

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO

Aspectos histológicos, histoquímicos e imuno-histoquímicos do tubo gastrintestinal de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) nos Reservatórios: do Funil, Santa Cecília e Ilha dos Pombos

NATHÁLIA DAS NEVES CARDOSO

Seropédica - Rio de Janeiro

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**ASPECTOS HISTOLÓGICOS, HISTOQUÍMICOS E
IMUNO-HISTOQUÍMICOS DO TUBO GASTRINTESTINAL DE
Astyanax Bimaculatus (LINNAEUS, 1758) NOS RESERVATÓRIOS:
DO FUNIL, SANTA CECÍLIA E ILHA DOS POMBOS**

NATHÁLIA DAS NEVES CARDOSO

Sob a orientação do Professor

Dr. Armando Sales

e co-orientação da Professora

Dra. Aparecida Alves do Nascimento

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro, 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

NATHÁLIA DAS NEVES CARDOSO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM -----/-----/-----

Dr. Armando Sales
(Orientador)

Dr. Fernando Raphael de Almeida Ferry (UNIRIO)

Dr. Marcos Antônio José dos Santos (UFRRJ)

Dr. Walker André Chagas (UFF)

Dra. Nadja Lima Pinheiro (UFRRJ)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a vida e ser minha esperança, consolo e fortaleza em todos os momentos.

A toda a minha família, pela oração, confiança e apoio durante esta caminhada. E, em especial aos meus pais, por me mostrarem o valor de uma conquista, do conhecimento e do amor, sempre me incentivando a crescer.

Ao professor e orientador Dr. Armando Sales, por auxílio com sua sabedoria, apoio e orientação para a realização deste trabalho.

A Professora Dra. Aparecida Alves do Nascimento, e co-orientadora desta dissertação pela compreensão, colaboração tanto de cunho profissional quanto pessoal, por sua dedicação, amizade, confiança e incentivo.

Meus sinceros agradecimentos ao Professor Dr. Francisco Gerson Araújo e aos amigos Alex Braz Iacone Santos, Iracema David, Rafael Jardim Albieri e Paulo que colaboraram de forma incomensurável na coleta de todo o material aqui estudado.

Aos membros da banca examinadora, pela assistência, disposição e contribuições.

A amiga e irmã Enely Maris da Silveira Firmiano, sendo esta de estimado valor para a elaboração deste trabalho.

A Fabiano Paschoal de Oliveira meu namorado, amigo e companheiro de todas as horas, pelo incondicional oferecimento dos nobres exercícios de renúncia e paciência, pelo suporte emocional, pelo exemplo de caráter e comprometimento profissional além da ajuda para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos em geral, pelos momentos felizes, ajuda, e incentivo nessa trajetória.

Aos professores e funcionários da Área de Histologia e Embriologia pela boa convivência e pelos ensinamentos compartilhados, em especial a amiga Ilza Lucas Coelho Meirelles por todo o auxílio durante a rotina laboratorial e por sua amizade e incentivo em todos os momentos.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

Resumo

CARDOSO, Nathália das Neves. **Aspectos histológicos, histoquímicos e imuno-histoquímicos do tubo gastrintestinal de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) nos Reservatórios: do Funil, Santa Cecília e Ilha dos Pombos.** 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Este trabalho visou descrever as características histológicas e histoquímicas do estômago e intestino *Astyanax bimaculatus* e analisar presença de células endócrinas no tubo gastrintestinal (TGI) da mesma espécie em três reservatórios do rio Paraíba do Sul (UHE Funil, UHE Santa Cecília e UHE Ilha dos Pombos), buscando comparar a distribuição regional e frequência de células endócrinas secretoras de somatostatina (SOM), gastrina (GAS) e serotonina (5-HT) nos espécimes de cada ambiente. Foram utilizados 12 espécimes de cada reservatório, sendo estes coletados através de rede de espera e sacrificados por hipotermia. Após a dissecação ocorreu a imediata remoção do TGI. Posteriormente, fragmentos do estômago e intestino foram fixados por 8 horas em líquido de Bouin e encaminhados para o Laboratório de Histologia e Embriologia da UFRRJ, onde foram submetidos aos processamentos histológicos de rotina e histoquímicos com o Ácido Periódico + Reativo de Schiff (PAS) e Alcian Blue pH 2.5 (AB) para posteriormente a realização do estudo imuno-histoquímico. Histologicamente o estômago de *A. bimaculatus* apresentou duas regiões distintas (glandular e aglandular) e o intestino foi dividido em segmento anterior e posterior, sendo as regiões do estômago somente reativas ao PAS e o intestino reativo ao PAS e AB. No estudo imuno-histoquímico dos três tipos de células imunorreativas (IR) estudadas apenas células IR à 5-HT foram identificadas na região do estômago (epitélio e glândulas) e no intestino. Células IR à GAS e à SOM somente foram detectadas no estômago. Células IR à GAS somente foram detectadas nas glândulas gástricas. A distribuição regional e a frequência das células endócrinas variaram ao longo das regiões do TGI e também entre os espécimes de cada reservatório. Notou-se que não houve diferença histológica do TGI de *A. bimaculatus* quando comparados os três reservatórios e que este é compatível com seu hábito alimentar onívoro. Através do estudo imuno-histoquímico foi possível verificar que nas regiões do estômago de *A. bimaculatus* ocorreu uma frequência quase exclusiva dos três tipos de células endócrinas pesquisadas, podendo indicar que este órgão é o principal local de digestão dos alimentos desta espécie, sendo observado também que ocorreu similaridade quanto a quantidade e distribuição dessas células no TGI dos espécimes oriundos dos diferentes reservatórios.

Palavras chave: Células endócrinas, histologia, trato gastrintestinal, peixe, reservatórios.

Abstract

CARDOSO, Nathalia das Neves. **Histological, histochemical and immunohistochemical aspects of the gastrointestinal tract of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) in Reservoirs: Funil, Santa Cecilia and Ilha dos Pombos.** 2013. Dissertation (Master in Animal Biology). Institute of Biology Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

This study aimed to describe the histology and histochemistry of the stomach and gut of *A. bimaculatus* and analyze the presence of endocrine cells in the gastrointestinal tract (GIT) on the same species in three reservoirs of the Paraíba do Sul River (UHE Funil, UHE Santa Cecilia and UHE Ilha dos Pombos), order to compare the regional distribution and frequency of endocrine cells secreting somatostatin (SOM), gastrin (GAS) and serotonin (5-HT) in specimen of each environment. We used 12 specimens of each reservoir, which are collected using gillnets and sacrificed by hypothermia. After dissection occurred to the immediate removal of GIT. Subsequently, fragments of the stomach and gut were fixed for 8 hours in Bouin liquid and sent to the Laboratory of Histology and Embryology of UFRRJ, where they were subjected to histological processing and histochemical routine with periodic acid + reactive Schiff (PAS) and Alcian Blue pH 2.5 (AB) to posterior the realization of immunohistochemical study. Histologically the stomach of *A. bimaculatus* showed two distinct regions (glandular and non glandular) and gut was divided into anterior and posterior segment, being the only regions of the stomach and gut PAS reactive to reactive to PAS and AB respectively. In immunohistochemical study of three types of cells immunoreactive (IR) IR studied, only cells to 5-HT were identified in the stomach region (epithelia and glands) and gut. GAS cells to IR and SOM were only detected in the stomach. GAS cells to IR was detected only in the gastric glands. The regional distribution and frequency of endocrine cells varied across regions of the GIT and also among the specimens of each reservoir. It was noted that there was no difference in histological GIT of *A. bimaculatus* in the comparison of the three reservoirs and that it is compatible with your omnivorous. By immunohistochemistry we found that the regions of the stomach of *A. bimaculatus* occurred a frequency of almost exclusively three types of endocrine cells studied, which may indicate that this organ is the main site for digestion of food of this species, being also observed a similarity in the amount and distribution of these cells in the GIT of specimens coming from the different reservoirs.

Keywords: Endocrine cells, histology, gastrointestinal tract, fish, reservoirs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de <i>Astyanax bimaculatus</i> (Linnaeus, 1758).....	4
Figura 2: Fotos dos Reservatórios.....	12
Figura 3: Foto da coleta e preparação do material.....	13
Figura 4: Exemplar de <i>A. bimaculatus</i> com destaque para a localização dos órgãos na cavidade celomática.....	14
Figura 5: Tubo gastrintestinal de <i>A. bimaculatus</i>	14
Figura 6 (A-B): Fotomicrografias de comparação das porções da região glandular do estômago de <i>A. bimaculatus</i>	16
Figura 7 (A-C): Fotomicrografias da região gástrica de <i>A. bimaculatus</i>	17
Figura 8 (A-C): Fotomicrografias da região glandular do estômago de <i>A. bimaculatus</i>	18
Figura 9 (A-B): Fotomicrografias da região aglandular do estômago de <i>A. bimaculatus</i>	19
Figura 9 (C): Fotomicrografias da região aglandular do estômago de <i>A. bimaculatus</i>	20
Figura 10 (A-D): Fotomicrografias do intestino de <i>A. bimaculatus</i>	21
Figura 10E: Fotomicrografia do epitélio intestinal de <i>A. bimaculatus</i>	21
Figura 10 (F-I): Fotomicrografias do intestino de <i>A. bimaculatus</i>	22
Figura 10 (J-L): Fotomicrografias do intestino de <i>A. bimaculatus</i>	23
Figura 11 (A-B): Fotomicrografias do intestino de <i>A. bimaculatus</i> com parasito.....	24
Figura 12: Representação do método imunoenzimático ABC - peroxidase - Complexo avidina-biotina-enzima.....	31
Figura 13 (A-C): Fotomicrografias de células IR à serotonina na região glandular do estômago de <i>A. bimaculatus</i>	34
Figura 14 (A-C): Fotomicrografias de células IR à serotonina na região aglandular do estômago de <i>A. bimaculatus</i>	35
Figura 15 (A-B): Fotomicrografias de células IR à serotonina na região do intestino de <i>A. bimaculatus</i>	36
Figura 16: Fotomicrografias de células IR à somatostatina da região do estômago de <i>A. bimaculatus</i>	37

Figura 17 (A-C): Fotomicrografias de células IR à gastrina na região glandular do estômago de *A.bimaculatus*..... 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados sobre as coletas dos animais.....	13
Tabela 2: Análise histoquímica de glicosaminoglicanas no trato gastrintestinal de <i>A. bimaculatus</i>	23
Tabela 3: Distribuição e frequência de células endócrinas no trato gastrintestinal de <i>A. bimaculatus</i> (média \pm SD).....	40
Tabela 4: Intensidade das células endócrinas IR no trato gastrintestinal de <i>A. bimaculatus</i>	41

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 - Características morfológicas do estômago e intestino dos teleósteos em relação ao hábito alimentar.....	2
2.2 - Influências dos reservatórios sobre a comunidade de peixes.....	2
2.3 - Espécie analisada.....	3
2.4 - Peptídeos reguladores produzidos pelas células endócrinas a serem investigados.....	4
CAPÍTULO I - ASPECTOS HISTOLÓGICOS DO TUBO GASTRINTESTINAL DE <i>Astyanax bimaculatus</i> (LINNAEUS, 1758) (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)	6
Resumo	7
Abstract	8
1 – INTRODUÇÃO	9
2 – OBJETIVOS	10
2.1- Objetivo Geral.....	10
2.2 - Objetivos específicos.....	10
3 - MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 - Hidrossistemas selecionados para a realização do trabalho.....	11
3.2- Coleta do material.....	13
3.3- Análises de laboratório.....	15
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 – Estômago.....	16
4.2 – Intestino.....	20
5 – CONCLUSÃO	25
CAPÍTULO II - ESTUDO DE CÉLULAS ENDÓCRINAS NO TUBO GASTRINTESTINAL DE <i>Astyanax bimaculatus</i> (LINNAEUS, 1758) NOS RESERVATÓRIOS: DO FUNIL, SANTA CECÍLIA E ILHA DOS POMBOS	26

Resumo	27
Abstract	28
1- INTRODUÇÃO	29
2 – OBJETIVOS	30
2.1 - Objetivo Geral.....	30
2.2 - Objetivos Específicos.....	30
2.3 – Hipótese.....	30
3 - MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 - Estudo Imuno-histoquímico.....	31
3.2 - Observações e Fotomicrografias.....	32
3.3 - Análise quantitativa das células Imunorreativas.....	32
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 - Células imunorreativas a Serotonina (5-HT).....	33
4.2 - Células imunorreativas a Somatostatina (SOM).....	36
4.3 - Células imunorreativas a Gastrina (GAS).....	38
4.4 - Presença, distribuição e frequência de células endócrinas associadas aos ambientes estudados...	39
5 – CONCLUSÃO	42
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	51
Anexo 1 – Protocolo de imuno-histoquímica.....	51
Anexo 2 - Data sheet do Kit ABC.....	53
Anexo 3 - Data sheet do Anticorpo diluente.....	56
Anexo 4 - Data sheet do DAB.....	57
Anexo 5 - Data sheet do anticorpo anti-serotonina.....	58

Anexo 6 - Data sheet do anticorpo anti-somatostatina.....	60
Anexo 7 - Data sheet do anticorpo anti-gastrina.....	61

1- INTRODUÇÃO GERAL

Os peixes representam o grupo mais numeroso e diversificado entre os vertebrados com cerca de 25.000 espécies conhecidas, sendo a fauna de peixes da América do Sul uma das mais ricas do mundo, compreendendo cerca de 3000 espécies (BOHLKE *et al.*, 1978). A ordem Characiformes, com mais de 1500 espécies descritas até o momento, representa o grupo de peixes neotropicais com a maior variedade de formas e comportamentos (LÉVÊQUE *et al.*, 2008).

Segundo Agostinho *et al.* (2007) o isolamento geográfico do continente Sul-Americano e de algumas bacias de drenagem em épocas passadas, associado a uma grande diversidade de habitat (lagos, poças, riachos, corredeiras, rios, planícies inundadas), são fatores que contribuíram para o elevado número de espécies de peixes, à ampla variedade de forma do corpo e estratégias de vida observadas atualmente. A grande heterogeneidade encontrada nos rios da América do Sul reflete na diversidade morfológica, fisiológica e de atributos ecológicos e reprodutivos observados na fauna de peixes (LOWE-MCCONNEL, 1999). Assim, os peixes apresentam múltiplas variações da estrutura básica do trato gastrointestinal (TGI) dentre os vertebrados, as quais estão geralmente correlacionadas ao tipo de alimento consumido e ao ambiente, podendo influenciar a presença, posição, formato e tamanho de um órgão em particular (ROTTA, 2003).

Os processos gerais de digestão nos peixes têm sido pouco estudados quando comparados com os animais homeotérmicos, porém, as informações disponíveis sugerem que os peixes, de uma maneira geral, são semelhantes aos outros vertebrados quanto aos processos digestivos (FANGE & GROVE, 1979; LOVELL, 1989). Segundo Angelescus & Gneri (1949), cada tipo de regime alimentar corresponde a características definidas do sistema digestório, ou em alguns de seus órgãos, de acordo com o grau de especialização, podendo o hábito alimentar se modificar, em uma mesma espécie de acordo com o habitat, a natureza do alimento, a estação do ano, a idade ou o sexo (CASTRO *et al.*, 2003).

O trato gastrointestinal dos animais é o local onde ocorrem os processos de digestão do alimento ingerido e de absorção de nutrientes pela mucosa intestinal. Estes eventos são regulados por intermédio de ações dos sistemas nervosos gastroentérico e endócrino (GUYTON & HALL, 2008). As células endócrinas gastrointestinais que se encontram dispersas ao longo do epitélio de revestimento, nas glândulas gástricas e intestinais sintetizam vários tipos de polipeptídios e aminas biologicamente ativas (SANTOS, 2007). Supõe-se que mais de cem substâncias reguladoras sejam secretadas pela mucosa gastrointestinal (HADLEY & LEVINE, 2009), podendo o trato gastrointestinal ser denominado também de maior órgão endócrino do organismo (THOMPSON *et al.*, 1987; AHLMAN & NILSSON, 2001).

Em peixes, assim como em outros vertebrados, já foi demonstrado que os processos digestivos tais como, motilidade, secreção e absorção são modulados pelo sistema neuroendócrino difuso (HERNÁNDEZ *et al.*, 2012). Assim, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a presença de células endócrinas deste sistema no tubo gastrointestinal do peixe *A. bimaculatus* coletados em três reservatórios do rio Paraíba do Sul (Usina Hidrelétrica - UHE do Funil, UHE de Santa Cecília e UHE de Ilha dos Pombos), bem como descrever histologicamente o TGI da espécie analisada.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Características morfológicas do estômago e intestino dos teleósteos em relação ao hábito alimentar

Segundo Makino (2010), muitos autores estudaram a morfologia do sistema digestório e sua relação com os hábitos alimentares dos peixes, tornando possível conhecer o regime alimentar de uma espécie a partir das diferenças anatomofisiológicas do tubo digestivo, fato que fica evidenciado quando se observa os formatos variados do estômago ou os diferentes comprimentos do intestino, conforme sejam herbívoros, carnívoros, onívoros ou detritívoros (iliófagos). Entretanto, a maioria dos peixes é pouco especializada nos seus hábitos alimentares, isto é, são generalistas, uma condição necessária para ingerir, digerir e absorver os diferentes tipos de alimentos, explorando uma grande diversidade de itens alimentares disponíveis (ROTTA, 2003).

O estômago nos peixes pode ser bastante diferenciado quanto ao formato, sendo alongado nos piscívoros, como um saco sifonóide nos onívoros e apresentar-se como uma moela, sem glândulas, destinada à trituração nos iliófagos, como ocorre nos curimbas e saguirus (GODINHO, 1970). De acordo com Rotta (2003) o estômago funciona de modo a armazenar temporariamente o alimento, desempenhando também funções mecânicas que auxiliam na trituração e no início da digestão.

Em peixes, o tamanho do estômago pode ser frequentemente relacionado com o intervalo entre as refeições e com o tamanho das partículas do alimento ingerido. Portanto, espécies que consomem grandes presas em intervalos esparsos possuem estômago grande e aqueles que se alimentam de pequenas partículas geralmente tem estômago pequeno ou este não existe (peixes agástricos) (ROTTA, 2003).

No intestino, as modificações anatômicas referentes ao comprimento do órgão também dependem do hábito alimentar da espécie. Deste modo peixes com hábito alimentar herbívoro apresentam o intestino longo e enovelado, os peixes carnívoros possuem o intestino curto, enquanto nas espécies onívoras o intestino é intermediário (GRACIANO, 2012). Segundo Rotta (2003) outros fatores, que não a dieta, podem influenciar no comprimento deste órgão, como por exemplo, os intestinos que possuem dobras ou outras estruturas que aumentem a superfície de absorção usualmente são menores que aqueles que não as possuem. O comprimento do intestino também pode ser maior em peixes que se alimentam de um modo mais esparsos do que aqueles se alimentam com mais frequência. Algo que cabe ressaltar é que em alguns peixes, o intestino além das funções de digestão e de absorção, pode desempenhar outras funções, como auxiliar na osmorregulação ou na respiração (ROTTA, 2003).

2.2 - Influências dos reservatórios sobre a comunidade de peixes

Diversos trabalhos abordam os efeitos das ações antropogênicas sobre o curso dos rios e suas consequências sobre as comunidades ícticas (MERONA, 1987; ARAUJO *et al.*, 2001; ARAUJO & NUNAN, 2005; DUARTE, 2007; AGUIAR, 2008). A construção de barragens contribui muito para o aumento desses efeitos nos sistemas hídricos, especialmente devido à fragmentação do habitat com implicações diretas na biodiversidade e na biologia das espécies. No Brasil estas construções têm sido cada vez mais frequentes, sobretudo em represas com desígnios hidrelétricos. Além da geração de energia o represamento promove, secundariamente, o controle de cheias, cria

oportunidades de recreação, turismo, navegação continental, aquicultura e fornece suprimento de água (TUNDISI, 2003; OLDANI *et al.*, 2007).

Apesar dos benefícios para os seres humanos as barragens exercem grandes influências sobre a natureza, modificando fortemente o ecossistema dos rios, diminuindo a qualidade da água pela alteração no regime de cheias, aumentando a sedimentação e mudando o fluxo de nutrientes (JEFFRIES & MILLS, 1994). Essas mudanças geram impactos ecológicos, que incluem alterações na morfologia dos canais, dissociação com as planícies de inundação, desconexão de teias alimentares, fragmentação e perda de habitat (LEVIN & TOLIMIERI, 2001). Esses impactos gerados influenciam diretamente nas comunidades de peixes devido à diminuição da riqueza e da diversidade de espécies (MÉRONA *et al.*, 2005), afetando principalmente as espécies migratórias, por constituírem obstáculos para a livre movimentação dos peixes e dificultarem o acesso destas espécies às áreas de recrutamento e desova (AGOSTINHO *et al.*, 2003; GILLETTE *et al.*, 2005).

Segundo Agostinho (1999) em reservatórios recém-formados, a ocorrência de alterações no comportamento alimentar dos peixes é esperada, principalmente em função da incorporação de material terrestre ao sistema aquático. Para a comunidade de peixes, o resultado inevitável desses empreendimentos hidrelétricos é a alteração na abundância das espécies com a eventual eliminação de alguns componentes ictiofaunísticos. Visto que as assembleias de peixes atuais em um reservatório é resultante da colonização feita por aquela anteriormente existente no rio, espécies naturalmente em baixa densidade podem encontrar condições favoráveis e proliferarem, enquanto outras, que não tenham no novo ambiente as condições adequadas para satisfazerem suas necessidades ecológicas, podem ter sua abundância reduzida, ou mesmo, serem eliminadas (AGOSTINHO *et al.*, 1992).

2.3 - Espécie analisada

Sistemática do peixe utilizado:

Filo: Chordata (Bateson, 1885)

Subfilo: Vertebrata (Cuvier, 1812)

Classe: Actinopterygii (Klein, 1885)

Superordem: Ostariophysii (Rosen & Greenwood, 1970)

Ordem: Characiformes (Regan, 1911)

Família: Characidae

Espécie: *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758)

- *Astyanax bimaculatus* (**Figura 1**) – Espécie de peixe popularmente conhecida como lambari ou piaba que pertence a uma das maiores e mais complexa família de peixes neotropicais. Tamaña diversidade e complexidade têm dificultado os pesquisadores a compreenderem melhor o grau de parentesco entre as espécies de *Astyanax*. Este gênero é formado por peixes com grande diversidade nas bacias da América do Sul, apresentando mais de 80 espécies de lambaris. Estes habitam diversos ambientes aquáticos, como rios, riachos, lagoas e represas, apresentando também hábito alimentar bem variado, alimentando-se tanto de recursos de origem alóctone (frutos, semente e insetos terrestres) quanto de origem autóctone (insetos e vegetais aquáticos, escamas,

ovócitos, entre outros). *A. bimaculatus* é uma espécie de pequeno porte, que atinge no máximo 200 mm de comprimento apresentando uma mancha na região umeral (próxima à nadadeira peitoral), com forma ovalada e posição horizontal. (Fonte: www.museudezoologia.ufv.br/bichodavez/edicao10.pdf).



Figura 1: Exemplar de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758).

