.

O aumento ocorrido na freqüência de tecido conjuntivo nos animais do grupo 2, em comparação com os do grupo 1 pode ser explicado pelo fato de que no início da vida intramarsupial (grupo 1) o pâncreas destes animais ainda não apresenta características de lobulação sendo a sua quantidade de tecido conjuntivo reduzida. Nos animais do grupo 2 a septação do pâncreas em lóbulos começa a se tornar evidente, o que pode explicar o aumento significativo deste tecido durante essa etapa do desenvolvimento (King et al., 1978). Nos animais do grupo 3, esta porcentagem volta a diminuir, o que pode ser explicado pela expansão numérica dos ácinos, que nos animais do grupo 2 ainda encontravam-se em processo de desenvolvimento. Como o tecido exócrino expande, a proporção de tecido conjuntivo pode diminuir. Van Suylichem et al. (1995) verificaram que em porcos jovens a quantidade de tecido conjuntivo (estroma) pancreático era maior em animais jovens quando comparados com os adultos.

Em seres humanos, a região do pâncreas mais rica em ilhotas pancreáticas é a da cabeça (região duodenal no marsupial) (CLARKE, 1913), enquanto que em ratos, a região com maior número de ilhotas é a do corpo (EPPLÉ, 1968). No marsupial australiano *Trichorus vulpecula* (Cusu-de-orelhas-grandes), não são observadas diferenças regionais na proporção de ilhotas do animal adulto.

As diferenças nas proporções dos componentes pancreáticos verificadas entre as regiões do pâncreas dos animais do grupo 2 pode ser explicada pelo fato de que estando essas estruturas ainda em formação, algumas discrepâncias regionais podem ser notadas, fato que não acontece nos animais do grupo 3, já prontos para sair da bolsa. Nos animais adultos da espécie *Didelphis albiventris* não ocorre diferença significativa entre os componentes nas três regiões (FONSECA et al., 2004). Estes resultados podem fornecer subsídios para se inferir que a variação regional de componentes pancreáticos pode ser, também, uma característica do pâncreas em desenvolvimento.

A ausência de variação significativa no diâmetro das ilhotas do pâncreas do gambá *Didelphis aurita* entre o segundo e o terceiro terço da gestação externa foi também observada por Fonseca et al. (2002) no gambá *Didelphis albiventris*. Apesar de não haver variação do diâmetro, a área das ilhotas em *Didelphis albiventris* diminui do terço médio para o terço final da gestação externa, o que, com base nos dados obtidos, pode ser esperado também para *Didelphis aurita*.

Uma vez que ocorre diminuição de tecido conjuntivo do animal jovem para o animal adulto (Fonseca et al., 2004), a diminuição na área das ilhotas poderia ser explicada por uma perda de tecido conjuntivo e não por uma diminuição do número de células endócrinas.

Existem trabalhos na literatura que correlacionam o diâmetro das ilhotas com a produção de hormônios pancreáticos, e conseqüentemente com a potencialidade de doação das ilhotas pancreáticas no xenotransplante. Ratos são considerados bons doadores, uma vez que possuem ilhotas pancreáticas grandes (maiores que 150 $\mu$ m de diâmetro). A capivara, entretanto, não é considerada um bom doador, pois suas ilhotas são pequenas e de difícil separação do tecido exócrino (Gray, 1998).

O gambá *Didelphis aurita*, durante o seu desenvolvimento intramarsupial possui ilhotas pancreáticas pequenas (39,52 $\pm$ 5,104  $\mu$ m no terço médio e 34,86 $\pm$ 3,101  $\mu$ m no

terço final do desenvolvimento), de modo que indivíduos no estágio intramarsupial não considerados bons doadores de ilhotas, assim como o gambá *Didelphis albiventris* (Fonseca et al., 2002).

A diferença estatística no diâmetro das ilhotas observada entre as regiões duodenal, do corpo e esplênica do pâncreas dos indivíduos dos grupos 2 e 3 pode ser explicada por um crescimento desigual destas regiões. No grupo 2 a região duodenal é que possui ilhotas maiores, seguida pela região duodenal e do corpo. Já no grupo 3, as maiores ilhotas ocorrem nas regiões duodenal, do corpo e esplênica, nesta ordem. Como o padrão de região com ilhotas maiores não se mantém de um grupo para o outro, pode-se concluir que a diminuição observada no diâmetro das ilhotas entre o terço médio e final da gestação externa (Fonseca et al., 2002) ocorre de modo desigual entre as diferentes regiões do pâncreas.