2.4 - Peptídeos reguladores produzidos pelas células endócrinas a serem investigados

Serotonina - A 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina é um neurotransmissor sintetizado por neurônios serotoninérgicos do sistema nervoso central e pelas células enterocromafins do tubo gastrointestinal, que constituem uma ampla população neste tubo e produzem mais de 90% da serotonina sintetizada no corpo (AHLMAN & NILSSON, 2001). Este hormônio tem uma ação moduladora geral da conduta afetiva associada a ações sobre a cognição e comportamentos homeostáticos. A serotonina é conhecida por estimular a contração da musculatura lisa do aparelho gastroentérico e provocar a secreção exócrina (CECCARELLI *et al.*, 1995), além de estimular os neurônios mioentéricos promovendo respostas vasodilatadoras na submucosa (VANNER, 2000). Esta também age aumentando a motilidade intestinal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Gastrina - A gastrina (GAS) é o maior regulador fisiológico hormonal da secreção de suco gástrico e também possui importante papel na promoção do crescimento da mucosa gástrica (JOHNSON *et al.*, 1975). A gastrina é sintetizada pelas células G que estão localizadas nas glândulas gástricas, da região do antro pilórico e no duodeno. Este hormônio tem como principal função estimular a secreção de ácido clorídrico e de pepsinogênio pela mucosa gástrica, também estimula a contração do músculo liso, aumenta a circulação sanguínea e secreção de água pelo estômago e intestino (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Somatostatina - A somatostatina é um mensageiro químico secretado pelas células D, presentes no estômago (região do antro pilórico), intestino e pâncreas (RODRIGUES, *et al.*, 2005). Recebeu esta denominação por sua capacidade de inibir a liberação do hormônio de crescimento (somatotrofina). Elevadas concentrações de somatostatina foram detectadas no pâncreas, estômago e duodeno (ARIMURA *et al.*, 1975) esta tem função inibidora em muitos órgãos como tireóide, pâncreas, estômago e vesícula biliar, inibindo também a liberação de hormônios pelas células enteroendócrinas em sua vizinhança. A somatostatina atua nas células produtoras de gastrina e nas células semelhantes às enterocromafins inibindo a liberação de suas secreções (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

CAPÍTULO I

ASPECTOS HISTOLÓGICOS E HISTOQUÍMICOS DO TUBO GASTRINTESTINAL DE *Astyanax bimaculatus* (LINNAEUS, 1758) (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)

Resumo

CARDOSO, Nathália das Neves. **Aspectos histológicos e histoquímicos do tubo gastrintestinal de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Characiformes, Characidae)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

A morfologia do tubo gastrintestinal (TGI) e sua relação com os hábitos alimentares têm sido descrita em várias espécies de peixes. O presente estudo visou descrever as características histológicas do estômago e intestino de *Astyanax bimaculatus*, buscando fornecer subsídios para a compreensão de seu regime alimentar. Foram selecionados 36 exemplares de *A. bimaculatus*, oriundos de três hidrossistemas do trecho médio do rio Paraíba do Sul (UHE de Funil, Ilha dos Pombos e Complexo Santa Cecília). Os animais foram coletados e sacrificados por hipotermia. Posteriormente, fragmentos do estômago e intestino foram fixados por 8 horas em líquido de Bouin e encaminhados para o Laboratório de Histologia e Embriologia da UFRRJ, onde foram submetidos a técnicas histológicas de rotina. Para a análise histológica, foi utilizada a técnica de coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE) e as técnicas histoquímicas do Ácido Periódico + Reativo de Schiff (PAS) e Alcian Blue pH 2.5 (AB). O estômago de *A. bimaculatus* apresentou duas regiões histologicamente distintas. Região glandular com pregas e fossetas gástricas e região aglandular somente com fossetas gástricas. O epitélio do estômago é simples cilíndrico mucossecretor, reativo ao PAS. A muscular da mucosa está ausente. O intestino foi dividido em anterior com pregas delgadas e poucas células caliciforme e posterior com pregas espessas e muitas células caliciformes. O epitélio intestinal é cilíndrico simples com planura estriada e células caliciformes reativas ao PAS e ao AB. As camadas observadas no estômago e no intestino foram: mucosa, submucosa, muscular e serosa. Foi observada a presença de parasito no intestino de *A. bimaculatus* nas regiões de Funil e Ilha dos Pombos. Notou-se que não houve diferença histológica do TGI de *A. bimaculatus* quando comparado os três reservatórios e que este é compatível com seu hábito alimentar onívoro.

Palavras-Chave: Histologia, trato gastrintestinal, peixe de água doce, *Astyanax*.

Abstract

CARDOSO, Nathália das Neves. **Histological and histochemical aspects of the digestive tract of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Characiformes, Characidae)**. 2013. Dissertation (Master in Animal Biology). Institute of Biology Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The morphology of the gastrointestinal tract (GIT) and your relation of dietary habits have been described in several species of fish. This study aimed to describe the histological features of the stomach and gut of *Astyanax bimaculatus*, seeking to aid the understanding of their diet. We selected 36 specimens of *A. bimaculatus*, from three reservoirs of the middle of the Paraíba do Sul River (UHE Funil, UHE Santa Cecília and UHE Ilha dos Pombos). The animals were collected and euthanized by hypothermia. Subsequently, fragments of the stomach and gut were fixed for 8 hours in Bouin liquid and sent to the Laboratory of Histology and Embryology UFRRJ, where they underwent routine histological techniques. For histological analysis, we used the technique of staining with hematoxylin and eosin (HE) and the histochemical periodic acid + Schiff (PAS) and Alcian Blue pH 2.5 (AB). The stomach of *A. bimaculatus* presented two histologically distinct regions. Region with glandular folds and foveolar region and aglandular only foveolar. The epithelium of the stomach is simple cylindrical mucinous, reactive to PAS. The muscular mucosae is absent. The gut was divided into anterior and thin folds with few goblet cells and later with thick folds and many goblet cells. The intestinal epithelium is simple with plain cylindrical grooved and goblet cells reactive to PAS and AB. The layers observed in stomach and gut were mucosa, submucosa, muscle and serosa. It was observed the presence of the parasite in the gut of *A. bimaculatus* regions Funil and Ilha dos Pombos. It was noted that there was no difference in histological GIT *A. bimaculatus* compared in the three reservoirs and that is compatible with your omnivorous aspect.

Keywords: Histology, gastrointestinal tract, freshwater fish, *Astyanax*.

1 – INTRODUÇÃO

Dentre os grupos de vertebrados, os peixes possuem o mais simples ou menos diferenciado sistema digestório, em concordância com sua posição na escala evolutiva (DE SILVA & ANDERSON, 1995). Entretanto, devido a uma grande variedade dessas espécies no meio ambiente, o trato gastrintestinal de peixes tende a apresentar uma ampla diferenciação morfofisiológica, decorrente da abundância de habitat e comportamentos alimentares, despertando assim o interesse de vários autores a fim de pesquisarem mais sobre as diversas formas e funções dos órgãos do sistema digestório de diferentes espécies de peixes (SEIXAS FILHO, 2001a; DIAZ *et al.*, 2003; HERNÁNDEZ *et al.*, 2009; BORGES *et al.*, 2010).

O gênero *Astyanax* é considerado um dos mais comuns da subfamília Tetragonopterinae e os peixes deste gênero são classificados como de baixo valor comercial, embora tenham importância como espécies forrageiras para diversos predadores. De acordo com Esteves (1996), nos últimos anos, diferentes aspectos da biologia desses peixes vêm sendo estudado, bem como a alimentação. Esse autor também relata que a maior parte destes estudos no Brasil tem sido realizados em ambientes como reservatórios, onde os hábitos alimentares da espécie provavelmente foram alterados.

Sabe-se que o canal alimentar dos teleósteos apresentam diferenças consideráveis entre as espécies, contudo algumas características básicas mostram semelhanças estruturais. A ocorrência de células mucosas é algo comum no trato digestivo dos peixes. No entanto as mucosubstâncias secretadas diferem tanto de espécie para espécie quanto ao longo do canal alimentar desses animais. Segundo Reid *et al.*, (1988) a presença de glicoproteínas está correlacionada com funções diferentes, tais como a lubrificação, proteção contra degradação proteolítica e inibição de micro-organismos.

Conforme Végaz-Velez (1972) e Fugi & Hahn (1991), os estudos histológicos, fornecem subsídios para a caracterização dos órgãos do sistema digestório, de forma que possam ser melhor compreendidos a fisiologia e o hábito alimentar da espécie a ser estudada. Estes estudos também podem auxiliar em avaliações de impacto ambiental, bem como revelar muitas peculiaridades que dependem do ambiente ou da evolução filogenética (MOTTA, 1988).

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Descrição histológica e histoquímica do TGI da espécie *A. bimaculatus* buscando relacionar as características encontradas com o hábito alimentar desta espécie.

2.2 - Objetivos específicos

- Investigar as características histológicas dos tipos celulares da mucosa do TGI de *A. bimaculatus*, visando obter informações que ajudem no estudo imuno-histoquímico do presente trabalho.

- Avaliar através da histoquímica as mucosas do estômago e intestino para detecção de glicosaminoglicanas (neutras e ácidas) e relacioná-las com as funções exercidas.

- Analisar comparativamente as características histológicas e histoquímicas observadas no TGI dos peixes provenientes dos três hidrossistemas.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Hidrossistemas selecionados para a realização do trabalho

Os espécimes foram coletados no trecho médio do rio Paraíba do Sul, situado entre os municípios Cachoeira Paulista (SP) e São Fidélis (RJ) na área de influência das Usinas Hidrelétricas - UHE do Funil (22°31'44"S 44°34'6"W), Complexo Santa Cecília (22°28'53"S 43°50'23"W) e UHE de Ilha dos Pombos (21°50'37"S 42°34'46"W), a primeira administrada por FURNAS Centrais Elétricas e as duas últimas pela LIGHT Serviços de Eletricidade S/A.

- **Reservatório do Funil:** A maior parte do reservatório do Funil localiza-se nos municípios de Itatiaia e Resende - RJ, recebendo uma elevada carga de poluentes oriundos de cidades de médio a grande porte, situadas no vale paulista do rio Paraíba do Sul, sendo este hidrossistema altamente comprometido devido a alta carga de poluentes procedentes das áreas altamente industrializadas. Este reservatório é considerado bem definido quanto a ambientes lênticos e lóticos quando comparado aos reservatórios de Santa Cecília (pouco definido) e Ilha dos Pombos (pouquíssimo definido).

- **Reservatório de Santa Cecília:** A Barragem de Santa Cecília localiza-se no município de Barra do Piraí - RJ. Operando desde 1952, possui 17,2 km de extensão. No segmento da barragem que se mantém permanentemente aberto mantendo uma conexão com o rio, a velocidade de fluxo é aumentada para cerca de 5 m³/s, o que pode ser uma barreira para migração de peixes rio acima.

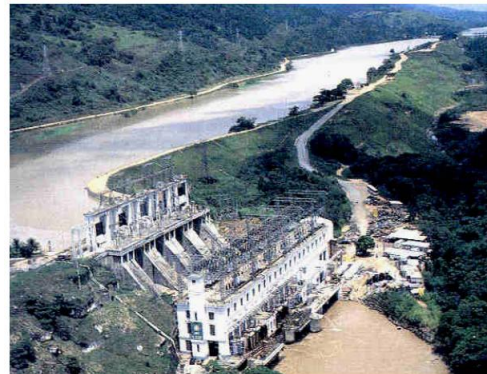
- **Reservatório de Ilha dos Pombos:** A UHE de Ilha dos Pombos teve operação iniciada em 1924, localiza-se no município de Carmo - RJ e apresenta um reservatório à “fio de água”, possuindo um mecanismo de transposição de peixes (escada de peixes). A área represada é de apenas 4,1 km² e tem 32 m de profundidade média (ARAÚJO & NUNAN, 2005).



Reservatório do Funil - <http://www.feema.rj.gov.br/popup-reservatorio->



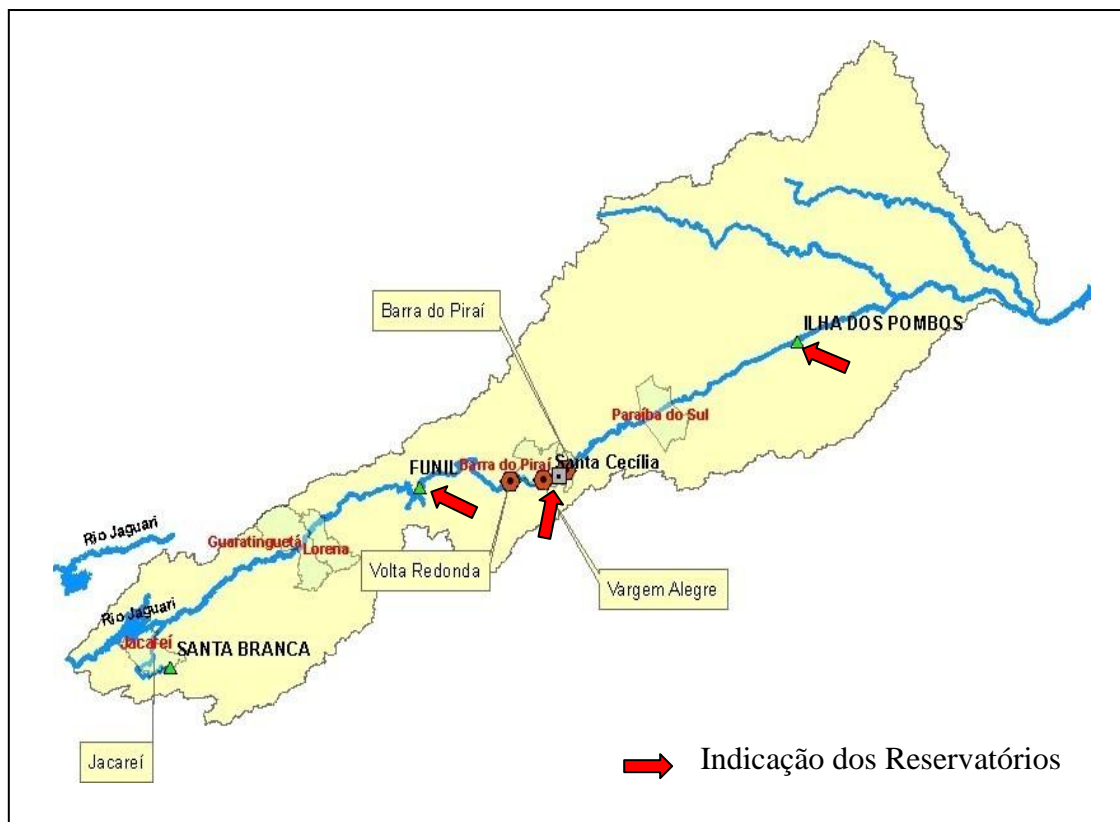
Reservatório de Santa Cecília



Reservatório de Ilha dos Pombos

Fonte: www.acrj.org.br/IMG/pdf/doc-565.pdf

Figura 2: Fotos dos Reservatórios.



Mapa 1. Localização geográfica dos Hidrossistemas selecionados para a realização do trabalho. Fonte: www.arquivos.ana.gov.br/saladesituacao/.../InfEspecial20100126.ppt

3.2 - Coleta do material

No presente trabalho foram analisados espécimes adultos de *A. bimaculatus*, provenientes de todos os reservatórios (Tabela 1).

Tabela 1: Dados sobre as coletas dos animais.

	Regiões de coleta		
	Reservatório do Funil	Reservatório de Santa Cecília	Reservatório de Ilha dos Pombos
Inverno/2010	06	06	06
Inverno/2011	06	06	06
Total	12	12	12

Os peixes foram coletados nestes reservatórios através de parceria com pesquisadores do Laboratório de Ecologia de Peixes do Departamento de Biologia Animal (DBA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) (Figura 3).



Figura 3: Foto da coleta/inverno 2010 e preparação do material no reservatório de Santa Cecília.

Os peixes coletados foram sacrificados por hipotermia e após a dissecação ocorreu à imediata remoção do tubo gastrintestinal (Figuras 4 e 5). Fragmentos do estômago e do intestino foram fixados em líquido de Bouin por 8 horas e posteriormente lavados e conservados em álcool etílico a 70%.



Figura 4: Exemplar de *A. bimaculatus* com destaque para a localização dos órgãos na cavidade celomática sendo **A:** bexiga natatória, **B:** intestino, **C:** estômago e **D:** gônada.



Figura 5: Tubo gastrintestinal de exemplar de *A. bimaculatus*.

3.3 - Análises de laboratório

O material coletado e fixado foi encaminhado para o Laboratório de Histologia e Embriologia da UFRRJ, onde foi clivado em seções transversais e longitudinais e submetidos aos processamentos histológicos de rotina que inclui: desidratação (em uma série crescente de etanol - 70° GL a 100° GL), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em Histosec (Merck, Darmstadt, Germany) para obtenção de cortes de 5 µm espessura. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para o exame do tubo gastrintestinal e por Tricrômico de Mallory (TM) para observação de tecido colágeno. Os cortes também foram submetidos aos métodos histoquímicos do PAS e do Alcian Blue (AB) pH 2.5, para detecção de glicosaminoglicanas (GAG's) neutras e ácidas, respectivamente. Todas as lâminas confeccionadas foram observadas e fotografadas com câmera digital Sony Cybershot DSCW 230 acoplada ao microscópio Olympus BX41.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Estômago

As análises histológicas evidenciaram que, ao longo do trato gastrointestinal de *A. bimaculatus*, pode-se observar a presença de quatro distintas camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa, similar ao descrito em outros teleósteos (MONTENEGRO, 2009; HERNÁNDEZ *et al.*, 2009). Ainda sob o ponto de vista histológico o estômago da espécie estudada difere da grande maioria dos teleósteos, sendo possível distinguir claramente apenas duas regiões; glandular e aglandular. Esta terminologia foi adotada devido ao fato de não haver uma diferenciação histológica bem definida entre as regiões cárdica, fúndica e pilórica do estômago de *A. bimaculatus* (Figuras 6A e 6B), assim essas foram agrupadas como região glandular. Resultado similar também foi observado em *Scomberomorus cavallae* (ALVES & TOMÉ, 1966) e em *Engraulis anchoita* (DIAZ, 2003), sendo que nessa última espécie as glândulas foram escassas na região pilórica.

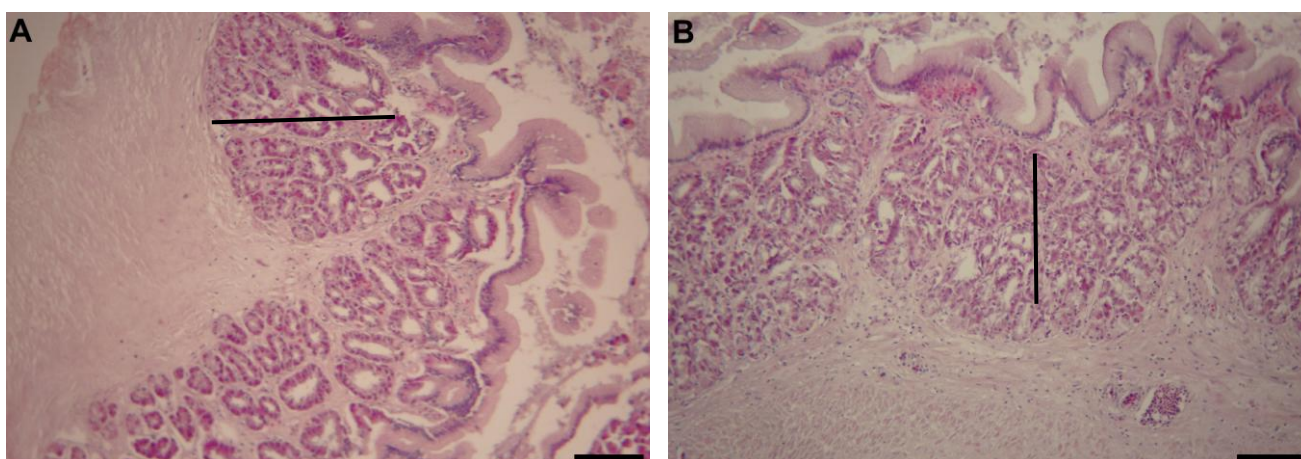


Figura 6 (A-B). Fotomicrografias da região glandular do estômago de *A. bimaculatus*: (A) porção inicial do estômago glandular (B) porção final do estômago glandular. Destaque para as glândulas na camada mucosa (**Reta**). HE. Barra de 100 µm.

O revestimento da camada mucosa do estômago de *A. bimaculatus*, é constituído por um epitélio simples, cilíndrico, mucossecretor e com núcleos basais (Figura 7A), característico na maioria dos teleósteos (SANTOS *et al.*, 2007, HERNANDEZ *et al.*, 2009, VIEIRA, 2010) Nesta camada pode-se observar a presença de fossetas (Figuras 7B e 7C) as quais vão se tornando progressivamente mais profundas, em direção à região aglandular do estômago. Resultado semelhante foi encontrado por Castro *et al.* (2003) em *Prochilodus marggravii*, *Salminus brasiliensis* e *Leporinus reinhardtii*.

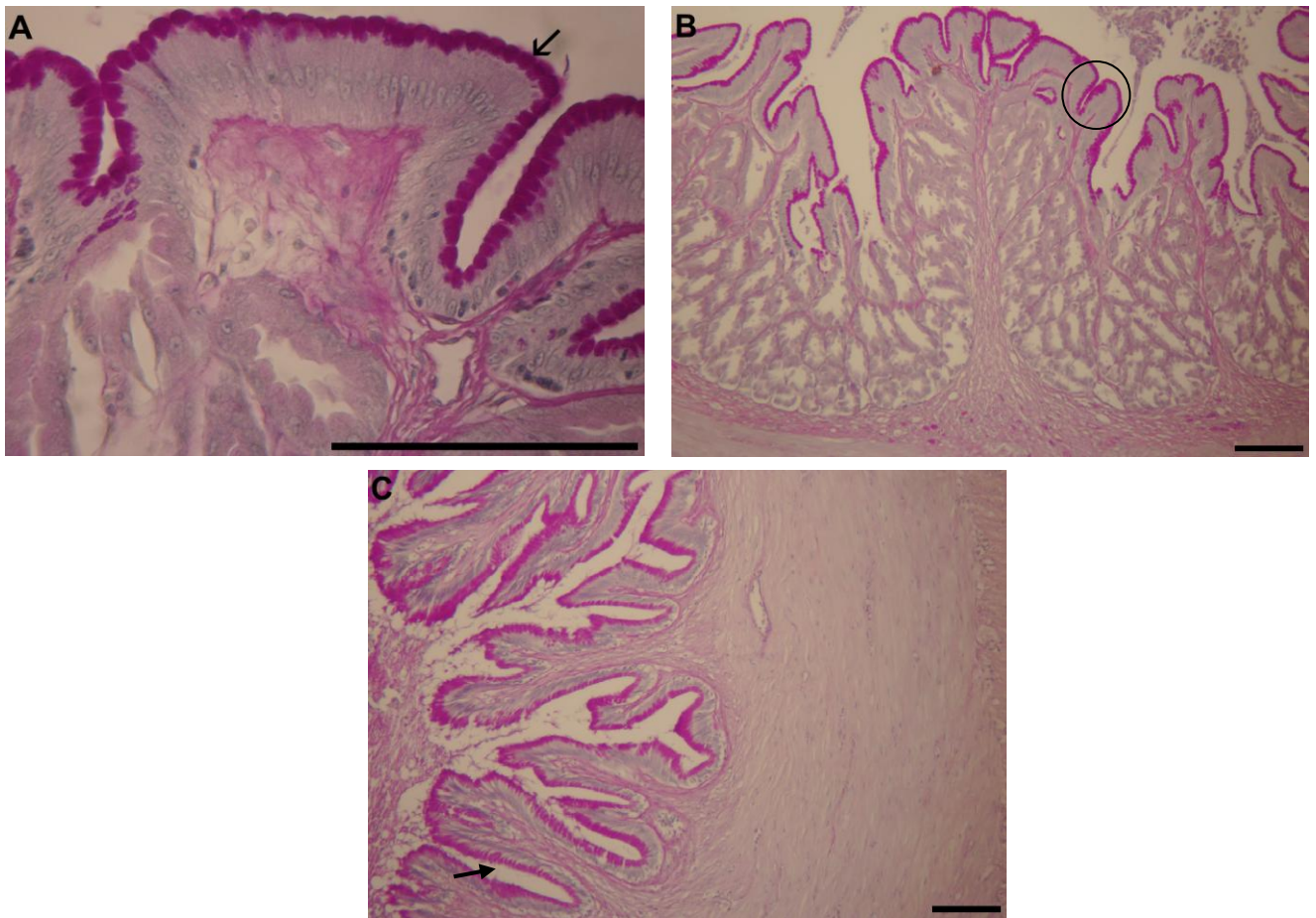


Figura 7 (A-C). Fotomicrografias da região gástrica de *A. bimaculatus*: (A) Epitélio de revestimento do estômago, sendo cilíndrico simples mucosecretor (**seta**) (B) Região glandular com fossetas gástricas rasas (**círculo**). (C) Região aglandular com fossetas gástricas de grande profundidade (**seta**). PAS. Barra de 100

- **Região Glandular** – O estômago glandular apresentou a mucosa bem desenvolvida com pregas baixas, pouco numerosas, espessas e arredondadas, (Figura 8A) com fossetas rasas revestidas por epitélio cilíndrico simples mucosecretor e com glândulas gástricas ocupando toda a lâmina própria. Segundo Stoskopf (1993) em peixes as glândulas gástricas não são constituídas de células principais e parietais, como no estômago de mamíferos; nelas existem células oxintopépticas, secretoras de ácido clorídrico e enzimas digestivas, e células enteroendócrinas, produtoras de hormônios (FRANCO, 1994). Quanto ao formato das pregas, Menin & Mimura (1992) em um estudo comparativo do estômago de três peixes teleosteos de hábito alimentar onívoro, afirmaram que a presença de pregas espessas na região do estômago tem a função de armazenar grandes volumes de alimento ingerido por estes peixes.

As células mucosecretoras do epitélio mostram-se muito reativas ao PAS (Figura 8B), porém não reagiram ao AB resultado similar ao encontrado por Castro *et al.* (2003), Hernández *et al.* (2009) e Vieira (2010). De acordo com Grau *et al.* (1992) a secreção de mucosubstâncias neutras no epitélio do estômago pode estar relacionado com a absorção de moléculas facilmente digeríveis. Por outro lado, essas

mucosubstâncias podem facilitar a circulação de grandes partículas de alimentos, bem como a proteção da mucosa contra os danos mecânicos (PETRINEC *et al.*, 2005).

Assim como relatado por Moraes *et al.* (1997) e Castro *et al.* (2003), em outras espécies de peixes, a muscular da mucosa também encontra-se ausente em *A. bimaculatus*. A camada submucosa de tecido conjuntivo frouxo é rica em fibras conjuntivas e vasos sanguíneos e não apresenta glândulas. Já a camada muscular é composta por duas camadas de fibras musculares lisas, sendo a interna circular e a externa longitudinal (Figura 8C), resultado análogo ao encontrado em *Pimelodus maculatus* (SANTOS *et al.*, 2007) e *Oligosarcus hepsetus* (VIEIRA, 2010). Externamente observa-se a camada serosa.

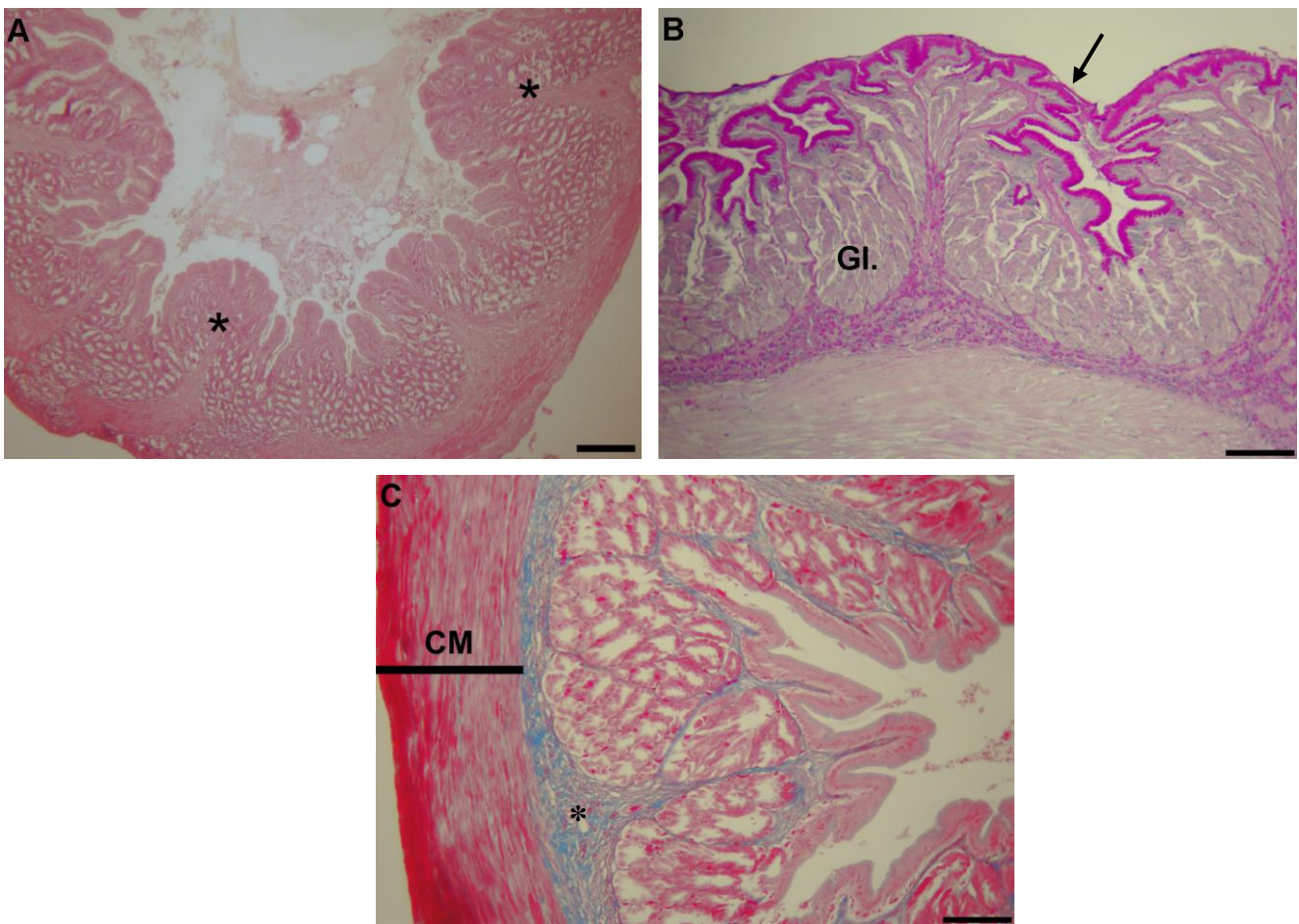


Figura 8 (A-C). Fotomicrografias da região glandular do estômago de *A. bimaculatus*: (A) Visão geral da região glandular com destaque para a presença de pregas curtas e espessas (*). HE. (B) Camada mucosa evidenciando GAG's neutras (*seta*) nas células mucossecretoras do epitélio e a presença de glândulas gástricas (GL) na lâmina própria. PAS. (C). Camada submucosa evidenciando a presença de tecido colágeno (*) e camada muscular (CM). Barra de 100 μ m.

- **Região Aglandular** – Diferente do observado na região glandular, a mucosa desta região, em conjunto com a submucosa não formam pregas longitudinais, apresentando fossetas extremamente profundas e ausência de glândulas gástricas na lâmina própria (Figura 9A). As células mucossecretoras do epitélio cilíndrico simples assim como na região anterior reagiram positivamente somente ao PAS (Figura 9B), não reagindo ao AB indicando a presença exclusiva de GAG's neutras. Nesta região também, não se observou a muscular da mucosa.

A camada submucosa é constituída de tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos. Já a camada muscular é mais espessa quando comparada com a da região glandular (Figura 9C). Esse padrão também foi observado por Castro *et al.* (2003) em três espécies de peixes com hábitos alimentares diferentes e também por Borges *et al.* (2010) na espécie carnívora *Epinephelus marginatus*. Esta camada é composta por três subcamadas de fibras musculares lisas orientadas nos sentidos oblíquo, circular e longitudinal (Figura 9C), como o observado por Hernandez *et al.* (2009). Externamente encontra-se a camada serosa.

Segundo Moraes *et al.* (1997) a existência da camada muscular circular bastante desenvolvida no estômago indica a atuação desta na maceração do bolo alimentar. Já Castro *et al.* (2003), após observar algo similar no estômago de outras espécies de peixes, afirmou que a espessura desta camada pode estar associada ao possível controle da saída e separação do material digerido para o intestino.

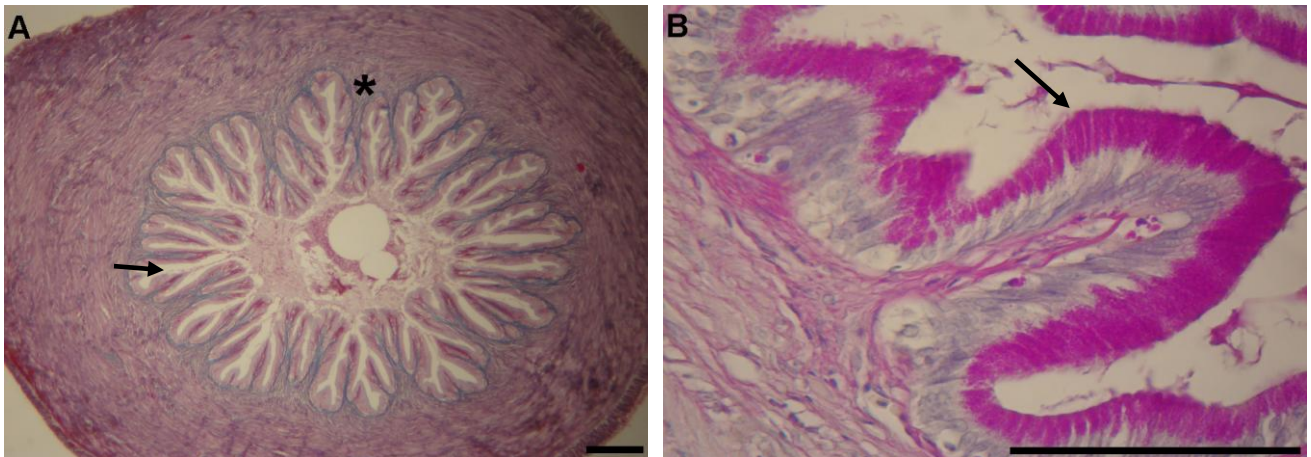


Figura 9 (A-B). Fotomicrografias da região aglandular do estômago de *A. bimaculatus*: **(A)** Visão geral da região aglandular evidenciando fossetas profundas (**seta**) e ausência de glândulas na lâmina própria (*). TM. **(B)** Epitélio com presença de GAG's neutras (**seta**) nas células mucossecretoras do epitélio. PAS. Barra de 100 µm.



Figura 9 (C). Fotomicrografia da região aglandular do estômago de *A. bimaculatus*: (C) Camada muscular ressaltando a divisão das três subcamadas, com fibras no sentido oblíquo (1) circular (2) e longitudinal (3). HE. Barra de 100 μm .

4.2 - Intestino

Histologicamente o intestino de *A. bimaculatus* foi semelhante ao descrito para outras espécies de peixes teleósteos (CLARKE & WITCOMB, 2006; ATENCIO *et al.*, 2008). No presente trabalho, o intestino foi dividido em dois segmentos distintos: anterior e posterior. Segundo Vernier (1990), essa diferenciação regional do intestino de teleósteos está diretamente ligada à absorção de algumas substâncias, onde os lipídios e proteínas são absorvidos de acordo com processos convencionais no intestino anterior e as proteínas são absorvidas de forma macromolecular no intestino posterior.

No intestino de *A. bimaculatus* pode-se observar que o padrão das pregas em cada segmento varia de forma sutil, sendo mais complexo na porção anterior desse órgão. De acordo com Stoskopf (1993), nos teleósteos a porção posterior do intestino é de difícil identificação, no entanto, algumas vezes, o relevo de sua mucosa é um pouco mais simples do que o da mucosa da porção anterior. No presente estudo, observou-se que as pregas da mucosa no segmento anterior são mais numerosas, delgadas e alongadas (Figura 10A). Já no segmento posterior as pregas são mais espessas, em menor quantidade (Figura 10B) e apresentam mais células caliciformes, quando comparado com o segmento anterior (Figuras 10C e 10D). Este aumento de células caliciformes observado na porção posterior pode estar relacionado com a assimilação de íons e fluidos que ocorrem neste local, como mencionado por Petrinc *et al.* (2005). Outros dois autores Khanna & Mehrotra (1971) também sugerem que a maior quantidade destas células pode facilitar a eliminação do bolo alimentar.

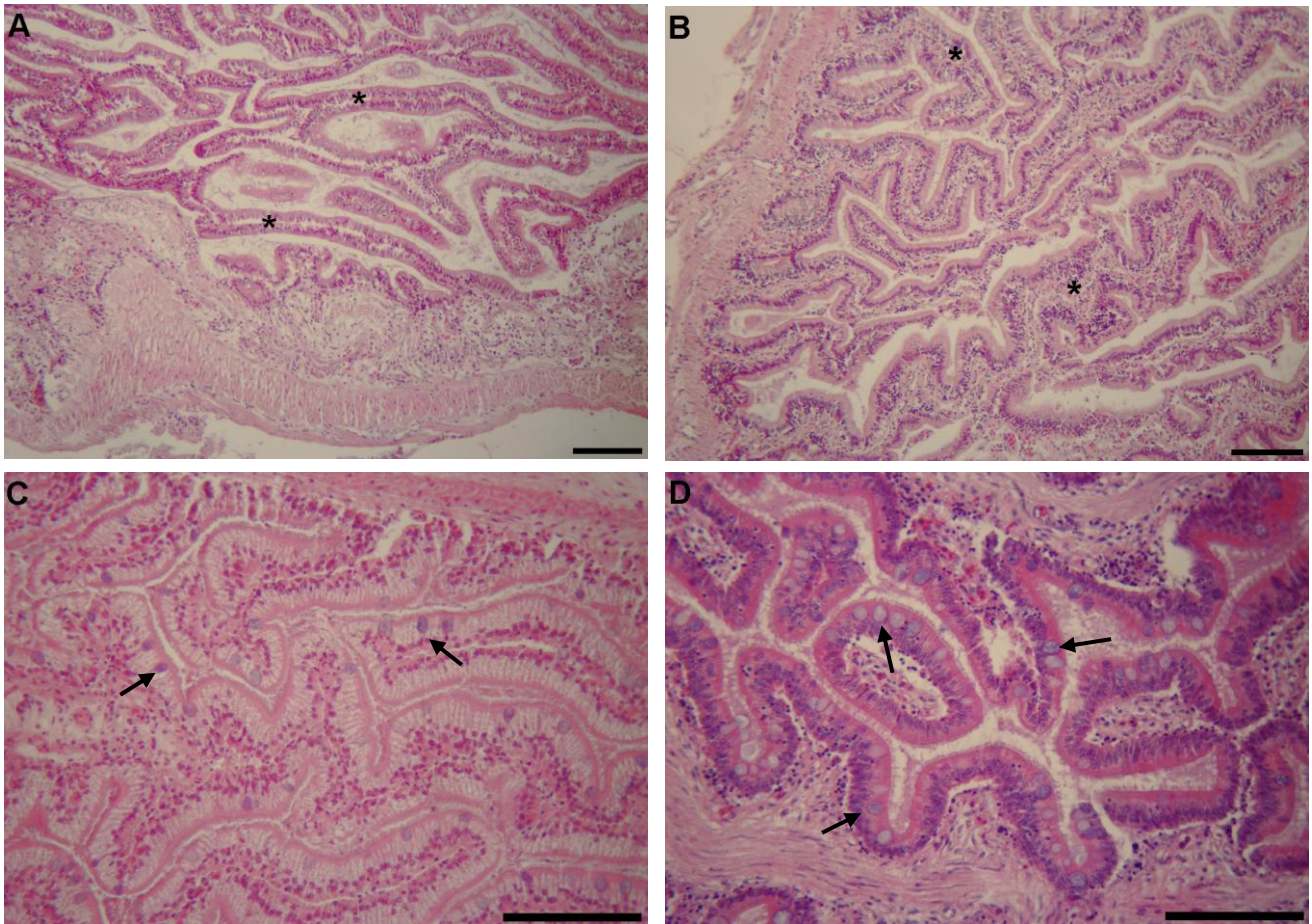


Figura10 (A-D). Fotomicrografias do intestino de *A. bimaculatus*: (A) Visão geral do intestino anterior com destaque para as pregas delgadas (*). (B) Visão geral do intestino posterior caracterizado por pregas espessas (*). (C) Intestino anterior com poucas células caliciformes (*setas*). (D) Intestino posterior com elevado número de células caliciformes (*setas*). HE. Barra de 100 µm.

A camada mucosa do intestino de *A. bimaculatus* segue o padrão dos demais teleósteos, sendo revestida por um epitélio cilíndrico simples com planura estriada e células caliciformes (Fig. 10E).

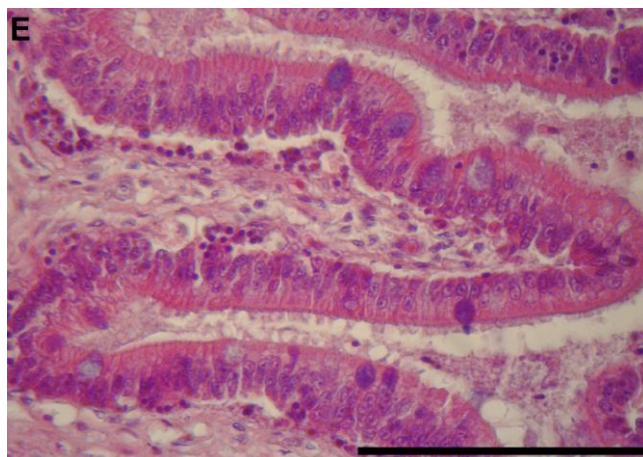


Figura 10E. Fotomicrografia do intestino de *A. bimaculatus*: Camada mucosa evidenciando epitélio cilíndrico simples com planura estriada e células caliciformes. HE. Barra de 100 µm.

Com a utilização das técnicas histoquímicas do PAS e do AB, pode-se observar nos dois segmentos (anterior e posterior) do intestino de *A. bimaculatus* que as células mucossecretoras, responsáveis pela produção de muco para lubrificação da superfície mucosa, apresentaram grânulos de secreção positiva ao PAS e AB, indicando grande quantidade de GAG's neutras e ácidas, respectivamente (Figuras 10F, 10G, 10H e 10I). Entretanto, no estômago deste peixe (Tabela 2), somente ocorreu marcação das células mucossecretoras ao AB. Resultado semelhante também foi observado em *P. maculatus* (SANTOS *et al.*, 2007), *Rhamdia quelen* (HERNANDEZ *et al.*, 2009), e em *O. hepsetus* (VIEIRA, 2010).

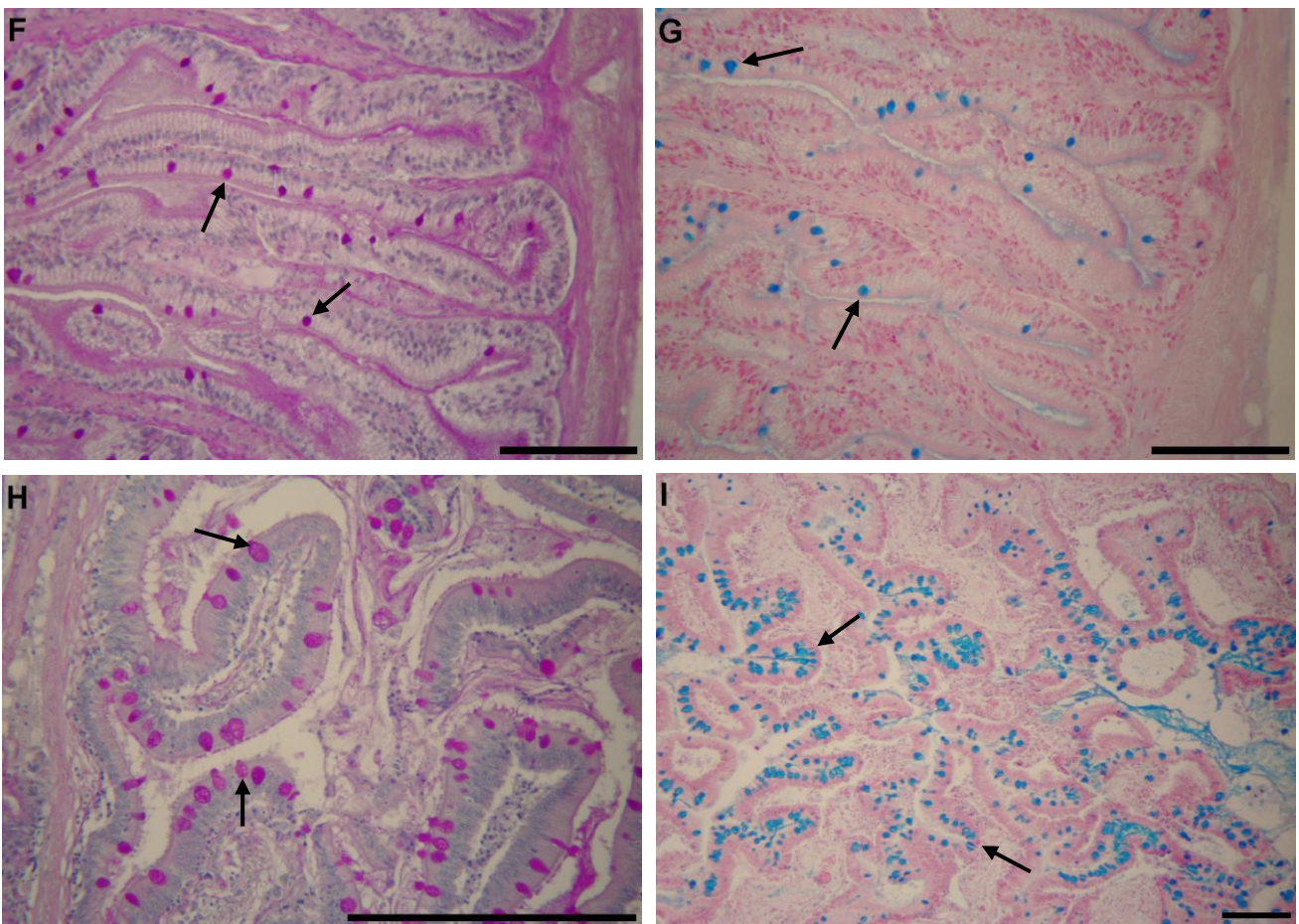


Figura 10 (F-I). Fotomicrografias do intestino de *A. bimaculatus* - **Segmento Anterior:** (F) Presença de GAG's neutras (setas) nas células mucossecretoras do epitélio. (PAS). (G) Presença de GAG's ácidas (setas) nas células mucossecretoras do epitélio. (setas). (AB). - **Segmento Posterior:** (H) Presença de muitas GAG's neutras (setas) nas células mucossecretoras do epitélio. (PAS). (I) Presenças de muitas GAG's ácidas (setas). (AB). Barra de 100 μ m.