Mesmo com esta variação, nenhuma das três regiões do pâncreas do gambá *Didelphis aurita* pode ser considerada boa para doação em transplantes.

## 5. CONCLUSÕES

A porcentagem dos componentes do pâncreas do gambá *Didelphis aurita* sofre grandes variações durante o seu desenvolvimento intramarsupial, reforçando e confirmando a idéia de que este é um órgão que completa o seu desenvolvimento durante a gestação externa.

As ilhotas pancreáticas do gambá *Didelphis aurita* em desenvolvimento são consideradas pequenas, não sendo, portanto ideais para doação em transplantes.

O diâmetro das ilhotas varia significativamente entre as regiões do pâncreas, mas esta diferença pode ser atribuída ao desenvolvimento desigual de diferentes regiões do órgão.

## 6. REFERÊNCIAS

- Bonnevie-Nielsen, V. & Skovgard, L. T. 1984. Pancreatic islet volume distribution: direct measurement in preparations stained by perfusion in situ. *Acta Endocrinologica* 105:379-384.
- Carnazzo, S.S., Lanteri, R., Petino, A.G., Distefano, A.M., Stivallia, F., Latteri, E. 1993. A simplified method of pig islet isolation. *Italian Journal of Gastroenterology* 25: 314-317.
- Clark, E. 1913. The number of islet of Langrhans in the human pancreas. *Anatomischer Anzeiger* 43:81-94.
- Colella, R.M., Bonner-Weirr, S., Braunstein, L.P., Schwalke, M., Weir, C.G. 1985. Pancreatic islets of variable size-insulin secretion and glucose utilization. *Life Science* 37: 1059-1065.
- Dezzone, M.F.M, Carreira, J.C.A., Franco, A.M.R. 1984. Estudo do desenvolvimento extra uterino de *Didelphis marsupialis* e estabelecimento de uma tabela de classes etárias. *Anais do XI Congresso Brasileiro de Zoologia*. Belém. Dezonne, M.F.M, Carreira, J.C.A., Franco, A.M.R. 1984. Estudo do desenvolvimento extra uterino de *Didelphis marsupialis* e estabelecimento de uma tabela de classes etárias. *Anais do XI Congresso Brasileiro de Zoologia*. Belém.
- Edwin, N. 1984. Quantitative estimation of islet tissue in adult grey kangaroos (*Macropus fuliginosus*). *Journal of Zoology* 203:125-133.
- Edwin, N. 1982. Quantitative estimation of islet tissue of pancreas in possums (*Trichosurus vulpecula*). *Journal of zoology* 197: 455-461.
- Edwin, N. 1985. Quantitative estimation of islet tissue of pancreas in spinifex hopping mouse (*Notomys alexis*). *Journal of zoology* 206: 191-201.
- Elayat, A.A., El-Nagar, M.M., Tahir, M. 1995. An immunocytochemical and morphometric of the rat pancreatic islets. *Journal of Anatomy* 186: 629-637.

- El Naggar, M.M., Elayat, A.A., Ardawi, M.S., Tahir, M. 1993. Isolated pancreatic islets of the rat an immunohistochemical and morphometric study. *Anatomical Record* 237: 489-497
- Epple, A. 1968. Comparative studies on the pancreatic islets. *Endocrine journal* 15: 107-122.
- Fonseca, C.C., Nogueira, J.C., Barbosa, A.J.A. 2002. Diâmetro das ilhotas pancreáticas do gambá *Didelphis abiventris* em desenvolvimento intramarsupial. *Archives of Veterinary Science* 7: 129-134.
- Fonseca, C.C.; Nogueira, J.C.; Barbosa, A.J.A. 2004. Histometria do pâncreas do gambá sul-americano. *Revista Ceres* 51(297): 565-574.
- Fonseca, C.C, Nogueira, J.C., Barbosa, A.J.A. 1998. Immunocytochemical and ultrastructural identification of the glucagon-producing cell in the gastric mucosa of the developing opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia) *Anatomischer Anzeiger* 180: 477-480.
- Gray, D.W.R., Cahill, A., Asakura, T., Morris, P.J. 1998. Investigation of a large commercially farmed rodent (Capybara) as a potential donor for pancreatic islet xenotransplantation. *Transplantation Proceedings* 30: 460-462.
- Hastings, H.M., Schneider, B.S., Schreiber, M.A, Gorray, K. 1992. Statistical geometry of pancreatic islets. *Proceedings of Royal Society of London* 250: 257-261.
- Hayec, A., Woodside, W. 1979. Correlation between morphology and function in isolated islets of the sucker rat. *Diabetes* 28:565-569.
- Hering, B.J., Romann, D., Clarius, A., Brendel, M., Slijepcevic, M., Bretzel, R.G, Federlin, K. 1989. Bovine islets of Langerhans. Potential source of transplantation? *Diabetes* 38: 206-208.
- Kaioh, T., Masuda, T., Sasano, N., Takahashi, T. 1986. The size and number of Langerhans islets correlated with their endocrine function: a morphometry on