Tabela 2: Análise histoquímica de glicosaminoglicanas no trato gastrointestinal de *A. bimaculatus*.

Técnica	Estômago		Intestino	
	Glandular	Aglandular	Anterior	Posterior
AB pH 2,5	-	-	++	+++
PAS	+++	+++	++	+++

AB, Alcian blue; PAS, Ácido periódico + Reagente de Schiff. Intensidade: (-) coloração não observada, (±) fracamente corados, (+) baixo, (++) médio e (+++) alto.

Os limites entre a lâmina própria e a camada submucosa não são evidentes, podendo ser constatado apenas a presença de tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos nessas regiões. Nos segmentos do intestino, a camada muscular obedece ao mesmo padrão de organização visto no estômago glandular, com uma camada circular interna e outra longitudinal externa, ambas constituídas de fibras musculares lisas, sendo esta camada mais delgada no segmento posterior do intestino (Figuras 10J e 10L). Externamente encontra-se a camada serosa.

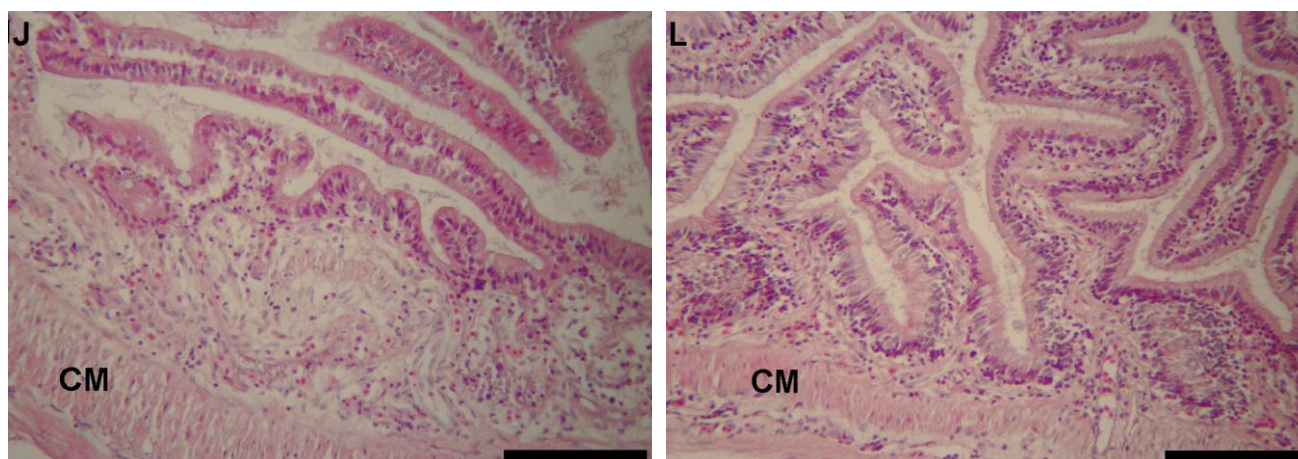


Figura 10 (J-L). Fotomicrografias do intestino de *A. bimaculatus*: **(J)** Visão geral do segmento anterior, com destaque para camada muscular (**CM**). **(L)** Visão geral do segmento posterior, com destaque para camada muscular (**CM**). HE. Barra de 100 µm.

Quando comparada às características histológicas observadas nas regiões (glandular e aglandular) do estômago e nos segmentos do intestino dos peixes provenientes dos três reservatórios, pode-se verificar que estas foram semelhantes nos espécimes de ambos os ambientes, sendo estes órgãos compostos pelas camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. Nas análises histoquímicas dos órgãos estudados, os resultados obtidos mostraram não haver diferença, quanto a presença e distribuição de GAGs, entre os peixes provenientes dos três reservatórios.

No segmento posterior do intestino de *A. bimaculatus* oriundos do reservatório do Funil, foi observado a presença de parasito (Figura 11A), contribuindo para uma desorganização do padrão histológico nessa região. Resultado semelhante também foi

visto no segmento anterior do intestino dos espécimes coletados no reservatório de Ilha dos Pombos (Figura 11B). Segundo Abdallah *et al.* (2004) em um estudo sobre a ocorrência de diferentes parasitos em três espécies de lambaris, pode-se constatar uma baixa prevalência de parasitos no intestino de *A. bimaculatus* em um ambiente impactado, sendo possível fazer uma relação entre a diversidade parasitária e a qualidade do ambiente. De acordo com Castro (1992), o trato digestivo de muitos peixes tem sido um ambiente preferido para o estabelecimento e crescimento de organismos patogênicos (endoparasita helmintos), induzindo muitas vezes à inflamação e alteração da estrutura e função dos tecidos locais.

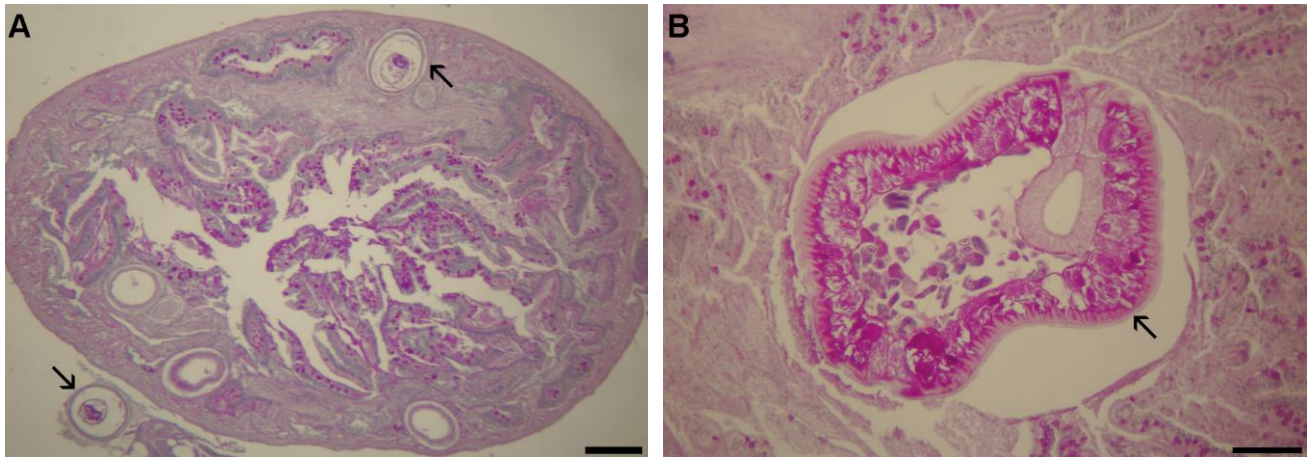


Figura 11 (A-B). Fotomicrografias do intestino de *A. bimaculatus*: **(A)** Visão geral do intestino posterior do espécime do Funil, com destaque para presença de parasito (**seta**). **(B)** Intestino anterior do espécime do reservatório de Ilha dos pombos com parasito (**seta**). PAS. Barra de 100 μ m.

5 - CONCLUSÃO

No presente estudo, os resultados histológicos e histoquímicos obtidos indicam que o TGI da espécie *A. bimaculatus* apresenta um modelo característico ao hábito alimentar onívoro.

Quanto ao padrão morfológico do estômago e intestino, estes foram os mesmos nos espécimes avaliados dos três hidrossistemas, com diferença somente, quanto à presença de parasito verificada em segmentos distintos do intestino nos espécimes do Funil e de Ilha dos Pombos.

CAPÍTULO II

ESTUDO DE CÉLULAS ENDÓCRINAS NO TUBO GASTRINTESTINAL DE *Astyanax bimaculatus* (LINNAEUS, 1758) NOS RESERVATÓRIOS: DO FUNIL, SANTA CECÍLIA E ILHA DOS POMBOS

Resumo

CARDOSO, Nathália das Neves. **Estudo de células endócrinas no tubo gastrintestinal de *Astyanax bimaculatus* (LINNAEUS, 1758) nos reservatórios: do Funil, Santa Cecília e Ilha dos Pombos.** 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Este trabalho visou analisar a presença de células endócrinas no tubo gastrintestinal (TGI) de *A. bimaculatus* em três reservatórios do rio Paraíba do Sul (UHE Funil, UHE Santa Cecília e UHE Ilha dos Pombos), buscando comparar a distribuição regional e frequência de células endócrinas secretoras de somatostatina (SOM), gastrina (GAS) e serotonina (5-HT) nos espécimes de cada ambiente. Foram utilizados 12 espécimes de cada reservatório, sendo estes coletados através de rede de espera e sacrificados por hipotermia. Após a dissecação ocorreu à imediata remoção do TGI. Posteriormente, fragmentos do estômago e intestino foram fixados por 8 horas em líquido de Bouin e encaminhados para o Laboratório de Histologia e Embriologia da UFRRJ, onde foram submetidos aos processamentos histológicos de rotina para realização do estudo imunohistoquímico. Dos três tipos de células imunorreativas (IR) estudadas apenas células IR à 5-HT foram identificadas na região do estômago (epitélio e glândulas) e no intestino. Células IR à GAS e à SOM somente foram detectadas no estômago. Células IR à GAS somente foram detectadas nas glândulas gástricas. A distribuição regional e a frequência das células endócrinas variaram ao longo das regiões do TGI e também entre os espécimes de cada reservatório. Pode-se observar que a região do estômago foi a que apresentou maior quantidade de células IR no TGI de *A. bimaculatus*. Entre os peixes dos três reservatórios a frequência e distribuição das células IR à 5-HT foi maior para os reservatórios do Funil e de Ilha dos pombos. Já a frequência de células IR à SOM foi maior no reservatório de Ilha dos pombos, entretanto com pouca diferença para o reservatório do Funil. As células IR à GAS apresentaram maior marcação também para o reservatório do Funil. O único reservatório que apresentou uma frequência mais baixa quando comparada com os outros dois ambientes foi Santa Cecília. Através deste estudo foi possível verificar que nas regiões do estômago de *A. bimaculatus* ocorreu uma frequência quase exclusiva dos três tipos de células endócrinas pesquisadas, isto pode indicar que este órgão é o principal local de digestão dos alimentos desta espécie. Também foi observado que ocorreu similaridade quanto a quantidade e distribuição dessas células no TGI dos espécimes oriundos dos diferentes hidrossistemas.

Palavras chave: Células endócrinas, trato gastrintestinal, peixe, reservatórios.

Abstract

CARDOSO, Nathália das Neves. **Study of endocrine cells in the gastrointestinal tract of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) in the reservoirs: Funil, Santa Cecília e Ilha dos Pombos.** 2013. Dissertation (Master in Animal Biology). Institute of Biology Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

This study aimed to analyze the presence of endocrine cells in the gastrointestinal tract (GIT) of *Astyanax bimaculatus* in three reservoirs of the Paraíba do Sul River (UHE Funil, UHE Santa Cecília and UHE Ilha dos Pombos), seeking to compare the regional distribution and the frequency of endocrine cells, secretory of somatostatin (SOM), gastrin (GAS) and serotonin (5-HT) in specimens of each environment. We used 12 specimens of each reservoir, which are collected using gillnets and sacrificed by hypothermia. After dissection occurred to the immediate removal of GIT. Subsequently, fragments of the stomach and gut were fixed for 8 hours in Bouin liquid and sent to the Laboratory of Histology and Embryology UFRRJ, where they were subjected to routine histological processing for performing immunohistochemical study. Of the three types of cells immunoreactive (IR) studied only the IR cells were identified 5-HT in the stomach region (epithelia and glands) and gut. GAS and SOM - IR cells were only detected in the stomach. Cells to IR GAS was detected only in the gastric glands. The regional distribution and frequency of endocrine cells varied across regions of the GIT and also among the specimens of each reservoir. It can be observed that the region of the stomach showed the highest amount of cells IR in GIT *A. bimaculatus*. Among the three fish tanks and the frequency distribution of the 5-HT- IR cells was higher in the Funil and Ilha dos Pombos reservoirs. Since the frequency of IR cells was higher in the SOM of Ilha dos Pombos reservoir, however, with little difference to the Funil reservoir. GAS - IR cells also showed higher markup for the Funil reservoir, the only reservoir that showed a lower frequency compared to the other two environments was Santa Cecília. Through this study we found that the stomach of the regions *A. bimaculatus* occurred almost exclusively a frequency of three types of endocrine cells studied, this may indicate that this organ is the main site of digestion of food in this species. It was also observed that there was similarity in the amount and distribution of these cells in the specimens from the GIT different reservoirs.

Keywords: endocrine cells, gastrointestinal tract, fish, reservoirs.

1- INTRODUÇÃO

De acordo com um primeiro conceito proposto por Pearse (1968), todas as células endócrinas, capazes de produzir hormônios peptídicos, presentes no tubo digestório e em diferentes órgãos seriam classificadas em um sistema celular muito amplo, denominado sistema APUD (do inglês Amine Precursor Uptake and Decarboxylation). Entretanto, estudos posteriores contribuíram para comprovar que as células deste sistema não produzem apenas aminas, mas também peptídeos reguladores e outros transmissores.

A descoberta desses numerosos peptídeos reguladores existentes comumente no Sistema Nervoso Central (SNC), Sistema Nervoso Periférico (SNP) e no Sistema gastroenteropancreático (GEP) possibilitou o estabelecimento do Sistema Neuroendócrino Difuso (SND) (POLAK & BLOOM, 1983). Acredita-se que este sistema atue regulando e controlando o curso fisiológico do organismo, desempenhando um papel importante na atividade de vida do organismo (MIN *et al.*, 2009).

As células do SND responsáveis pela liberação dos hormônios gastrintestinais estão distribuídas ao longo da mucosa do TGI (ÇINAR *et al.*, 2006). Estas células desempenham um papel importante na regulação global dos processos digestivos, tais como absorção de nutrientes, motilidade intestinal e fluxo de sangue (ÇINAR & DILER, 2002).

No intestino dos vertebrados quase todas as atividades envolvidas no controle fisiológico durante o jejum ou alimentação são mediadas pelo SND. As células epiteliais intestinais que pertencem ao sistema endócrino difuso (SED) interagem com componentes do sistema nervoso entérico (SNE) na regulação das funções digestivas, tais como a secreção de enzimas, absorção de nutrientes e a progressão do alimento através do canal alimentar. No que diz respeito aos peixes, vários peptídeos são produzidos por componentes do sistema neuroendócrino que estão envolvidos na comunicação entre SED e SNE (ÇINAR *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, estudos sobre as células do SND presentes no Sistema Digestório de alguns peixes teleósteos mostraram que a presença destas células no tubo gastrintestinal pode variar quanto à frequência e distribuição (PAN *et al.*, 2000a; ÇINAR & DILER, 2002; ZHANG *et al.*, 2003; BOSI *et al.*, 2004; TARAKÇI, 2005; MIN, *et al.*, 2009). Isto porque as células endócrinas desempenham importantes papéis nas funções fisiológicas do sistema digestório, podendo variar significativamente entre as espécies devido a diferentes condições em que vivem estes animais e seus hábitos alimentares, indicando importantes implicações funcionais das mesmas (SEIXAS FILHO *et al.*, 2001b; KU *et al.*, 2004).

O SND de peixes mostra semelhanças com dos mamíferos no que diz respeito aos processos regulatórios. No entanto, o SND dos peixes apresentam características funcionais relativas ao habitat (de água doce ou água salgada), estação do ano, período reprodutivo ou estágio de desenvolvimento (BUDDINGTON & KROGDAHL, 2004).

De acordo com D'este *et al.* (1994) o sistema neuroendócrino difuso pode ser considerado um componente importante nos estudos filogenéticos em répteis e também acreditamos que a mesma importância poderá ser observada em teleósteos, visto que determinadas células endócrinas tenham sido estabelecidas no intestino numa fase precoce da evolução dos vertebrados (KITAZAWA, 1989).

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Avaliação do sistema neuroendócrino difuso do tubo gastrintestinal de *A. bimaculatus* espécie de peixe comum nos Reservatórios: do Funil, Santa Cecília e Ilha dos Pombos.

2.2 - Objetivos Específicos

- Descrever a presença e distribuição de diferentes tipos de células endócrinas no tubo gastrintestinal de *A. bimaculatus*
- Analisar comparativamente os resultados obtidos com os espécimes coletados em hidrossistemas diferentes, visando identificar possíveis influências dos locais no processo endócrino desta espécie.
- Contribuir para o conhecimento sobre a existência e o padrão de distribuição de células secretoras de serotonina, gastrina e somatostatina no tubo gastrintestinal, através de método imuno-histoquímico específico.
- Prover dados para estudos morfológicos, mas também para pesquisas fisiológicas e patológicas do estômago e intestino, visto que patologias destes órgãos também estão relacionadas com alterações de células endócrinas.

2.3 - Hipótese

- Existe alteração na quantidade, distribuição e secreção das células endócrinas no tubo gastrintestinal de *A. bimaculatus*, de cada hidrossistema.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Antes da realização do estudo imuno-histoquímico foi realizada previamente uma análise histológica do TGI de *A. bimaculatus* para descrição de suas características. Desta forma verificou-se que não existe distinção histológica de regiões (cárdica, fúndica e pilórica) no estômago desse peixe e por isso este foi classificado em região glandular (porção inicial e porção final) e região aglandular.

3.1 - Estudo Imuno-histoquímico

O método utilizado para a realização deste trabalho foi o Complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC): Nesta técnica são usados três reagentes: O anticorpo primário, o anticorpo secundário que é produzido ligado a uma molécula da vitamina biotina (C) e o complexo de glicoproteínas - Avidina pronta a partir da biotina e peroxidase - (AB).

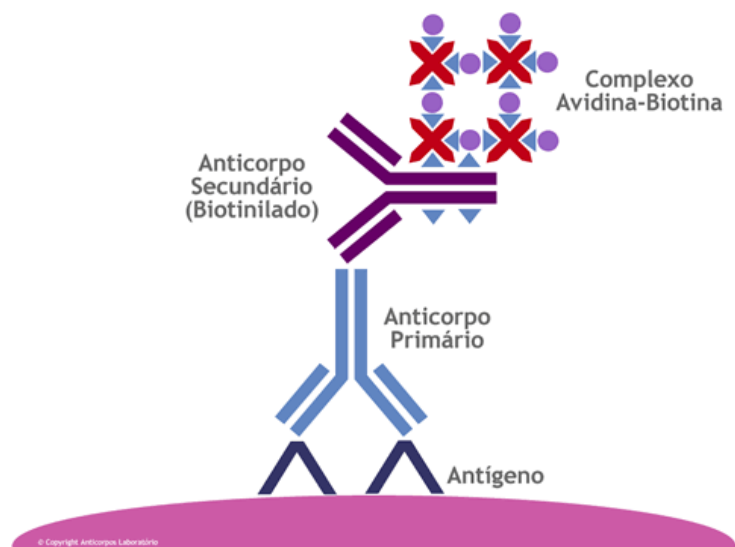


Figura 12: Representação do método imunoenzimático ABC - peroxidase - **Complexo avidina-biotina-enzima**. O complexo é formado pela ligação de uma molécula de (strept) avidina com várias de biotina associadas a uma enzima (peroxidase), que tem como função a conversão de um **cromógeno** incolor em um produto final que pode conferir cor aos antígenos teciduais marcados. Fonte: www.elmhurst.edu/~chmvchemook614hormone.htm.

Neste estudo os cortes histológicos foram submetidos às etapas de procedimento de rotina da técnica de imuno-histoquímica, incluindo a incubação com os anticorpos específicos para: **serotonina** (5-HT) (Código: S 5545 - Sigma-Aldrich, inc.), **gastrina** (GAS) (Código: G 0785 - Sigma-Aldrich,inc.) e **somatostatina** (SOM) (Código: A 0566 - Dakocytomation). Após o processamento imuno-histoquímico, os cortes foram contracolorados pela hematoxilina de Harris, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e as lâminas foram montadas com lamínula e Entellan (Merck). Todas as etapas

deste processo encontram-se no protocolo anexado ao final deste trabalho (Anexo 1). Para garantir a especificidade das reações, controles positivos e negativos foram utilizados. Os controles negativos foram definidos por substituição do anti-soro primário por soro não imune e para os controles positivos foram utilizados cortes dos tipos de tecidos indicados no datasheet de cada anti-soro (Anexos 2, 3, 4, 5, 6 e 7).

3.2 - Observações e Fotomicrografias

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

3.3 - Análise quantitativa das células Imunorreativas

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

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a verificação das lâminas submetidas aos testes imuno-histoquímicos, observou-se que todos os peptídeos reguladores foram expressos (5-HT, GAS e SOM), entretanto esta marcação não ocorreu em todos os segmentos analisados do trato gastrintestinal de *A. bimaculatus*. As células imunorreativas à 5-HT (IR à 5-HT) foram observadas em todas as regiões do estômago nos espécimes dos três reservatórios, sendo que a frequência e a distribuição foram diferentes. Entretanto o mesmo não ocorreu para a região do intestino havendo variação quanto à presença dessas células tanto para aos segmentos (anterior e posterior) quanto para os reservatórios. Já as células imunorreativas à gastrina e à somatostatina (IR à GAS e IR à SOM) apresentaram marcação apenas na região do estômago, com as células IR à GAS presentes apenas na porção glandular, sendo este resultado comum aos três reservatórios com apenas a frequência e distribuição diferentes para os ambientes avaliados (Tabela 3).

Quanto à morfologia das células endócrinas marcadas, dois padrões foram visualizados, tanto as células ditas do “tipo aberto”, quanto às ditas do “tipo fechado”. As células denominadas do “tipo aberto” são aquelas cujo ápice alcança a superfície da mucosa, respondendo a estímulos químicos e alterações do pH do meio luminal, e as do “tipo fechado” são aquelas cujo ápice não atinge a superfície da mucosa, respondendo a estímulos hormonais provenientes da corrente sanguínea e/ou ao estiramento da mucosa decorrente da digestão (RODRIGUES, *et al.*, 2005). A distribuição destas células se deu ao longo do epitélio gástrico e intestinal e também nas glândulas gástricas presentes na região glandular do estômago.

4.1 - Células imunorreativas a Serotonina (5-HT)

As células IR à 5-HT no TGI de *A. bimaculatus* foram evidenciadas tanto no epitélio gastrintestinal quanto nas glândulas do estômago. Entre os anticorpos estudados (SOM, GAS e 5-HT) as células IR à 5-HT foram as mais abundante (Tabela 4). Segundo Pan *et al.* (2000a) estas células apresentam um forte efeito sobre a regulação e função digestiva.

A frequência e a distribuição de células IR à 5-HT foram maiores nas regiões do estômago de *A. bimaculatus*, sendo encontradas com uma frequência menor ou às vezes ausente no intestino anterior e posterior da espécie estudada (Tabela 4). Este resultado difere do encontrado por Min *et al.* (2009) e por Kuru *et al.* (2010) onde a frequência maior de células IR à 5-HT ocorreu no intestino anterior dos peixes *Ictalurus punctatus* e *Garra rufa* respectivamente.

Quando comparadas as duas regiões do estômago de *A. bimaculatus* pode-se constatar que na região glandular estas células apresentaram a maior frequência na porção epitelial do que nas glândulas (Figura 13A), exibindo os dois padrões morfológicos, tanto células do “tipo fechado” quanto do “tipo aberto” (Figuras 13B e 13C), nas duas porções (inicial e final) dessa região do estômago.

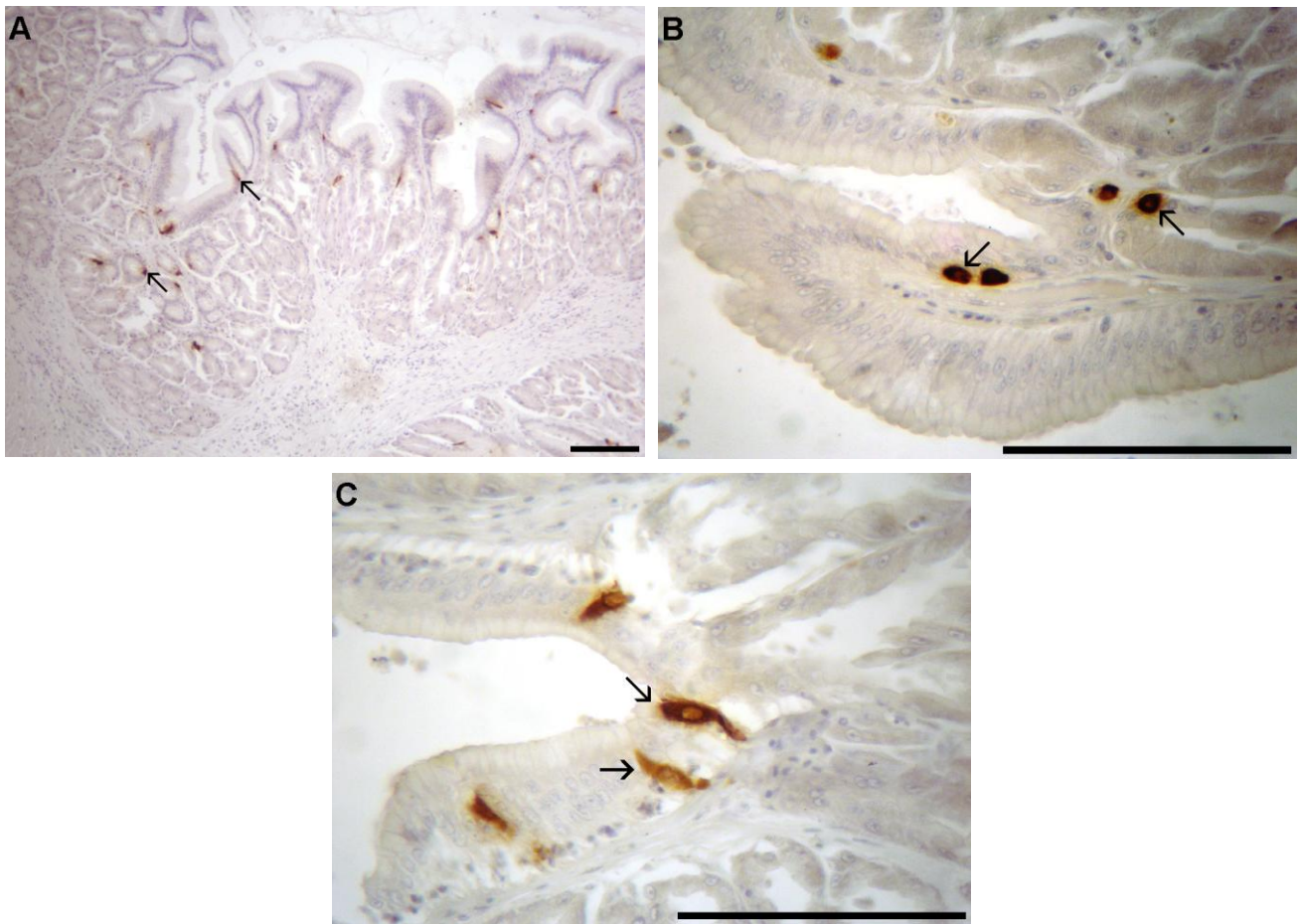


Figura 13 (A-C). Fotomicrografias de **células IR à serotonina na região glandular do estômago** de *A. bimaculatus*. **(A)** Presença das células IR à 5-HT tanto entre as células epiteliais (**seta**) desta região, quanto entre as células mucosas das glândulas (**seta**). **(B)** Destaque para a existência de células dos tipos fechada (**seta**) tanto no epitélio quando nas glândulas. **(C)** Em destaque, células do tipo Aberto (**seta**) entremeadas no epitélio. Barra de 100 μm .

As células IR à 5-HT, da região aglandular do estômago foram encontradas em menor frequência quando comparadas com a região anterior (Tabela 3). Uma presença maior de células IR à 5-HT na região do estômago também foi observada nas espécies *Colossoma brachypomum* e *Tilapia nilótica* (PAN *et al.*, 2000b). Estas células quando encontradas no epitélio de *A. bimaculatus* localizavam-se, em sua grande maioria, na base das fossetas gástricas (Figura 14A). Os dois tipos celulares também foram visualizados nesta região, tanto células do tipo aberto quanto do tipo fechado (Figuras 14B e 14C). Esta diminuição acentuada de células IR à 5-HT em direção ao segmento anterior do intestino foi um padrão comum observado nos três reservatórios (Tabela 3).

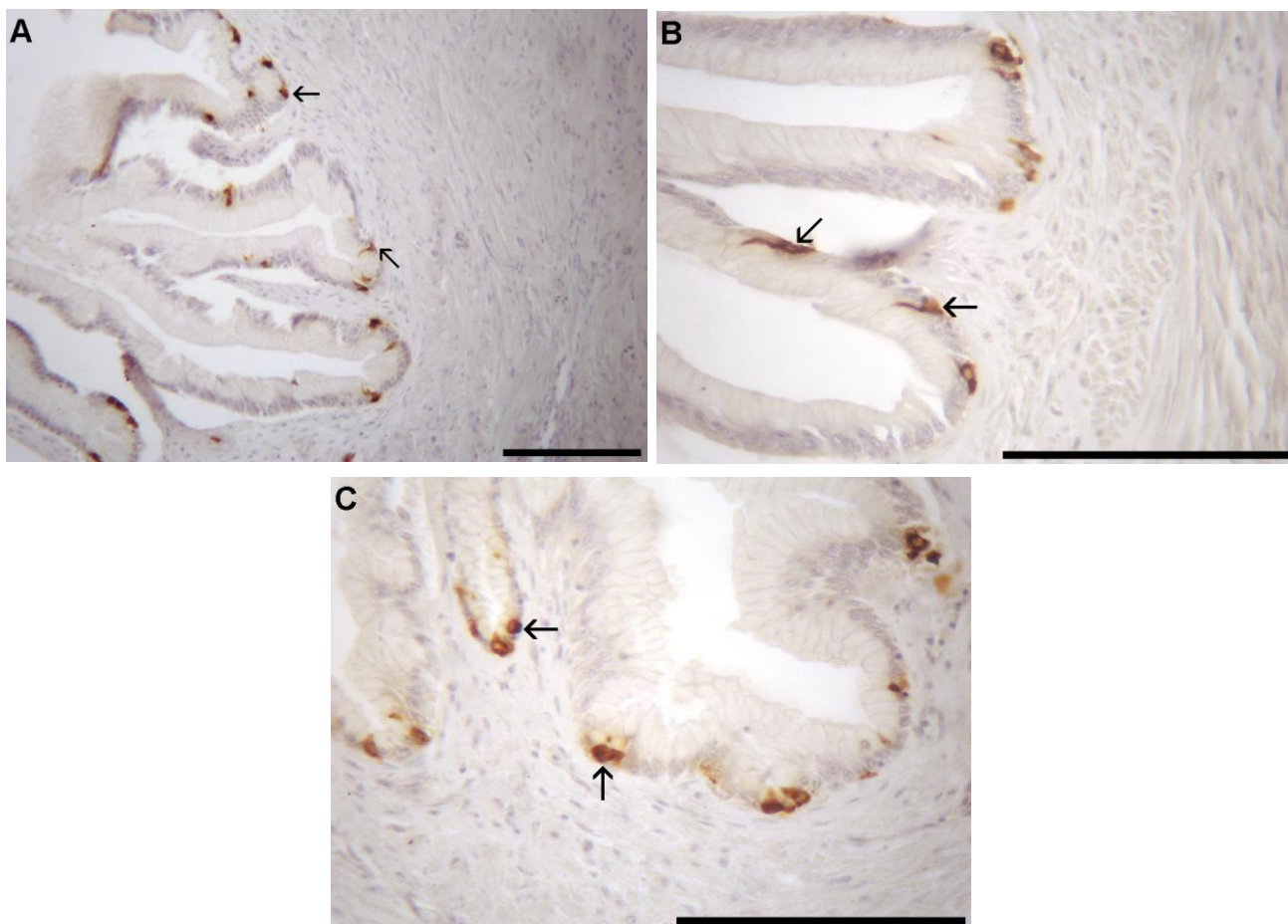


Figura 14 (A-C). Fotomicrografias de células IR à serotonina na região aglandular do estômago de *A. bimaculatus*. (A) Presença dessas células ao longo de toda essa região, ocorrendo principalmente na base das fossetas gástricas (*seta*). (B) Existência de células do tipo aberta (*seta*). (C) Em destaque células do tipo fechado (*seta*). Barra de 100 μ m.

O intestino de *A. bimaculatus* foi a região que obteve a maior variação quanto à presença de células IR à 5-HT (Tabela 4). O segmento anterior do intestino (Figura 15A) apresentou marcação com uma baixa frequência de células imunorreativas para os espécimes do reservatório do Funil, estando ausentes nos outros dois ambientes. Já o segmento posterior do intestino de *A. bimaculatus* (Figura 15B) obteve marcação apenas no reservatório de Santa Cecília com a frequência e distribuição baixa dessas células para este reservatório e ausente para os demais. Este padrão difere do encontrado por Pan *et al.* (2000b) nas espécies *Channa argus* e *Silurus asotus* e por Ku *et al.* (2004) em *Zacco platypus* que apresentaram maior marcação das células IR à 5HT na região do intestino. A ausência de células IR à 5-HT no intestino posterior e no intestino anterior de *A. bimaculatus* nos reservatórios do Funil e Ilha dos pombos, respectivamente, pode estar associado à presença de parasitos nos espécimes coletados, tendo em vista que estes possam alterar gravemente as estruturas da parede do intestino e interromper as comunicações entre o sistema nervoso e o sistema endócrino (FAIRWEATHER, 1997). O padrão celular encontrado foi tanto de células do tipo aberto quanto do tipo fechado para os dois reservatórios.

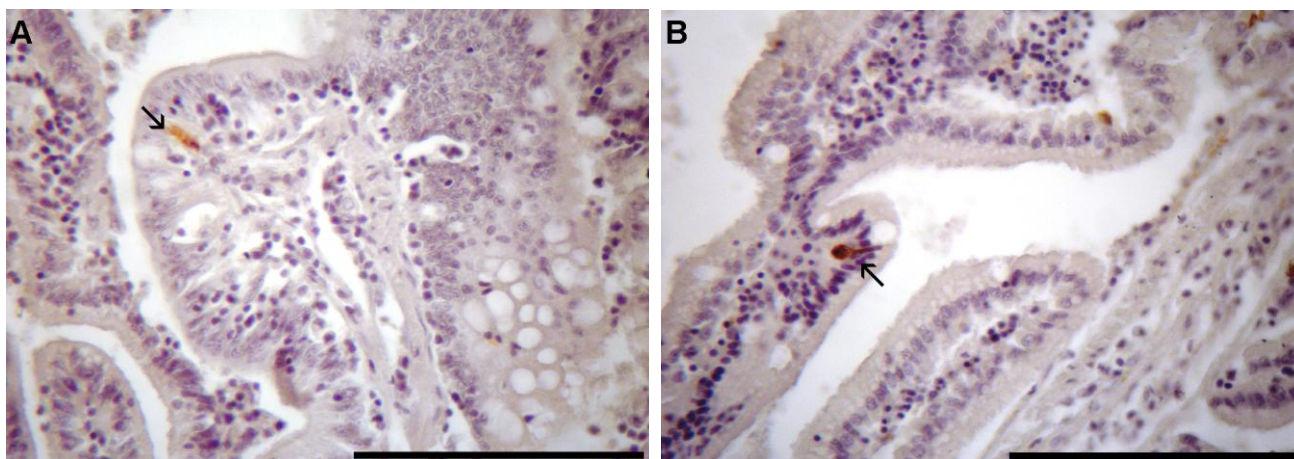


Figura 15 (A-B) Fotomicrografias de células IR à serotonina na região do intestino de *A. bimaculatus*. (A) Região do **intestino anterior** do espécime de *A. bimaculatus* do reservatório do Funil com célula IR à serotonina (**seta**). (B) Região do **intestino posterior** do espécime de *A. bimaculatus* do reservatório de Santa Cecília com célula IR à serotonina (**seta**). Barra de 100 μ m.

Com a comparação entre a frequência e distribuição das células IR à 5-HT nos três reservatórios pode-se constatar que esta foi maior par os reservatórios do Funil e Ilha dos pombos sendo diferente apenas para Santa Cecília, que apresentou uma frequência menor quando comparada com os outros ambientes (Tabela 4).

4.2 - Células imunorreativas a Somatostatina (SOM)

A somatostatina é classificada como um hormônio inibitório que exerce efeitos em diferentes partes do corpo. Sua secreção pode ser estimulada dentre outros fatores pela presença de ácido no interior do estômago e de nutrientes no intestino (RODRIGUES, *et al.*, 2005). A ação deste polipeptídeo resulta na inibição de diversas substâncias, bem como o controle e absorção de aminoácidos e glicose, sendo fundamental a sua presença no TGI, uma vez que atua em mecanismos básicos para um processamento eficiente dos alimentos (VIEIRA, 2010).

Estudos imuno-histoquímicos sobre as células IR à SOM realizados no trato gastrintestinal de diferentes espécies de teleósteos *Micropterus salmoides* (PAN *et al.*, 2000b), *Pseudophoxinus antalyae* (ÇINAR *et al.*, 2006), *I. punctatus* (MIN *et al.*, 2009), *Garra rufa* (KURU *et al.*, 2010), demonstraram a reatividade dessas células tanto no estômago quanto no intestino. Este resultado difere do encontrado em *A. bimaculatus* cujas células IR à SOM só foram visualizadas ao longo do estômago de acordo com o descrito por Vieira (2010) em *O. hepsetus*.

A frequência das células IR à SOM foi maior na porção final do estômago glandular quando comparada com a porção inicial e a região aglandular (Tabela 3). Pode-se notar que a presença dessas células foi predominante nas glândulas gástricas (Figura 16A), sendo observadas células tanto do tipo aberto quanto do tipo fechado (Figuras 16B e 16C), com este último tipo celular sendo o mais comum. Na região aglandular estas células apareceram na base do epitélio (Figura 16D) apresentando também células do tipo aberto e fechado (Figuras 16E e 16F). Este padrão não diferiu entre os reservatórios.

Quando comparada a presença dessas células entre os reservatórios, pode-se observar que a frequência das células IR à SOM foi maior no reservatório de Ilha dos pombos, entretanto com pouca diferença para o reservatório do funil, diferindo mais apenas para Santa Cecília, que apresentou uma frequência menor quando comparada com os outros dois ambientes (Tabela 3).

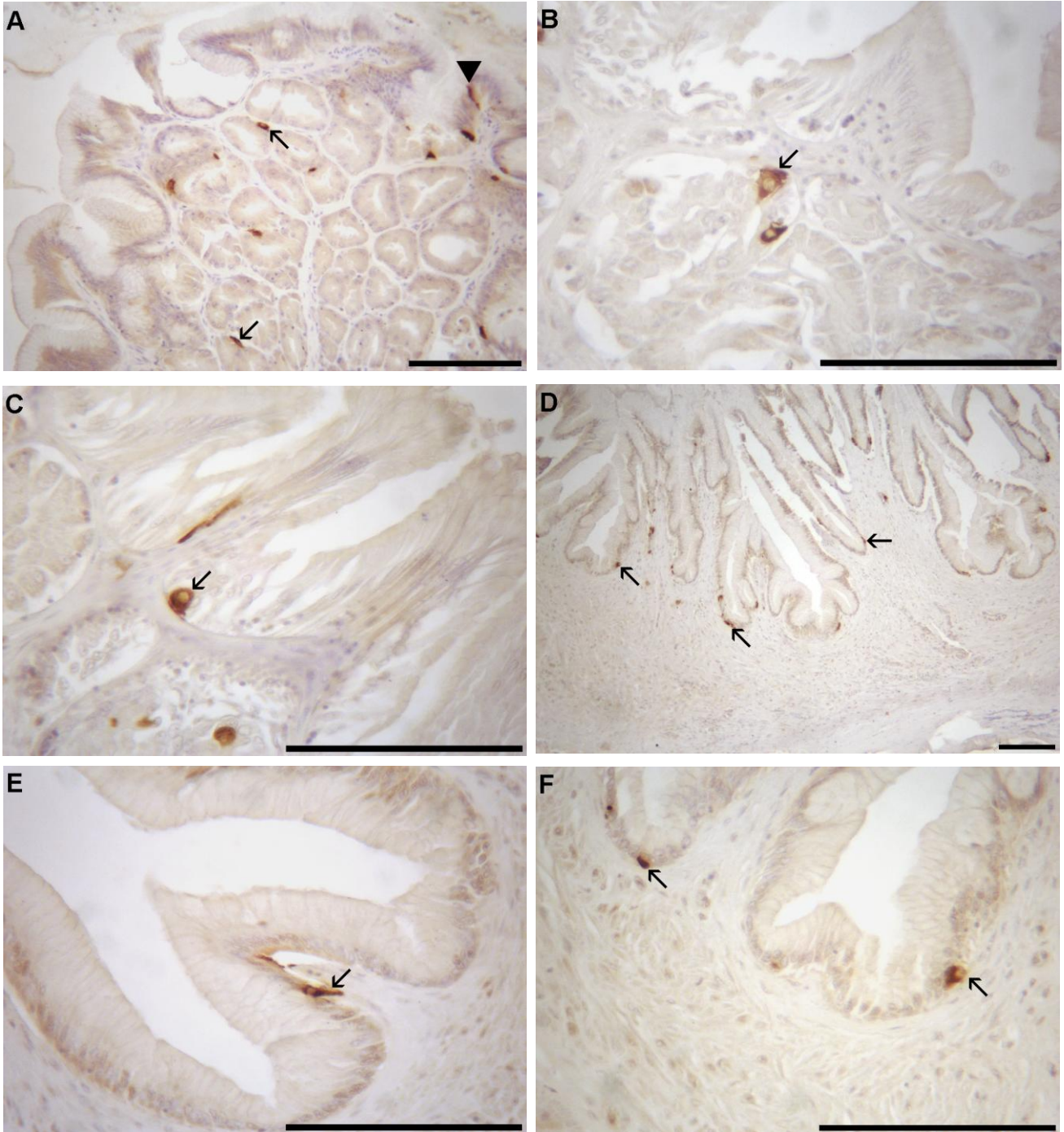


Figura 16: Fotomicrografias de células IR à somatostatina da região do estômago de *A. bimaculatus*. **Região glandular (A-C).** (A) Presença das células IR a SOM no epitélio (**cabeca de seta**) e entre as células mucosas das glândulas (**seta**). (B) Destaque para a existência de células dos tipos aberto (**seta**) nas glândulas. (C) Em destaque, células do tipo fechado (**seta**). **Região aglandular (D-F).** (D) Presença dessas células ao longo de toda essa região, ocorrendo principalmente na base das fossetas gátricas (**seta**). (E) Existência de células do tipo aberta (**seta**). (F) Em destaque células do tipo fechado (**seta**). Barra de 100 μ m.

4.3 - Células imunorreativas a Gastrina (GAS)

A gastrina é um peptídeo estruturalmente semelhante ao CCK com ambos apresentando uma carboxila terminal idêntica. A localização desse peptídeo na maioria dos tetrápodes é na mucosa antral do estômago, enquanto que em peixes a expressão das células imunorreativas a GAS variam constantemente de espécie para espécie (VIGLIANO *et al.*, 2011).

Em *A. bimaculatus* a GAS foi o hormônio que apresentou a menor distribuição ao longo do trato gastrintestinal, estando presente apenas na porção glandular do estômago (Tabela 4). A identificação das células IR à GAS foi de difícil diagnóstico quando comparada com os outros anticorpos estudados, devido ocorrência do background, entretanto pode-se observar a expressão dessas células somente nas glândulas gástricas (Figura 17A) sendo estas predominantemente do tipo fechado (Figura 17B). Não havendo uma mudança de padrão entre os reservatórios.

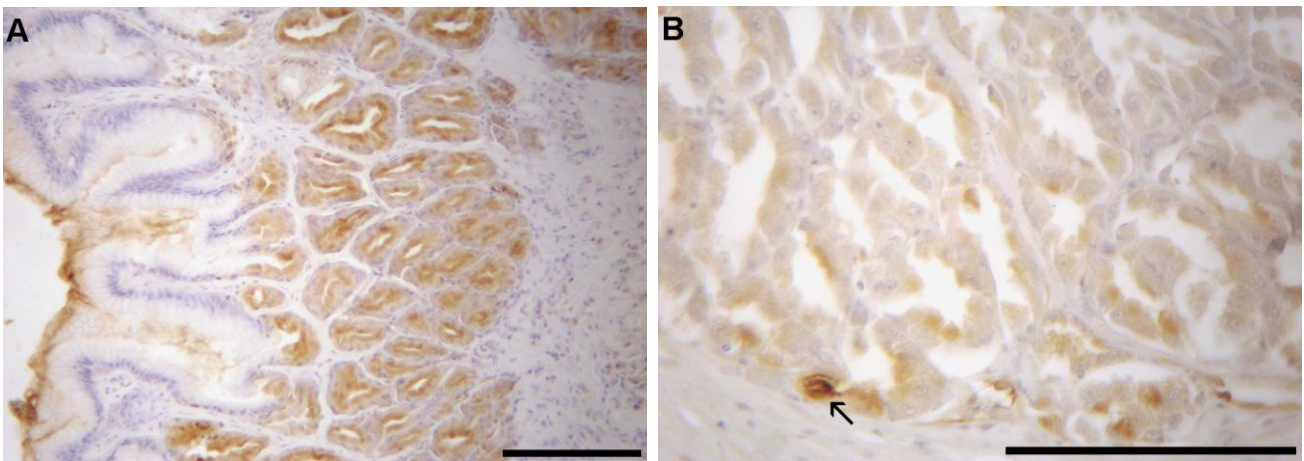


Figura 17 (A-C). Fotomicrografias de células IR à gastrina na região glandular do estômago de *A. bimaculatus*. (A) Presença das células IR a GAS somente nas células mucosas das glândulas. (B) Destaque para a existência de células dos tipos fechada (seta) nas células mucosas das glândulas. Barra de 100 μm .

Resultado similar ao encontrado em *A. bimaculatus* foi observado em um estudo imuno-histoquímico realizado no sistema digestivo de *Channa argus* e *Pelteobagrus fulvidraco* (PAN *et al.*, 2000b) evidenciando também a presença de células IR à GAS somente na região do estômago. Em contraste, em *R. quelen* as células IR à GAS não foram observadas na mucosa gástrica, sendo reativa apenas nos segmentos intestinais (HERNÁNDEZ *et al.*, 2012), assim como em peixes sem estômagos como foi descrito por Pan *et al.* (2000a) demonstrando que a presença e frequência desse peptídeo pode variar.

Entre os reservatórios a frequência das células IR à GAS foi maior apenas no reservatório do Funil, não diferindo muito entre Santa Cecília e Ilha dos Pombos que apresentaram uma frequência mais baixa.

4.4 - Presença, distribuição e frequência de células endócrinas associadas aos ambientes estudados.