- immunostained serial sections of adult human pancreases. Tokohu Journal of Experimental Medicine 149: 1-10.
- Kaung, H.L.C. 1994. Growth dynamics of pancreatic islet populations during fetal and neonatal development of the rat. Developmental Dynamics 200: 163-175.
- King, F.C, Krause, W.J., Cutts. 1978. Postnatal development of the pancreas in the opossum. Acta Anatomica 101: 259-274.
- Klensang, U., Hagemann, S., Saeger, W. Bajanowsky, T., Freislederer, 1997. A. Morphology, immunohistochemistry and morphometry of pancreatic islets in cases of sudden infant syndrome (SIDS). Internal Journal of Legal Medicine 110:199-203.
- Krause, W.J, Cutts, J.H., Yamada, J. 1989. Immunohistochemical study of the developing endocrine pancreas of the opossum *Didelphis virginiana*. Acta Anatomica 135: 84-96.
- Kroustroup, J.P., Gundersen, H.J. 1983. Sampling problems in a heterogeneous organ: quantitation of relative and total volume of pancreatic islets by light microscopy. Journal of Microscopy 132: 43-55.
- Petkov, P., Hadjiisky, A. P., Marquie, G. 1981. Pancreatic islets histochemistry in normal sand rats (*Psammomys obesus*). Cell Molecular Biology 27: 655-665.
- Prado, M.L., Cruz, A.R. 1983. Adaptation of the endocrine tissue of rat pancreas after partial pancreatectomy: a morphometric study. Acta Anatomica 16: 346-352.
- Reaven, E.P., Gold, G., Walker, H., Reaven, G.M. 1981. Effect of variations in islet size and shape on glucose-stimulated insulin secretion. Hormone and Research Metabolic 13: 673-674
- Reddy, S., Bibby, N.J., Fisher, S.L., Elliot, R.B. 1986. Immunolocalization of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide, and somatostatin in the pancreatic islets of the

- possum *Trichosurus vulpecula*. *General and Comparative Endocrinology* 64: 157-162.
- Saito, K., Yaginuma, N., Takahashi, T. 1979. Differential volumetry of Ab, B and D cells in the pancreatic islets of diabetic and nondiabetic subjects. *Tokohu Journal of Experimental Medicine* 129: 273-283.
- Stefan, Y., Falkmer, S. 1980. Identification of four endocrine cells types in the pancreas of *Cottus scorpius* (Teleostei) by immunofluorescence and electron microscopy. *General and Comparative Endocrinology* 42: 171-178.
- Tsubouchi, S., Kano, E., Suzuki, H. 1987. Demonstration of expanding cell populations in mouse pancreatic acini and islets. *Anatomical Record* 218: 11-115.
- Van Suylichem, P.T., Van Deijen, J.E., Wolters, G.H., VAN, Schilfgaarde, R. 1995. Amount and distribution of collagen in pancreatic tissue of different species in the perspective of islet isolation procedures. *Cell Transplantation* 4: 609-614.
- Warnock, G.L., Kneteman, N.M., Evans, M.G., Rajotte, R.V. 1990. Isolation of purified large mammal and human islets of Langerhans. *Hormone Metabolism Research Supplement*, 25:37-44.
- Wirdnam, P.K., Milner, R.D.G. 1981. Quantification of the B and A cell fractions in human pancreas from early life to puberty. *Early Human Development* 56: 299-309.