A partir da análise dos dados coletados neste estudo, pode-se observar que o padrão celular do tipo aberto e fechado foi igual entre os reservatórios bem como a localização das células, sendo possível visualiza-las nas áreas epitelial e glandular. Contudo a variável presença e frequência de células IR no TGI da espécie *A. bimaculatus* apresentou diferença entre os reservatórios (Tabela 3). Quanto à variação da presença de células endócrinas ao longo do trato gastrointestinal de *A. bimaculatus* só foi notada diferença para células IR à 5-HT. Os espécimes do reservatório do Funil foram os únicos a apresentarem células IR à 5HT na porção anterior do intestino, diferente do observado para Ilha dos Pombos que não obteve marcação no intestino e Santa Cecília cuja marcação foi apenas no segmento posterior do intestino para este hormônio. Para os demais anticorpos (GAS e SOM) a presença de células endócrinas ao longo do TGI foi igual, com células IR apenas no estômago não apresentando nenhuma marcação no intestino.

Assim como no quesito presença, a frequência de células IR também apresentou diferença entre os três reservatórios: Os peixes oriundos do Funil mostraram-se mais reativos aos hormônios 5-HT e GAS (Tabela 3) que os peixes coletados em Ilha dos Pombos e Santa Cecília, com as células IR à GAS apresentando uma marcação mais intensa (Tabela 4) para os animais do reservatório do Funil do que para os outros dois ambientes. Já as células IR à SOM foi observada com maior frequência nos espécimes de Ilha dos Pombos. Vale resaltar que apenas os peixes do reservatório de Ilha dos Pombos não apresentaram nenhuma marcação na região do intestino. Apesar de haver uma diferença na frequência de células IR nos órgãos estudados entre os peixes dos três reservatórios pode-se afirmar que esta não foi muito expressiva (Tabela 3).

Estudos anteriores realizados por Ribeiro, 2009 e Vieira, 2010 em *P. maculatus* e *O. hepsetus*, respectivamente, demonstraram que uma frequência maior de células endócrinas no estômago e intestino foram encontradas em peixes oriundos de ambientes mais impactados, entretanto esse resultado não pode ser afirmado nesse estudo mesmo com uma frequência menor de células endócrinas nos espécimes da região de Santa Cecília, visto que a média de células imunorreativas nos órgãos estudados no geral foi baixa para os peixes dos três ambientes, indo de acordo com o citado por Araujo & Nunan (2005) que em um relatório sobre os danos ambientais causados por essas barragens afirma que a qualidade desses reservatórios é muito similar.

Tabela 3: Distribuição e frequência de células endócrinas no trato gastrintestinal de *A. bimaculatus* (média ± SD).

	Funil			Ilha dos Pombos			Santa Cecília		
	5HT	SOM	GAS	5-HT	SOM	GAS	5HT	SOM	GAS
Região glandular do estômago (Porção inicial)	2,66±2,38	1,33±0,97	3,13±3,22	0,86±1,35	0,93±1,27	0,60±0,82	0,73±1,16	0,86±0,91	1,33±2,35
Região glandular do estômago (Porção final)	2,53±1,18	2,20±1,32	2,40±2,74	3,73±2,65	2,86±0,91	1,40±1,95	2,13±2,69	1,26±1,22	0,33±0,61
Região aglandular do estômago	1,86±1,92	0,53±0,74	-	2,53±2,97	1,33±1,49	-	0,86±1,12	1,06±1,03	-
Intestino Anterior	0,33±0,60	-	-	-	-	-	-	-	-
Intestino Posterior	-	-	-	-	-	-	0,80±1,08	-	-

- Indicativo de reação negativa.

Tabela 4: Intensidade das células endócrinas IR no trato gastrintestinal de *A. bimaculatus*.

	Funil			Ilha dos Pombos			Santa Cecília		
	5HT	SOM	GAS	5HT	SOM	GAS	5HT	SOM	GAS
Região glandular do estômago (Porção inicial)	++	+	+++	±	±	±	±	±	+
Região glandular do estômago (Porção final)	++	++	++	+++	++	+	++	+	±
Região aglandular do estômago	+	±	-	++	+	-	±	+	-
Intestino Anterior	±	-	-	-	-	-	-	-	-
Intestino Posterior	-	-	-	-	-	-	±	-	-

Intensidade da imunorreação: (-), ausente; (±), muito baixa, (+), baixa; (++) , média; (+++), forte.

5 - CONCLUSÃO

Através deste estudo foi possível concluir que: dos três tipos de células endócrinas pesquisadas (5-HT, SOM e GAS) no estômago e intestino de *A. bimaculatus* a frequência quase que exclusiva ocorreu nas regiões do estômago o que pode indicar que esta região é o principal local de digestão dos alimentos para esta espécie.

Houve uma variação baixa na quantidade e distribuição das células endócrinas pesquisadas no tubo gastrintestinal de *A. bimaculatus*, para os espécimes de cada hidrossistema, o que pode indicar uma similaridade destes locais.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, V. D.; AZEVEDO, R. K.; LUQUE, J. L. Metazoários parasitos dos lambaris *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), *A. parahybae* Eigenman, 1908 e *Oligosarcus hepsetus* (Cuvier, 1829) (Osteichthyes: Characidae), do Rio Guandu, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 2, p. 57-63, 2004.
- AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO JR, H. F.; BORGHETTI, J. R. Considerações sobre os impactos dos represamentos sobre a ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipú. **Revista Unimar**.p 89-107, 1992.
- AGOSTINHO, A. A.; MIRANDA, L. E. *et al.* Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognoses on aging. In: TUNDISI, J. G.; STRASKRABA, M. eds. **Theoretical reservoir ecology and its applications**. São Carlos, Backhuys Publishers. p.227-265, 1999.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; SUZUKI, H. I.; JÚLIO, H.F. Migratory fish from the upper Parana´ River basin, Brazil. In: Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A. and Ross, C. (eds.), *Migratory Fishes of South America: Biology, Social Importance and Conservation Status*. World Fisheries Trust, the World Bank and the International Development Research Centre, Victoria, pp. 19–99. 2003.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. **Maringá: Eduem**, 501p., 2007.
- AGUIAR, K. D. **Influência de uma barragem sobre atributos ecológicos da comunidade e biologia reprodutiva de peixes do Rio Paraíba do Sul, UHE Ilha dos Pombos, Rio de Janeiro, Brasil**. 2008. 120f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação). Universidade Federal do Paraná CURITIBA, 2008.
- AHLMAN, H. & NILSSON, O. The gut as the largest endocrine organ of the body. **Annals of Oncology**. 12(2): S63-68. 2001.
- ANGELESCU, V. & GNERI, F. S. Adaptaciones del aparato digestivo al régimen alimenticio in algunos peces del rio Uruguay e del rio de la Plata. **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales**, v. 1, p. 161-272, 1949.
- ALVES, M. I. M. & TOMÉ, G. S. Anatomia e histologia do tubo digestivo de *Scomberomous cavalla* (Cuvier, 1829). **Arq. Est. Biol. Mar. Univ. Fed. Ceará**, 6 (2): 103-108, 1966
- ARAÚJO, F. G.; FICHBERG, I.; PINTO, B. C. T.; PEIXOTO, M. G. Variações espaciais na assembleia de peixes no rio Paraíba do Sul (Barra Mansa, Barra do Piraí), Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 18(2): 483-492, 2001.
- ARAÚJO, J. R. S.; NUNAN, G. W. Ictiofauna do rio Paraíba do Sul: danos ambientais e sociais causados por barragens, hidrelétricas e poluição no trecho fluminense. Rio de Janeiro, CPDMA-ALERJ, 59p, 2005.

- ARIMURA, A.; SATO, H.; DUPONT, A.; NISHI, N.; SCHALLY, A.V. Somatostatin: abundance of immunoreactive hormone in rat stomach and pancreas. **Science**, 189(4207): 1007-1009, 1975.
- ATENCIO, G. V. J.; HERNÁNDEZ, M. J.; PARDO, C. S. C. Descripción morfológica del tubo digestivo de juveniles de rubio *Salminus affinis* (pisces: characidae). **Acta biol. Colomb.**, 13, 99 - 112, 2008.
- BALDISSEROTTO, B. & NETO, J. R. Criação de jundiá. Santa Maria: Editora da UFSM, p. 232, 2004.
- BARBIERI, E. B. & KRONEMBERG, D. M. Climatologia do litoral sul-sudeste do Estado do Rio de Janeiro: um subsídio à análise ambiental. **Cadernos de Geociências**, 12: 57-74, 1994.
- BOHLKE, J. E.; WEITZMAN, S. H.; MENEZES, N. A. Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da America do Sul. **Acta Amazônica** 8: 657-677 1978.
- BORGES, J. C. S.; SANCHES E. G.; OLIVEIRA, M. S.; SILVA, J. R. M. C. Anatomia e histologia gastrintestinal da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Teleostei, Serranidae) **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, vol. 32, núm. 4, pp. 407-414, 2010.
- BOSI, G.; DI GIANCAMILLO, A.; ARRIGHI, S.; DOMENEGHINI, C. An immunohistochemical study on the neuroendocrine system in the alimentary canal of the brown trout, *Salmo trutta*, L., 1758. **Comparative Endocrinology**, 138(2): 166-181, 2004.
- BUDDINGTON, R. K. & KROGDAHL, A. Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract. **Comp. Biochem. Physiol.** 139, 261–271, 2004.
- CASTRO G. A. Intestinal physiology in the parasitized host: integration, disintegration, and reconstruction of systems. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 664, 369-379, 1992.
- CASTRO, E. F.; FONSECA, C. C.; MENIN, E.; NEVES, M. T. D. Caracterização histológicas e detecção de células endócrinas no estômago de peixes de água doce, com diferentes hábitos alimentares. **Biotemas**, 2003, 16(2): 105-130.
- CECCARELLI, P.; PEDINI, V.; GARGIULO, M. Serotonincontaining cells in the horse gastrointestinal tract. **Anat. Histol. Embryol.** v. 24, p. 97-99, 1995.
- CLARKE A. J. & WITCOMB D. M. A study of the histology and morphology of the digestive tract of the common eel (*Anguilla anguilla*) **Journal of Fish Biology.** 16, 159-170, 2006.
- ÇINAR, K. & DILER, A. Immunohistochemical localization of glucagon, substance-P and vasoactive intestinal peptide in gastrointestinal tract mucosa of zander. **Journal of Fish Biology**, 60: 319-327, 2002.

- ÇINAR, K.; SENOL, N.; RUSTU, O. Immunohistochemical study on distribution of endocrine cells in gastrointestinal tract of flower fish (*Pseudophoxinus antalyae*). **World J Gastroenterol**, 12(42): 6874-6878, 2006.
- DE SILVA, S. S. & ANDERSON, T. A. **Fish Nutrition in Aquaculture**. London: Chapman & Hall Aquaculture Series. 319 pp. 1995.
- D'ESTE, L.; BUFFA, R.; PELAGI, M.; SICCARDI, A. G.; RENDA, T. Immunohistochemical localization of chromogranin A and B in the endocrine cells of the alimentary tract of the green frog, *Rana esculenta*. **Cell and Tissue Research**, v. 277, p. 341-349, 1994.
- DIAS, A. C. M. I.; BRANCO, C. W. C.; LOPES, V. G. Estudo da dieta natural de peixes no reservatório de Ribeirão das Lajes, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Sci. Biol. Sci. Maringá**, v. 27, n. 4, p. 355-364, 2005.
- DIAZ, A. O.; GARCIA, A. M.; DEVINCENTI, C. V.; GOLDEMBERG, A. L. Morphological and Histochemical Characterization of the Mucosa of the Digestive Tract in *Engraulis anchoita* (Hubbs and Marini, 1935) **Anat. Histol. Embryol.** 32, 341-346, 2003.
- DUARTE, S. **Estudo do sistema digestório de duas espécies de peixes Siluriformes (*Hypostomus auroguttatus* e *Pimelodus maculatus*) no reservatório de funil, rio de janeiro, Brasil**. 2007. 80f. Tese (doutorado em Biologia animal). Universidade Federal rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- ESTEVES, K. E. Feeding ecology of three *Astyanax* species (Characidae, Tetraodonopterae) from a floodplain lake of Mogi-Guagu River, ParanaRiver Basin, Brazil. **Environmental Biology of Fishes** 46: 83-101,1996.
- FAIRWEATHER, I. Peptides: an emerging force in host response to parasitism, *in*: Parasites and pathogens: effects on host hormones and behaviour. Beckage N.E. (ed), Chapman & Hall, New York, 113-139, 1997.
- FANGE, R. & GROVE, D. Digestion. *In*: Hoar, W. S.; Randall, D. J.; Brett, J. R. (eds.). **Fish Physiology**, New York, Academic Press, 8: 165-173, 1979.
- FRANCO, C. R. C. **Estudo ultraestrutural do estômago de dois Teleósteos: *Hypostomus commersonnii* (Reis et.al., 1990) e *Rhamdia branneri* (Hasemann, 1911)**. 1994. 65f. Dissertação. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1994.
- FUGI, R. & HAHN, N. S. Espectro alimentar e relações morfológicas com o aparelho digestivo de três espécies de peixes comedores de fundo do rio Paraná, Brasil. **Rev. Bras. Biol**, 51(4), p. 873-879, 1991.
- GILLETTE, D. P.; TIEMANN, J. S.; EDDS, D. R.; WILDHABER, M. L. Spatiotemporal patterns of fish assemblage structure in a river impounded by low-head dams. **Copeia**, 3: 539-549, 2005.

- GODINHO, H. M. Considerações gerais sobre anatomia de peixes, p. 118 – 122. In: **Poliuição e piscicultura**. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública e Instituto de Pesca, CPRN – Secretaria da Agricultura, 216p., 1970.
- GRACIANO, T. S. **Aminogut® em dietas para larvas e alevinos de tilápia do Nilo**. 2012. 80f. Tese (Doutorado em Zootecnia, Área de concentração – Produção Animal) Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná Maringá, 2012.
- GRAU, A.; CRESPO, S.; SARASQUETE, M. C.; GONZALES DE CANALES; M. L. The digestive tract of the amberjack *Seriola dumerili* Risso: A light and scanning electron microscope study. **J. Fish Biol.**, 41:287-303, 1992.
- GUEDES, D. S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae)**. 99 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1980.
- GUYTON, A. C. & HALL, J. E. Gastro Intestinal physiology. In: Text book of medical Physiology, 11th (Edn). Elsevier Publication, Noida, India. pp. 771-818., 2008.
- HADLEY, M. E. & LEVINE, J. E. Gastrointestinal hormones. In: Endocrinology, 6th (Edn). Dorling Kindersley (India) Pvt. Ltd. New Delhi. pp 211-236. 2009.
- HERNÁNDEZ, D. R.; PÉREZ GIANESELLI, M.; DOMITROVIC, H. A. Morphology, histology and histochemistry of the digestive system of South American catfish (*Rhamdia quelen*). **Int. J. Morphol.**, 27(1):105-111, 2009.
- HERNÁNDEZ, D. R.; VIGLIANO, F. A.; SÁNCHEZ, S.; BERMÚDEZ, R.; DOMITROVIC, H. A.; QUIROGA, M. I. Neuroendocrine system of the digestive tract in *Rhamdia quelen* juvenile: An immunohistochemical study. **Tissue cell**. 44: 220-226, 2012.
- JEFFRIES, M. & MILLS, D. Freshwater ecology. Principles and applications. Chichester, John Wiley & Sons Ltd., 285p., 1994
- JOHNSON, L. R.; COPELAND, E. M.; DUDRICK, S. J.; LICHTENBERGER, L. M.; CASTRO, G. A. Structural and hormonal alterations in the gastrointestinal tract of parenterally fed rats. **Gastroenterology**, 68: 1177-1183, 1975.
- JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 11ª ed., 524p., 2008.
- KHANNA, S. S. & MEHROTRA, B. K. Morphology and histology of the teleostean intestine. **Anat. Anz. Bd.**, 129:1-18, 1971.
- KITAZAWA, T. 5-Hydroxytryptamine is a possible neurotransmitter of the non-cholinergic excitatory nerves in the longitudinal muscle of rainbow trout stomach (*Salmo gairdneri*). **British Journal of Pharmacology**, 98, 781-790, 1989.

- KU, S. K.; LEE, H. S.; LEE, J. H. Immunohistochemical study on the endocrine cells in gut of the stomachless Teleost, *Zacco platypus* (Cyprinidae). **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series**, 33: 212-219, 2004.
- KURU, N.; ÇINAR, K.; SENOL, N.; DEMİRBAG, E.; DİLER, D. **Endocrine Cells in the Gastrointestinal Tract of Garra rufa**. **Kafkas Univ Vet Fak Derg** 16, 235-241, 2010.
- LÉVÊQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M. L. J.; TEDESCO, P. A. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia**, 595: 545-567., 2008.
- LEVIN, P. S. & TOLIMIERI, N. Differences in the impacts of dams on the dynamics of salmon populations. **Animal Conservation**, 4: 291-299, 2001.
- LOVELL, R. T. Digestion and Metabolism. *In*: Lovell, R.T. Nutrition and feeding of fish. New York: Van Nostrand Reinhold, 73-92, 1989.
- LOWE-MCCONNEL, R. H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. São Paulo, Edusp, 534p., 1999.
- MAKINO, L. C. **Estrutura, ultraestrutura e histoquímica do aparelho digestório do *Prochilodus lineatus*. Análise da diversidade da microbiota intestinal de *Prochilodus lineatus* e *Pterygoplichthys anisitsi***. 2010. 92 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Jaboticabal, 2010.
- MENIN, E. & MIMURA, O. M. Anatomia funcional comparativa do estômago de três peixes Teleostei de hábito alimentar onívoro. **Revista Ceres** 39(223):233-260, 1992.
- MERONA, B. Aspectos ecológicos da ictiofauna no baixo Tocantins. **Acta Amazon.**, 16/17(n. único):109-124, 1987.
- MÉRONA, B., VIGOUROUX, R.; TEJERINA-GARRO, F. L. Alteration of fish diversity downstream from Petit-Saut Dam in French Guiana: implication of ecological strategies of fish species. **Hydrobiologia**, 551: 33-47, 2005.
- MIN, H. E.; KAI-YU, W.; YU, Z. Immunocytochemical Identification and Localization of Diffuse Neuroendocrine System (DNES) Cells in Gastrointestinal Tract of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). **Agricultural Sciences in China**, 8(2): 238-243, 2009.
- MONTENEGRO, L. A. **Biologia alimentar e morfohistologia do tubo digestório do mussum, *Synbranchus marmoratus*, Bloch (osteichthyes: synbranchidae) no açude Marechal Dutra “Gargalheiras”, localizado no semi-árido brasileiro**. 2009. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.
- MORAES, M. F. P. G.; BARBOLA, I. F.; GUEDES, E. A. C. Alimentação e relações morfológicas com o aparelho digestivo do “curimbata”, *Prochilodus lineatus*

- (Valenciennes) (Osteichthyes, Prochilodontidae), de uma lagoa do sul do Brasil. **R. Bras. Zool.**, 14:169-180, 1997.
- MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. Fundamentos da moderna aquicultura. Canoas: Ed. Ulbra, 200p., 2001.
- MOTTA, P. Functional morphology of the feeding apparatus of ten species of Pacific butterfishes perciformes, Chaetodontidae: an ecomorphological approach. **Environmental Biology of Fishes** 22:39-67, 1988.
- OLDANI, N. O.; BAIGÚN, C. R. M.; NESTLER, J. M.; GOODWIN, R. A. Is fish passage technology saving fish resources in the lower La Plata River basin? **Neotropical Ichthyology**, 5 (2): 89-102, 2007.
- PAN, Q. S.; FANG, Z. P.; ZHAO, Y. X. Immunocytochemical identification and localization of APUD cells in the gut of seven stomachless teleost fishes. **World Journal of Gastroenterology**, 6: 96-101, 2000a.
- PAN, Q. S.; FANG, Z. P.; HUANG, F. J. Identification, localization and morphology of APUD cells in gastroenteropancreatic system of stomach-containing teleosts. **World Journal of Gastroenterology**, 6, 842-847, 2000b.
- PEARSE, A. G. E. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cell of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 17, 303-313, 1969.
- PETRINEC, Z.; NEJEDLI, S.; KUZIR S.; OPACAK, A. Mucosubstances of the digestive tract mucosa in northern pike (*Esox lucius* L.) and european catfish (*Silurus glanis* L.) **Veterinarski Arhiv.**, 75:317-27, 2005.
- POLAK, J. M. & BLOOM, S. R. Distribution of newly discovered regulatory peptides. **Biomedical Research**, v. 4, p. 7-23, 1983.
- REID P. E.; VOLZ, D.; CHO, K. Y.; OWEN, D. A. A new method for the histochemical demonstration of O-acyl sugars in human colonic epithelial glycoproteins. **Histochem. J.** 20, 510-518, 1988.
- RIBEIRO, T. P. **Estudo Imuno-histoquímico das células neuroendócrinas do tubo gastrintestinal de *Pimelodus maculatus* (Siluriformes, Pimelodidae)**. 2009. 48f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.
- RODRIGUES, S. S.; FONSECA, C. C.; NEVES, M. T. D. Células endócrinas do sistema gastroenteropancreático: Conceitos, distribuição, secreções, ação e controle. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 8(2), p. 171-180, 2005.

- ROTTA, M. A. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura.** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 48p. (Embrapa Pantanal. Boletim de Pesquisa, 53).
- SANTOS, C. M. **Estudo imuno-histoquímico das células Endócrinas do tubo gastrointestinal de Morcegos (mammalia, chiroptera).** 60 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- SANTOS, C. M.; DUARTE, S.; SOUZA, T. G. L.; RIBEIRO, T. P.; SALES, A.; ARAÚJO, F. G. Histologia e caracterização histoquímica do tubo gastrointestinal de *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) no reservatório de Funil, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Série Zootologia**, Porto Alegre, v. 97, n.4, p.411-417, 2007.
- SEIXAS FILHO, J. T.; BRÁS, J. M.; GOMIDE, A. T. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; DONZELE, J. L.; MENIN, E. Anatomia Funcional e Morfometria do Intestino no Teleostei (Pisces) de Água Doce Surubim (*Pseudoplatystoma coruscans* - Agassiz, 1829) **Rev. bras. zootec.**, 30(6):1670-1680, 2001a.
- SEIXAS FILHO, J. T.; FONSECA, C. C.; OLIVEIRA, M. G. A.; DONZELE, J. L.; MENIN, E. Determinação do sistema endócrino difuso nos intestinos de três teleostei (Pisces) de água doce com hábitos alimentares diferentes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 30(5): 1403-1408, 2001b.
- SILVA, N. B.; GURGEL, H. C. B.; SANTANA, M. D. Histologia do sistema digestório de saguiri *Steindachnerina notonota* (Miranda Ribeiro, 1937) (Pisces, Curimatidae), do rio Ceará Mirim, Rio Grande do Norte, Brasil. **B. Inst. Pesca, São Paulo**, 31(1): 1-8, 2005.
- STOSKOPF, M. K. Anatomy. In: SAUNDERS, W. B. (Ed.). **Fish Medicine.** Mexico: W. B. Saunders Company. p.3-31, 1993.
- TARAKÇI, B. T. Immunohistochemical Identification of Peptide Hormones in the Endocrine Cells of the Gastrointestinal Tract of the *Oreochromis niloticus*. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, 29: 207-210, 2005.
- THOMPSON, J. C.; GREELEY, G. H.; REYFORD, P. L. AND TOWNSEND, C. M. **Gastrointestinal endocrinology**, Mc Graw-Hill, New York. 1987.
- TIBBETS, I. R. The distribution and function of mucous cells and their secretions in the alimentary tract of *Arrhamphus sclerolepis* Krefftii. **Journal of Fish Biology** 50:809-820, 1997.
- TUNDISI, J. G. Água no século XXI: enfrentando a escassez. **RIMA**, São Carlos. 2003
- VANNER, S. Myenteric neurons activate submucosal vasodilator neurons in guinea pig ileum. **Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 279, p. 380-387, 2000.

- VEGAS-VELEZ, M. La structure histologique typique du tube digestif des poissons téléostéens. **Tethys**, 4(1): p. 163- 174, 1972.
- VERNIER, J. M. Intestine ultrastructure in relation to lipid and protein absorption in teleost fish. **Comparative Physiology**. Basel: Karger, v. 5, p. 166-175, 1990.
- VIEIRA, D. A. **Anatomia microscópica e imuno-histoquímica de células endócrinas no tubo gastrintestinal do peixe *Oligosarcus hepsetus* de dois hidrossistemas distintos**. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.
- VIGLIANO, F. A.; MUNOZ, L.; HERNÁNDEZ, D.; CERUTTI, P.; BERMÚDEZ, R.; QUIROGA, M. I. An immunohistochemical study of the gut neuroendocrine system in juvenile pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes) **Journal of Fish Biology** 78, 901–911, 2011. ZHANG, S. Z.; HUANG, X. G, WU, X. B. Immunohistochemical studies on endocrine cells in the digestive tract of *Paa spinosa*. **Dongwu Xuebao**, 49: 858-864, 2003.
- WHALEN, G. E.; HARRIS, J. A.; GEENEN, J. E.; SOERGEL, K. H. Sodium and water absorption from the human small intestine. The accuracy of the perfusion method. **Gastroenterology**, 51: 975-84, 1966.

ANEXOS

Anexo 1 – Protocolo de imuno-histoquímica

Preparação das lâminas com o uso de Poly-L-Lysina

Preparação dos cortes histológicos (desparafinização e hidratação)

1. Coloque as lâminas no berço.
2. Coloque o berço no primeiro xilol (por 15 minutos em temperatura ambiente ou a 60°C).
3. Escorra as lâminas e coloque no segundo xilol (por 15 minutos em temperatura ambiente).
4. Álcool absoluto 2 x 3 minutos cada.
5. Álcool 95% 3 minutos.
6. Álcool 80% 3 minutos.
7. Álcool 70% 3 minutos.
8. Lavar as lâminas em água corrente.
9. Levar as lâminas para o método de **recuperação antigênica**.

Objetivos: Restabelecer os sítios antigênicos e eliminar as ligações cruzadas formadas com o formol.

Método - Irradiação por Microondas

Incubar as lâminas no tampão citrato em um recipiente apropriado. Levá-lo ao forno de microondas, potência máxima (900 W), por tempo apropriado (3 x 5 minutos) sempre verificando o volume do tampão.

10. Lavar os cortes com tampão de lavagem (PBS) (3 x 3 minutos).

11. Bloqueio da peroxidase endógena

Imergir os cortes, durante 15 minutos em uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol.

12. Lavar os cortes com tampão de lavagem (PBS) (3 x 3 minutos).

13. Bloquear sítios inespecíficos

Incubar com soro normal (da espécie em que o anticorpo secundário tenha sido produzido) em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente.

14. Lavar o bloqueador de proteína com tampão de lavagem (2 x por 3 minutos).
15. Incubar com **Anticorpo Primário** em câmara úmida, na diluição recomendada.

Anticorpo	Diluição	Laboratório
Anti-Gastrina	1:1000 µl	Sigma-Aldrich,inc.
Anti-Serotonina	1:8000 µl	Sigma Aldrich, Inc.
Anti-Somatostatina	1:300 µl	Dako
Kit ABC	-	Vector
DAB	20µl:1ml	Diagnostic Biosystems
Anticorpo diluente	-	Spring Bioscience
Poli-L-lysina	10:90 ml	Sigma Aldrich, Inc.

16. Lavar o Anticorpo Primário com tampão de lavagem (3 x 3 minutos) na câmara úmida.
17. Incubar com **Anticorpo Secundário Biotinilado (C)** em câmara úmida por 30 minutos.
18. Lavar os cortes com tampão de lavagem (3 x 3 minutos) na câmara úmida.
19. Incubar com o **Complexo Avidina Biotina (AB)** por 30 minutos em temperatura ambiente (em câmara úmida).
20. Lavar os cortes com tampão de lavagem (3 x 3 minutos).
21. Aplicar a solução de **substrato-cromógeno DAB** (em ambiente escuro) por 5 minutos, ou até que o preparado adquira cor acastanhada. Fazer controle pelo microscópio.
22. Lavar em água destilada.
23. Desidratar as lâminas em uma bateria crescente de álcoois: 80%, 95%, 100% (2x) e xilol (2x).
28. Montar as lâminas com Entellan.

Anexo 2 - Data sheet do Kit ABC



VECTASTAIN® UNIVERSAL (Anti-Mouse IgG/Rabbit IgG)

Elite
ABC KIT
Cat. No. PK-6200

INSTRUCTIONS FOR IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING

INTRODUCTION

The VECTASTAIN® ABC system is widely accepted as one of the most sensitive, economical and reliable immunoperoxidase systems available. For several years our efforts were devoted to improving the original ABC system. This research led to the development of the VECTASTAIN® Elite ABC Kit, which is considerably more sensitive than the original VECTASTAIN® ABC peroxidase system without increased background staining. This enhanced sensitivity is particularly important in the localization of antigens present in low amounts or in cases where the coat of primary antibodies is significant. The increased sensitivity also provides an option to substantially reduce staining times. The VECTASTAIN® Elite ABC Kit is based on the same patented principles as the other VECTASTAIN® ABC Kits outlined below.

Avidin is a 68,000 molecular weight glycoprotein with an extraordinarily high affinity ($10^{12}M^{-1}$) for the small molecular weight vitamin, biotin. Because this affinity is over one million times higher than that of antibody for most antigens, the binding of avidin to biotin (unlike antibody-antigen interactions) is essentially irreversible. In addition to this high affinity, the Biotin/Avidin System can be effectively exploited because avidin has four binding sites for biotin and most proteins (including antibodies and enzymes) can be conjugated with several molecules of biotin. These aspects provide the potential for macromolecular complexes to be formed between avidin and biotinylated enzymes.

An immunoperoxidase procedure based on these properties was devised for localizing a variety of histologically significant antigens and other markers. (Hsu SM, Raine L, Fanger H. *Am. J. Clin. Pathol.* 75, 734-738, 1981; Hsu SM, Raine L, Fanger H. *J. Histochem. Cytochem.* 29, 577-580, 1981.) This technique employs unlabeled primary antibody, followed by biotinylated secondary antibody and then a preformed Avidin and Biotinylated horseradish peroxidase macromolecular Complex. This has been termed the ABC technique.

VECTASTAIN® Elite ABC Kits contain Avidin DH and biotinylated horseradish peroxidase H reagents, which have been specially prepared to form ideal complexes for immunoperoxidase staining. Although the structure of the Avidin DH: biotinylated horseradish peroxidase H complex is still undefined, evidence suggests that it consists of many biotinylated horseradish peroxidase molecules crosslinked by avidin into a three dimensional array. The complex apparently has few exposed biotin residues but retains at least one biotin binding site. Formation of the complex is achieved by mixing Avidin DH and biotinylated horseradish peroxidase H in dilute solution and in defined amounts prior to use. After the initial incubation there appears to be little change in the complex as judged by only a marginal increase in immunoperoxidase staining sensitivity. The complex remains stable for several hours after formation. For long term stability, we recommend using the R.T.U. VECTASTAIN® Elite ABC products. The Elite is 5 times more sensitive than the original ABC kit.

Vector Laboratories, Inc. • 30 Ingold Road • Burlingame, CA 94010 (USA)
Tel: (650) 697-3600 • Fax: (650) 697-0339
Email: vector@vectorlabs.com
Website: <http://www.vectorlabs.com>

PREPARATION OF VECTASTAIN® WORKING SOLUTIONS

For convenience, VECTASTAIN® Elite ABC Kits include mixing bottles to prepare working solutions of reagents. As supplied, the drop dispenser tip is in an inverted position and is not inserted into the bottle. After the buffer and appropriate reagents are added to the bottle, insert the drop dispenser tip into the white or gray opaque cap in correct orientation. Place the entire unit onto the bottle and twist on the cap. As the cap is tightened, the drop dispenser will snap into place. To remove the drop dispenser tip for refilling, merely press laterally with thumb until the tip snaps off. When dispensing drops, hold the bottle in an inverted vertical position and squeeze gently. To prevent evaporation, secure the opaque white or gray caps on the bottles when they are not in use.

When using dropper bottles to dispense reagents, apply a sufficient number of drops on the slide to cover the entire section. Slides should then be placed in a humidified chamber during the incubation period. Staining dishes or Coplin jars may also be used in the staining procedure. To make up these working solutions, use the same drop/volume ratio as recommended in the instructions for preparation of dropper bottle reagents but increase the amounts as desired.

A number of different buffers can be used in the VECTASTAIN® Elite ABC system. One of the most common is 10 mM sodium phosphate, pH 7.5, 0.9% saline (PBS). The VECTASTAIN® working solutions are prepared as follows:

- Blocking Serum (Normal Horse Serum): add one (1) drop (50 µl) of stock (yellow label) to 5 ml of buffer in mixing bottle (yellow label). The preferred serum for blocking is prepared from the same species in which the biotinylated secondary antibody is made.
- Biotinylated Universal (Anti-Mouse IgG/Rabbit IgG) Antibody: add two (2) drops (100 µl) of normal blocking serum stock (yellow label) to 5 ml buffer in mixing bottle and then add two (2) drops (100 µl) of biotinylated antibody stock (blue label).
- VECTASTAIN® Elite ABC Reagent: add exactly two (2) drops of REAGENT A (gray label) to 5 ml of buffer in the ABC Reagent large mixing bottle. Then add exactly two (2) drops of REAGENT B (gray label) to the same mixing bottle, mix immediately, and allow VECTASTAIN® Elite ABC Reagent to stand for about 30 minutes before use.

ENZYME SUBSTRATES

A variety of chromogens can be used to localize peroxidase in tissue sections. Vector Laboratories offers the traditional substrates DAB and AEC as well as several proprietary substrates, producing colors as listed below:

ImmPACT® DAB, SK-4105, brown
ImmPACT® AEC*, SK-4205, red
ImmPACT® VIP, SK-4605, purple
ImmPACT® SG, SK-4705, blue/gray
ImmPACT® NovaRED®, SK-4805, red
Diaminobenzidine (DAB), SK-4100, brown
DAB + Ni²⁺, SK-4100, gray/black
3-amino-9-ethyl carbazole (AEC)*, SK-4200, red
TMB, SK-4400, blue
Vector® VIP, SK-4600, purple
Vector® SG, SK-4700, blue-gray
Vector® NovaRED®, SK-4800, red

* AEC is soluble in alcohol and clearing agents and must be mounted in aqueous mounting media. All other substrates are not soluble in alcohol or clearing agents. They may be dehydrated, cleared, and permanently mounted.

These substrates can be used as single labels or to introduce multiple colors in a tissue section.

STAINING PROCEDURE FOR PARAFFIN SECTIONS

1. Deparaffinize and hydrate tissue sections through xylene or other clearing agents and graded alcohol series.
2. Rinse for 5 minutes in tap water.*
3. If quenching of endogenous peroxidase activity is required, incubate the sections for 30 minutes in 0.3% H₂O₂ in either methanol or water. Incubation times may be shortened by using higher concentrations of H₂O₂. If endogenous peroxidase activity does not present a problem, step 3 may be omitted.
4. Wash in buffer for 5 minutes.

- Incubate sections for 20 minutes with diluted normal blocking serum which was prepared from the species in which the secondary antibody is made. (In cases where non-specific staining is not a problem, Steps 5 and 6 may be omitted).
- Elot excess serum from sections.
- Incubate sections for 30 minutes with primary antiserum diluted in buffer.
- Wash slides for 5 minutes in buffer.
- Incubate sections for 30 minutes with diluted biotinylated secondary antibody solution.
- Wash slides for 5 minutes in buffer.
- Incubate sections for 30 minutes with VECTASTAIN® ABC Reagent.
- Wash slides for 5 minutes in buffer.
- Incubate sections in peroxidase substrate solution until desired stain intensity develops (see Note 2).
- Rinse sections in tap water.
- Counterstain, clear and mount.

* If antigen unmasking is required, perform this procedure after step 2, using Cat. No. H-3300 (citrate-based) or H-3301 (high pH).

If unwanted staining occurs in the absence of biotinylated secondary antibody, endogenous protein-associated biotin may be present in the tissue. To eliminate this unwanted staining, use an Avidin/Biotin blocking step (Cat. No. SP-2001) between steps 4 and 5.

STAINING PROCEDURE FOR FROZEN SECTIONS

This procedure is generally appropriate for frozen sections, cell smears or cytocentrifuge preparations.

- Sections are air dried.
- Immediately before staining, fix sections with acetone or the appropriate fixative for the antigen under study.
- Transfer slides into buffer.
- If quenching of endogenous peroxidase is required, use gentle H₂O₂ blocking to reduce the risk of antigen destruction or tissue loss: 0.3% H₂O₂ in 0.3% Normal Sera in PBS for 5 minutes; or 0.3% H₂O₂ in methanol for 30 minutes, or use other published methods (e.g. Andrew, S. M., Jasani, B., *Histochem J.* 1987, **19**, 426-430). If necessary, H₂O₂ treatment may also be performed after the biotinylated secondary antibody step.
- Follow steps 4-15 of the procedure recommended for paraffin sections.

MULTIPLE ANTIGEN LABELING ON SAME TISSUE SECTION

For photomicrographic examples of substrates, counterstains, and general protocols, please refer to our website or request a free brochure on multiple labeling - "Discovery through color".

RAPID STAINING PROCEDURE

The sensitivity of the VECTASTAIN® ABC Kit permits development of shortened immunoperoxidase staining protocols. In this section some guidelines are provided for a rapid staining method having a sensitivity and staining quality equivalent to the full-length VECTASTAIN® ABC protocol.

- Prepare paraffin-embedded or frozen sections for staining as described elsewhere. Prepare VECTASTAIN® ABC Kit reagents as follows: For the Biotinylated Antibody, add two drops concentrated stock to 2.5 ml of PBS containing two drops normal serum. If background staining is a problem, increase the concentration of normal serum up to 10%. For the VECTASTAIN® ABC Reagent, add two drops of Reagent A to 2.5 ml buffer, mix, then add two drops of Reagent B. Mix and allow to stand for 5-30 minutes before use.
- If quenching of endogenous peroxidase is required, an accelerated quenching procedure can be employed. Treat sections with 3% hydrogen peroxide in water for 3-5 minutes.

- Wash gently with a stream of buffer from a wash bottle.
- If background staining is a problem, incubate sections for 5-10 minutes in 2% - 10% normal serum in buffer.
- Incubate sections with primary antibody.*
- Wash as in step 3.
- Incubate sections for 10 minutes with diluted biotinylated secondary antibody.
- Wash as in step 3.
- Incubate sections for 5 minutes with VECTASTAIN® ABC Reagent.
- Wash as in step 3.
- Incubate sections in peroxidase substrate solution until desired stain intensity develops (see Note 2).
- Wash as in step 3.
- Counterstain, clear and mount.

*The concentration, staining time and temperature of the primary antibody should be tailored to an investigator's particular requirements. The increased sensitivity of the VECTASTAIN® ABC Kit allows shorter primary antibody incubation times. For example, at primary antibody concentrations optimal for the regular VECTASTAIN® ABC Kit, incubation times can be reduced at least in half when using the VECTASTAIN® ABC Kit. Higher concentrations of primary antibody allow even shorter incubation times.

NOTE: A very rapid procedure that provides excellent staining results can also be performed. Prepare diluted biotinylated secondary antibody 4 drops to 2.5 ml plus 2 drops normal serum. Prepare VECTASTAIN® ABC Reagent as in the above protocol. Apply diluted VECTASTAIN® ABC Kit reagents preheated to 37 °C. Incubate sections in each reagent for 2 minutes.

A VECTASTAIN® Universal Quick Kit (Cat. No. PK-8800), based on a pre-formed streptavidin/peroxidase complex, is also available to perform rapid immunohistochemical staining.

NOTES:

- Solutions containing sodium azide or other inhibitors of peroxidase activity should not be used in diluting the peroxidase substrate or the VECTASTAIN® ABC Reagent. Do not add normal serum, non-fat dried milk, culture media or other potential sources of biotin to the ABC reagent. This may result in reduced sensitivity.
- Development times may differ depending upon the level of antigen, the intensity of the stain that is required, or the substrate used. ImmPACT® DAB and DAB generally should be developed for 2-10 minutes; ImmPACT® VIP and Vector® VIP for 2-15 minutes; ImmPACT® SG and Vector® SG for 2-10 minutes; ImmPACT® NovaRED® and Vector® NovaRED® for 2-15 minutes; ImmPACT® AEC and AEC for 10-30 minutes; TMB for 5-20 minutes. Some counterstains may not be compatible with certain peroxidase substrates because of solubility of the reaction products or lack of color contrast. A counterstain compatibility chart is available upon request. Refer to the instructions in the respective substrate kits for further details.
- In the presence of nickel ions, the precipitate formed by DAB is gray/black rather than brown. This may enhance the sensitivity of the staining procedure and, because of the difference in color from DAB alone, has been used in double-labeling techniques. The DAB Substrate Kit (Cat. No. SK-4100) contains nickel chloride and allows two colors to be introduced into the section.
- If the reagents are to be diluted beyond their recommended concentrations, first prepare the diluted biotinylated antibody and VECTASTAIN® ABC reagent as described in the instructions. Subsequent dilutions should be made in a buffer containing 0.1% immunohistochemical grade bovine serum albumin (Cat. No. SP-5050). Only immunohistochemical grade BSA should be used, as other preparations can contain undesired impurities. Dilution of these reagents may require longer incubation times and/or higher incubation temperatures to achieve maximum sensitivities.
- The section should be well prepared. Fixation (generally, in buffered formalin not exceeding 4 percent formaldehyde) should be sufficient to maintain the integrity of the section throughout the staining procedure but not so harsh as to destroy the antigen under study. During the staining procedure, do not allow the section to dry out. Use a humidified chamber for incubations. In some cases, use of Antigen Unmasking Solution (Cat. No. H-3300 or H-3301) and exposure to high temperatures can overcome loss of antigens due to fixation.

- To avoid adsorption of the antibody to the plastic or glass container in which the final dilution is made, the primary antibody may be diluted in buffers containing 0.1% immunohistochemical grade bovine serum albumin or dilute Blocking Serum.
- Use only freshly prepared buffers. Bacterial contamination which can occur in buffers stored at room temperature may affect the quality of the staining. It is recommended that the VECTASTAIN[®] ABC Reagent and substrate solution be prepared with glass distilled water. Deionized water (even with low conductivity) may contain inhibitors of peroxidase and can reduce sensitivity.
- Stock VECTASTAIN[®] ABC Kit reagents should be stored under refrigeration. For best results, the VECTASTAIN[®] ABC Kit reagents should be used before the date shown on the bottom of the box. The A and B reagents in the kits are matched. Do not use an A reagent from one kit with a B reagent from another kit. We recommend that they be kept in the box in which they were supplied. If reagents are removed from the box please note on them the date shown on the bottom of the box so that specific lots of reagents can be traced.
- Although the affinity-purified biotinylated secondary antibody and the normal serum provided in VECTASTAIN[®] ABC Kits can be purchased individually, the Avidin DH and biotinylated horseradish peroxidase H are prepared especially for the VECTASTAIN[®] ABC Kits and are matched reagents. Do not confuse these with Cat. Nos. A-2000 and B-2004. We recommend using only ABC reagents provided in the VECTASTAIN[®] ABC kits. The universal (anti-mouse IgG/rabbit IgG) biotinylated antibody in this kit is prepared in horse specifically for this VECTASTAIN[®] Universal ABC Kit. This antibody should not be confused with other biotinylated antibodies sold as part of other kits.
- Sections of neuronal tissue or sections which are thicker than normal may require longer incubation times for optimal staining.
- Specimens should not be embedded in paraffin heated higher than 60 °C. Too much heat can destroy antigens.
- To prevent sections from detaching from the glass, slides can be treated with VECTABOND[®] Reagent (Cat. No. SP-1800), a non-protein tissue section adhesive. Do not use egg albumin coated slides. Traces of egg white avidin may affect staining quality.
- After mounting, paraffin sections should be dried in a hot air oven at 50-55 °C. Some slide warmers contain "hot spots" that can overheat tissues.
- Hand lotions can cause sections to detach from slides or may prevent adequate penetration of reagents. Avoid touching rinse baths with oily hands.
- Paraffin tissue blocks should be stored in sealed containers in a cool location.
- Complete deparaffinization is important. Clearing agents and alcohol solutions should be changed regularly. All steps of the deparaffinization should be sufficiently long to completely remove the paraffin from the sections.
- If smaller volumes of working solutions are desired, it is recommended that a drop from the stock solution be dispersed into a small, conical plastic tube. A suitable aliquot can then be withdrawn. To avoid the risk of introducing contaminants, do not remove the drop dispensers from the stock solution bottles.
- If staining of mast cells or other tissue elements occurs in the absence of primary and secondary antibodies, prepare the ABC reagent in buffer containing 0.3M-0.5M NaCl. This will eliminate undesirable ionic interactions. If this fails to eliminate unwanted staining, use an Avidin/Biotin blocking step (Cat. No. SP-2001) after the serum block step.

The VECTASTAIN[®] ABC Kit contains sufficient reagents to prepare approximately 110 ml of each working solution (500-1000 sections).

VECTASTAIN [®] ABC Kit (Standard)	1 Kit	PK-6100
This Standard Kit consists of only the ABC reagents.		
VECTASTAIN [®] ABC Kit (Goat IgG)	1 Kit	PK-6105
VECTASTAIN [®] ABC Kit (Human IgG)	1 Kit	PK-6103
VECTASTAIN [®] ABC Kit (Mouse IgG)	1 Kit	PK-6102
VECTASTAIN [®] ABC Kit (Rabbit IgG)	1 Kit	PK-6101
VECTASTAIN [®] ABC Kit (Rat IgG)	1 Kit	PK-6104
VECTASTAIN [®] ABC Kit (Sheep IgG)	1 Kit	PK-6106
VECTASTAIN [®] ABC Kit (Universal)†	1 Kit	PK-6200

The VECTASTAIN[®] ABC Reagent and VECTASTAIN[®] ABC Universal Kit are available in ready-to-use (R.T.U.), pre-diluted formats.

R.T.U. VECTASTAIN [®] ABC Reagent	50 ml	PK-7100
R.T.U. VECTASTAIN [®] ABC Kit (Universal)	50 ml	PK-7200

The following biotinylated antibodies can be used in conjunction with any

VECTASTAIN [®] ABC Kit:		
Biotinylated Anti-Cat IgG (H + L) made in goat	1.5 mg	BA-9000
Biotinylated Anti-Chicken IgG (H + L) made in goat	1.5 mg	BA-9010
Biotinylated Anti-Goat IgG (H + L) made in rabbit ^{a,d}	1.5 mg	BA-5000
Biotinylated Anti-Horse IgG (H + L) made in horse ^a	1.5 mg	BA-9500
Biotinylated Anti-Guinea Pig IgG (H + L) made in goat	1.5 mg	BA-7000
Biotinylated Anti-Hamster IgG (H + L) made in goat	1.5 mg	BA-9100
Biotinylated Anti-Horse IgG (H + L) made in goat	1.5 mg	BA-8000
Biotinylated Anti-Human IgG (H + L) † made in goat ^d	1.5 mg	BA-3000
Biotinylated Anti-Mouse IgG (H + L) † made in horse ^d	1.5 mg	BA-2000
Biotinylated Anti-Mouse IgG (H + L) (Rat Adsorbed) made in horse ^b	1.5 mg	BA-9200
Biotinylated Anti-Mouse IgG (H + L) made in goat ^d	0.5 mg	BA-2001
Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H + L) made in goat ^d	1.5 mg	BA-1000
Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H + L) made in horse	1.5 mg	BA-1100
Biotinylated Anti-Rat IgG (H + L) made in rabbit ^d	1.5 mg	BA-4000
Biotinylated Anti-Rat IgG (H + L) made in goat	1.5 mg	BA-9400
Biotinylated Anti-Rat IgG (H + L) (Mouse Adsorbed) made in rabbit ^c	0.5 mg	BA-4001
Biotinylated Anti-Rat IgG (H + L) (Mouse Adsorbed) made in goat ^c	0.5 mg	BA-9401
Biotinylated Anti-Sheep IgG (H + L) made in rabbit ^{a,d}	1.5 mg	BA-6000
Biotinylated Anti-Swine IgG (H + L) made in goat	1.5 mg	BA-9020
Biotinylated "Universal" Anti-Mouse/Rabbit IgG (H + L) made in horse ^{d,e}	2.1 mg	BA-1400
Biotinylated "Universal" Pan-Specific Anti-Mouse/Rabbit/Goat IgG (H + L) made in horse/f/g	2.2 ml	BA-1300

a - Suitable for use with bovine IgG primary antibodies.

b - Designed for use in rat tissues.

c - Designed for use in mouse tissues.

d - Antibodies included in VECTASTAIN[®] ABC Kits.

e - Universal Anti-Mouse/Rabbit IgG (BA-1400) should be reconstituted with

2 ml water and diluted 1:50 for use.

f - Universal Pan-Specific Anti-Mouse/Rabbit/Goat IgG (BA-1300) should be diluted 1:20

g - Antibody used in the VECTASTAIN[®] Universal Quick Kits.

† Chain specific antibodies are also available.

Other related reagents also available are:

Antigen Unmasking Solution (dilutes to 25 liters)			
Citrate-based	250 ml	H-3300	
High pH	250 ml	H-3301	
Avidin/Biotin Blocking Kit	1 Kit	SP-2001	
ImmEdge [®] Pen	2-pen set	H-4000	
ImmPrint [®] Pen	5-pen set	H-6100	
Vectabond [®] Reagent (dilutes to 350 ml)	7 ml	SP-1800	
VectaMount [®] Mounting Medium	60 ml	H-3000	
VectaMount [®] AQ Mounting Medium	60 ml	H-3501	
Vector [®] Hematoxylin	500 ml	H-3401	
Vector [®] Hematoxylin QS	100 ml	H-3404	
Vector [®] Methyl Green	500 ml	H-3402	
Vector [®] Nuclear Fast Red	500 ml	H-3403	

Heat-treated, ultrafiltered normal serum from:

Goat	20 ml	S-1000	Chicken	20 ml	S-3000
Horse	20 ml	S-2000	Swine	20 ml	S-4000
Rabbit	20 ml	S-5000			

Peroxidase Substrates

ImmPACT [®] DAB (brown)	120 ml	SK-4105
ImmPACT [®] AEC (red)	120 ml	SK-4205
ImmPACT [®] VIP (purple)	120 ml	SK-4605
ImmPACT [®] SG (blue/gray)	120 ml	SK-4705
ImmPACT [®] NovaRED [®] (red)	120 ml	SK-4805
DAB/NI Substrate (brown or gray/black)	1 Kit	SK-4100
AEC Substrate (red)	1 Kit	SK-4200
TMB Substrate (blue)	1 Kit	SK-4400
Vector [®] VIP Substrate (purple)	1 Kit	SK-4600
Vector [®] SG Substrate (blue/gray)	1 Kit	SK-4700
Vector [®] NovaRED [®] Substrate (red)	1 Kit	SK-4800

The kits provide sufficient stock reagents to prepare about 300 ml of substrate solution.

® is a registered trademark of Vector Laboratories, Inc.

VECTASTAIN[®] ABC Reagents and Kits are designed for laboratory use only.

Detailed product listings, specifications and protocols are available on our website: www.vectorlabs.com

© VECTOR LABORATORIES, INC. 2011 US OEX-1-10

Anexo 3 - Data sheet do Anticorpo diluente

ADS-XXXRUO
Rev B
Page 1 of 1



Antibody Diluent

	Catalog #
	ADS-125
Size	125 ml

INTENDED USE:	For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.
DESCRIPTION:	Antibody diluent is prepared for use in immunochemical procedures. Antibodies can be diluted directly in this reagent.
APPLICATIONS:	Immunohistochemistry (IHC)
CONTENTS:	Tris buffer, pH 7.8 with 1% BSA and less than 0.1% sodium azide
STORAGE & STABILITY	Store at 2-8°C. Do not freeze. The user must validate any other storage conditions. This reagent must be returned to the storage conditions identified above immediately after use. When properly stored, the reagent is stable to the date indicated on the label. Do not use the reagent beyond the expiration date. If unexpected results are observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the reagent is suspected, contact Technical Support at tech@springbio.com .
WARNINGS & PRECAUTIONS:	<ol style="list-style-type: none">1. Take reasonable precautions when handling reagents. Wear appropriate Personal Protective Equipment.2. Avoid contact of reagents with eyes, mucous membranes and skin. If reagents come into contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.3. Consult local or state authorities with regard to recommended method of disposal.4. Avoid microbial contamination of reagents.

6920 Koll Center Parkway, Suite 211
Pleasanton, CA 94566
www.springbio.com

Tel: 1-925-474-8440
Toll Free: 1-800-787-6886
Fax: 1-925-474-8409

Anexo 4 - Data sheet do DAB

IVD Data Sheet
DS-K047-B
09/23/2009

Stable DAB/Plus Liquid Format

Catalog No.:	K 047
Intended Use:	Substrate/chromogen in conjunction with peroxidase-based immunostaining systems.
Introduction:	DAB, a widely used chromogen for immunoperoxidase staining, is well accepted among pathologists because of its increased sensitivity and ability to give cleaner background as compared to amino ethylcarbazole (AEC). Specimens stained in DAB can be dehydrated, cleared, and mounted for permanent record keeping. Stable DAB/Plus is more sensitive and stable than traditional working DAB solutions.
Product benefits:	Stable DAB/Plus offers several noteworthy improvements and benefits as compared with traditional working DAB solutions: i) Stable DAB/Plus is much more sensitive, providing the cost-effective option of diluting the primary antibody. ii) Being stable for 2 weeks (as opposed to 6 hours for traditional DAB working solutions), Stable DAB/Plus allows the user the convenience of making one working solution for the entire work week. iii) Hazardous waste generation from spent DAB solution is also significantly reduced. iii) Stable DAB/Plus is ideal for high volume labs and automated stainers.
Principle:	Peroxidase from the antibody detection system reacts with H ₂ O ₂ substrate to degrade it, which then reacts with DAB, precipitating it at positive sites yielding a dark brown color.
Components:	i) 5mL concentrated amber-colored DAB Chromogen Solution. ii) 200mL clear Stable DAB/Plus Substrate Buffer. iii) One empty mixing dropper bottle.
Precautions:	DAB, a suspected carcinogen, can cause skin irritation upon contact. Avoid contact with clothes and exposed skin. If contacted, flush immediately with tap water. Follow instructions provided by local authorities for disposal.
Storage:	Store at 2-8°C. Reagents and working solution are light sensitive; protect from exposure to light. Store reagents and working solution in opaque bottle. Do not use beyond the expiration dates stated on the labels.
Working Solution:	Aliquot 1mL of Stable DAB/Plus Buffer in mixing bottle. Add 20µL (one drop) of concentrated Stable DAB/Plus Chromogen. Replace tip and mix. <i>Note: The working Stable DAB/Plus solution is stable for at least 2 weeks and should be prepared in an opaque bottle. Store at 2-8°C when not in use. Any solution not used after this period should be discarded.</i>
Procedure:	i) After peroxidase incubation, wash tissue sections with wash buffer. ii) Wipe slides removing excess buffer. Add enough drops of working Stable DAB/Plus solution to cover tissue sections. iii) Incubate for 5-10 minutes at room temperature. For optimal results, observe reaction under the microscope for signal development. Once the desired signal to noise ratio is achieved, stop the reaction by washing slides in buffer.

IVD: For In Vitro Diagnostic Use

DBS will not be held responsible for patent infringement or other violation that may occur with the use of our product

DBS

1020 Serpentine Lane, # 114, Pleasanton, CA 94566 Tel: 925 484 3350, Fax: 925 484 3390

Website: www.dbiosys.com e-mail: customersupport@dbiosys.com

Anexo 5 - Data sheet do anticorpo anti-serotonina



Anti-Serotonin (5-Hydroxytryptamine, 5-HT)
Developed in Rabbit
Delipidized, Whole Antiserum

Product No. S5545

Lot No. 127H4813

Anti-Serotonin (5-Hydroxytryptamine, 5-HT) is developed in rabbit using serotonin creatinine sulfate complex conjugated to BSA as the immunogen. The antiserum has been treated to remove lipoproteins. Rabbit Anti-Serotonin is supplied as a liquid containing 0.1% sodium azide (see MSDS)* as preservative.

Specificity

Anti-Serotonin (5-HT) specifically stains enterochromaffin cells in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of normal human appendix and serotonin-containing carcinoid tumors. In the central nervous system (CNS), the antiserum reacts with serotonin-containing fibers in perfusion-fixed, free-floating sections of rat brain. Specific staining is inhibited by preincubation of diluted antiserum with 500 μ M serotonin or 200 μ g/ml serotonin-BSA. No inhibition of staining is observed with L-tryptophan (L-Trp), 5-hydroxytryptophan (5-HTP), N-acetyl-5-hydroxytryptamine (N-acetylserotonin), or dopamine (3-hydroxytyramine, DA) at a concentration of 500 μ M.

Protein Concentration: 63 mg/ml by Biuret.

Working Dilutions

1. A dilution of 1:8,000 was determined by indirect immunohistology using formalin-fixed, paraffin-embedded normal human appendix and serotonin-containing carcinoid tumors.
2. A dilution of 1:5,000 was determined by indirect immunohistology using 4% paraformaldehyde perfusion-fixed, free-floating sections of rat brain. Anti-Serotonin specifically stains 5-HT-containing nerve fibers and varicosities projecting through or lying on the cerebral ventricular ependyma (CVE) in the lateral ventricles. No serotonin-positive fibers are observed in the ventral part of the third ventricle.

In order to obtain best results, it is recommended that each user determine the optimal working dilution for individual applications by titration assay.

Description

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a widely distributed neurotransmitter and hormone in the mammalian central nervous system (CNS) and periphery.^{1,2} In the CNS, 5-HT is considered an inhibitory neurotransmitter regulating a wide range of sensory, motor and cortical functions. In the periphery, 5-HT is present in neural and non-neural structures, e.g. platelets, gastrointestinal tract (myenteric plexus, enterochromaffin cells), lungs (neuroepithelial cells), thyroid gland, spleen and in mast cells of certain species such as rat and mouse.^{2,3,4} 5-HT is involved in the regulation of diverse functions including blood pressure, gastrointestinal motility, pain perception, platelet aggregation, lymphocyte cytotoxicity and phagocytosis, appetite and sleep^{2,5} and is implicated in several pathological states including carcinoid tumors, migraine, and hypertension.^{5,7} In the CNS, 5-HT has been implicated in several neuropsychiatric disorders such as anxiety, depression and schizophrenia.⁷ The majority of serotonergic nerve terminals in the CNS originate in neuronal cell bodies of the raphe nuclei (dorsal, median), nucleus raphe obscurus (NRO) and nucleus raphe pallidus (NRP) in the brainstem^{4,8,9,10}, which project to specific areas of the brain and the spinal cord.^{9,10} 5-HT is found to co-exist with substance P (SP) in the brain¹¹ and in nerve terminals in the ventral horn of the spinal cord.^{11,12,13} 5-HT is formed by the decarboxylation of 5-hydroxy-tryptophan (5-HTP), its intermediate, which is formed by hydroxylation of L-tryptophan by tryptophan hydroxylase. In the CNS, the action of 5-HT is terminated by reuptake into the pre-synaptic terminal by specific 5-HT transporters. 5-HT is further degraded by monoamine oxidase (MAO). The multiple physiological effects of 5-HT in the CNS and periphery are mediated by at least four receptor classes, 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ and 5-HT₄, based on their molecular weights, ligand binding properties and coupling to different signal transduction systems.¹⁴ The

5-HT₂ receptor is a ligand-gated ion channel, whereas the 5-HT₁ subfamily (5-HT_{1A/B}) of G-protein coupled receptors have nanomolar affinity for 5-HT and are negatively coupled to adenylate cyclase. Antibodies that react specifically with 5-HT are useful for the study of the mode of action, differential tissue expression and intracellular and subcellular localization of 5-HT in the CNS and peripheral nervous system as well as in neuroendocrine cells in digestive and respiratory systems.

Uses

Anti-Serotonin may be used for the detection of 5-HT by immunohistology in sections of formalin-fixed, paraffin-embedded normal gastrointestinal tract and its carcinoid tumors, and in paraformaldehyde-fixed, frozen or Vibratome tissue sections of CNS and peripheral tissue of various species (e.g. rat, cat, porcine, bovine, monkey and human), and may be used in various immunochemical methods such as ELISA and RIA. The visualization of 5-HT in neuronal cell bodies may require pretreatment of the animals with an axonal transport blocker, e.g. colchicine.

Storage

For continuous use, store at 2-8°C for a maximum of one month. For extended storage freeze in working aliquots. Repeated freezing and thawing is not recommended. Storage in "frost-free" freezers is not recommended. If slight turbidity occurs upon prolonged storage, clarify the solution by centrifugation before use.

* Due to the sodium azide content a material safety sheet (MSDS) for this product has been sent to the attention of the safety officer of your institution. Consult the MSDS for information regarding hazardous and safe handling practices.

References

1. Azmitia, E., et al., In: *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*. Meltzer, H.Y. (ed.), Raven Press, New York, NY., (1987).
2. Peroutka, S., *Ann. Rev. Neurosci.*, **11**, 45 (1988).
3. Furness, J., and Costa, M., *Neuroscience*, **7**, 341 (1982).
4. Verhofstad, A., et al., In: *Immunohistochemistry, Practical Applications in Pathology and Biology*, Polak, J. and Van Noorden S. (eds.), Wright PSG, London (1983).
5. Richardson, B., and Engel, G., *Trends Neurosciences*, **9**, 424 (1986).
6. Lundqvist, M., and Wilander, E., *J. Pathol.*, **148**, 141 (1986).
7. Owens, M., and Nemeroff, C., *Clin. Chem.*, **40**, 288 (1994).
8. Steinbusch, H., et al., *Neuroscience*, **3**, 811 (1978).
9. Steinbusch, H., *Neuroscience*, **6**, 557 (1981).
10. Millhorn, D., et al., *Brain Res.*, **461**, 169 (1988).
11. Johansson, O., et al., *Neuroscience*, **6**, 1857 (1981).
12. Hökfelt, T., et al., *Neuroscience*, **3**, 517 (1978).
13. Tashiro, T., and Ruda, M., *Peptides*, **9**, 383 (1988).
14. Julius, D., *Ann. Rev. Neurosci.*, **14**, 335 (1991).

1/98

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications.

Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply.

Please see reverse side of the invoice or packing slip.

Anexo 6 - Data sheet do anticorpo anti-somatostatina



Polyclonal

Rabbit Anti-Somatostatin

Immunogen: Synthetic cyclin (1–14) somatostatin conjugated to bovine thyroglobulin

English

Code A0566

Protein concentration g/L: See label on vial.

Intended use

For In Vitro Diagnostic Use.

Refer to the *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Summary and explanation

Introduction

Somatostatin is one of seven known polypeptide hormones produced in the pancreas. Somatostatin functions as an inhibitory hormone of the neuroendocrine system and is secreted by D-cells of the islets of Langerhans, the fundus and antrum of the stomach and in the upper small intestine. Somatostatin has been demonstrated in sympathetic nerves, mucosal cells, myenteric nerves of the gastrointestinal tract, salivary glands and in some parafollicular cells of the thyroid.¹⁻⁵

Specificity

This antibody labels D-cells of mammalian pancreas. Cross-reactivity has been observed with somatostatin from a large number of mammalian species.

Reagent provided

Rabbit anti-somatostatin is an unfractionated rabbit antiserum in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.6, and 15 mM sodium azide.

Rabbit anti-somatostatin may be used at a dilution of 1:200 to 1:300 in the LSAB method, determined on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. These are guidelines only; optimal dilutions should be determined by the individual laboratory.

Materials required, but not supplied

Refer to the *General Instructions for Immunohistochemical Staining* and/or the detection system instructions.

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains Sodium azide (NaN₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, NaN₃ may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store at 2–8°C.

Specimen preparation

Paraffin Sections

Rabbit anti-somatostatin can be used on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Pretreatment of tissue with proteolytic enzymes is not required.

Staining procedure

Follow the recommended procedure for the detection system selected.

Staining interpretation

The cellular staining pattern for anti-somatostatin is cytoplasmic.

Performance characteristics

Normal Tissues

This antibody identifies somatostatin-containing cells in islet cells originating in pancreatic ductules.⁶

Abnormal Tissues

This antibody identifies somatostatin-containing cells in pancreatic tumors and islet cell hyperplasia.

Somatostatin-containing cells may also be present in medullary thyroid carcinomas, C-cell hyperplasia, thymic tumors, lung tumors and pulmonary small cell carcinomas.

Anexo 7 - Data sheet do anticorpo anti-gastrina



3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone (800) 325-5852 (314) 771-0765
Fax (314) 266-7823
email: techserv@sigma.com
sigma-aldrich.com

Product Information

ANTI-GASTRIN I

Developed in Rabbit
Delipidized, Whole Antiserum

Product Number G0785

Product Description

Anti-Gastrin I is developed in rabbit using a synthetic gastrin I fragment (1-13) conjugated to KLH as the immunogen. This peptide fragment does not contain the C-terminal tetrapeptide common with cholecystokinin (CCK).

Anti-Gastrin I specifically stains gastrin-containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human stomach (neuroendocrine cells). Specific staining is inhibited with gastrin I (human), but not with sulfated cholecystokinin (26-33) amide (CCK-8, sulfated). The antibody reacts in radioimmunoassay with human gastrin I and human gastrin I fragment (1-13). No cross-reactivity is observed with rat gastrin I, human big gastrin, sulfated cholecystokinin (26-33) amide, non-sulfated cholecystokinin (26-33) amide, CCK(30-33) amide, and human gastrin releasing peptide (GRP).

Gastrin is a 17 amino acid peptide hormone and neurotransmitter widely distributed throughout the gastrointestinal (GI) tract and the central nervous system (CNS). Gastrin, together with cholecystokinin, secretin and vasoactive intestinal peptide (VIP), belong to the family of gastrointestinal hormones.¹ Gastrin is closely related to CCK and both peptides share the same biologically active C-terminal pentapeptide. Gastrin occurs in four biologically active forms: gastrin I (17 amino acid residues); big gastrin, G-34 (34 amino acid residues); minigastrin, G-14 (14 amino acid residues); and gastrin II (gastrin I, sulfated).² Gastrin and minigastrin can be extracted from normal antral mucosa and gastrinomas, and are normally present in fetal but not adult human pancreas.³ Big gastrin is found abundantly in duodenal mucosa. In the CNS, gastrin is localized in neurons of the hypothalamus and pituitary. In the peripheral nervous system, gastrin is mainly localized in gastrin-producing, neuroendocrine cells in the glands of the antropyloric mucosa, gastric antral mucosa (G-cells), duodenum, and proximal small intestine mucosa (G- and IG-cells).⁴

Gastrin release stimulates gastric acid secretion, pepsin secretion, enzyme secretion from the pancreas, causes gall bladder contraction and gastric smooth muscle contraction.¹ Gastrin also exerts trophic effects on the gastrointestinal mucosa and normal pancreas. It stimulates the growth of gastric cancer cells *in vitro*.

In pathological states gastrin is produced by endocrine tumors, which arise from the pancreas and the proximal duodenum.^{4,5} Increased gastrin secretion has been associated with hypergastrinemia, gastric acid secretion, peptic ulcer disease, and the Zollinger-Ellison syndrome,⁶ the latter commonly associated with gastrinomas and identified as hyperplasia of the G-cells of the gastric mucosa.^{7,8} Antibodies that react specifically with gastrin may be used to study the differential tissue expression and intracellular and subcellular localization of gastrin in neuroendocrine cells of the gastrointestinal tract, and in the CNS.

Antibodies to gastrin are also useful for the identification and detection of gastrin in normal and neoplastic tissue.

Reagents

The antiserum has been treated to remove lipoproteins. Rabbit Anti-Gastrin I is provided as a liquid containing 0.1% sodium azide as preservative.

Precautions and Disclaimer

Due to the sodium azide content a material safety sheet (MSDS) for this product has been sent to the attention of the safety officer of your institution. Consult the MSDS for information regarding hazards and safe handling practices.

Storage/Stability

For continuous use, store at 2-8 °C for up to one month. For extended storage freeze in working aliquots. Repeated freezing and thawing is not recommended. Storage in "frost-free" freezers is not recommended. If slight turbidity occurs upon prolonged storage, clarify the solution by centrifugation before use.

RIA Dilution Instructions

The working dilution was determined to be 1:2,000 using 5 - 10 pg/tube of ¹²⁵I-labeled human gastrin I.

It is recommended that the antiserum first be evaluated in the particular assay system chosen due to differences in systems and procedures.

Specificity

Specificity of the antiserum is defined as the ratio of antigen concentration to cross-reactant concentration at 50% inhibition of maximum binding. The cross-reactivity data obtained in the second antibody PEG I¹²⁵ RIA system is as follows:

Cross-reactant	% Cross-reactivity
Gastrin I (human)	100
Gastrin I (1-13) (human)	100
Gastrin I (rat)	0.2
Big Gastrin (human)	0.5
CCK(26-33), amide, sulfated	0.01
CCK(26-33), amide, non-sulfated	0.5
CCK(30-33), amide	0.01
Gastrin Releasing Peptide (human)	0.2

Sensitivity

Sensitivity is defined as the 90% intercept of a B/B₀ standard curve. In the above system, the sensitivity has been found to be 2 pg/tube.

RIA Affinity Constant

The affinity constant (K_a) is determined by a Scatchard plot using this RIA system.

$$K_a = 3.0 \times 10^{12} \text{ L/M}$$

Product Profile

A dilution of 1:1,000 was determined by indirect immunoperoxidase staining of formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human stomach (antrum/duodenum).

In order to obtain best results, it is recommended that each user determine the optimal working dilution for individual applications by titration assay.

References

- Walsh, J., *Gastrointestinal Hormones*. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Johnson, R. (ed.), Raven Press, New York, p 181 (1987).
- Gregory, R., *Bioorg. Chem.*, **8**, 497 (1979).
- Larsson, L., et al., *Scand. J. Gastroenterol.*, **12**, 869 (1977).
- Wool, P., *Br. J. Cancer*, **63**, 469 (1991).
- Lamers, C., and Jansen, J., *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **24**, 267 (1988).
- Bordi, C., et al., *Arch. Pathol.*, **98**, 274 (1974).
- Lechago, J., and Shah, I., *Gastroenteropancreatic Hormones*. In: *Atlas of Diagnostic Immunohistopathology*, True, L. (ed.), Lippincott, J.B., New York (1990).
- Hodges, J., et al., *Gut*, **22**, 237 (1981).
- Buchan, A., et al., *Nature*, **277**, 138 (1979).
- Greider, M., et al., *Gastroenterology*, **63**, 572 (1972).

JWM/KMR 07/02

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.
Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.