

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

DISSERTAÇÃO

**Caracterização histológica e histoquímica e detecção por
imuno-histoquímica de células do Sistema Neuroendócrino Difuso
do tubo digestivo da espécie *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812)
(Testudine: Chelidae)**

Danielle Alcantara Vieira Lopes

2013



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

**Caracterização histológica e histoquímica e detecção por
imuno-histoquímica de células do Sistema Neuroendócrino Difuso
do tubo digestivo da espécie *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812)
(Testudine: Chelidae)**

DANIELLE ALCÂNTARA VIEIRA LOPES

Sob orientação da Professora
Nadja Lima Pinheiro

e Co-orientação da Professora
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 de 2013

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

DANIELLE ALCÂNTARA VIEIRA LOPES

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ___/___/___

Dra. Nadja Lima Pinheiro
(Orientadora)

Dra. Rosa Maria Marcos Mendes

Dr. Fernando Raphael de Almeida Ferry

Dr. Armando Sales

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as conquistas alcançadas em minha vida e principalmente por mais esta etapa concluída, pois eu nada seria se não tivesse Ele caminhando comigo.

Aos meus pais, José Evandro Lopes Vieira e Rosiméri Alcântara Vieira, pelo voto de confiança, por verem em mim alguém capaz de derrubar obstáculos para conquistar sonhos, além de me apoiarem e transmitirem a mim todo amor e carinho.

Agradeço aos meus irmãos, Michelle Alcântara Vieira, Jéssica Almeida Alcântara e João Vitor Alcântara Vieira, que não menos importantes, também contribuíram para o meu crescimento, através de lindos sorrisos e pequenos gestos, me empurrando e encorajando a não desistir.

Ao meu marido Filipe Lopes Pereira, pela sua companhia, paciência, além de todo amor e carinho a mim dedicado.

Aos meus mestres, que dentro de suas possibilidades tentaram ao máximo transmitir-me seus ensinamentos para que eu me tornasse uma boa profissional. Dentre estes destaco as professoras e amigas, Aparecida Alves do Nascimento e Nadja Lima Pinheiro, que me orientaram neste trabalho com total dedicação, sempre respondendo aos meus questionamentos e esclarecendo minhas dúvidas, fazendo-me agregar novos conhecimentos.

Aos demais docentes do Laboratório de Histologia e Embriologia da UFRRJ, os quais também me fizeram somar nesta trajetória.

Aos meus amigos, os quais caminharam ao meu lado. Principalmente às estagiárias do Laboratório de histologia que cederam seu tempo e trabalho no desenvolvimento deste estudo, em especial à Adriana Ventura que foi quem me auxiliou na parte de imuno-histoquímica.

Ao Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), MG, o qual cedeu o material para o desenvolvimento desta pesquisa.

Não poderia me esquecer da técnica e amiga Ilza Lucas Coelho Meirelles, que com tamanha excelência, confeccionou todo o material por mim utilizado, além de também ter me transmitido muitos ensinamentos.

Por fim agradeço a UFRRJ, que cedeu o espaço ao meu crescimento pessoal e profissional.

Compartilho e dedico a todos esta explosão de felicidade a qual me encontro.

RESUMO GERAL

VIEIRA-LOPES, Danielle Alcantara. **Caracterização histológica e histoquímica e detecção por imuno-histoquímica de células do Sistema Neuroendócrino Difuso do tubo digestivo da espécie *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudine: Chelidae).** 2013. 124p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

A compreensão dos processos fisiológicos nos vertebrados é essencial para obtenção de dados sobre a biologia das espécies. Os conhecimentos ecológicos e evolutivos são primordiais para um manejo apropriado, atividades de conservação e o aprimoramento dos ecossistemas. Sendo assim, esclarecer a morfologia do sistema digestório torna-se fundamental uma vez que este reflete fielmente as pressões exercidas pelo ambiente sobre o organismo. A adaptação a diferentes nichos ambientais leva a mudanças anatômicas e fisiológicas, principalmente do sistema digestório, entre e dentro das diferentes ordens de répteis. Sendo assim, este trabalho descreve a histologia, a histoquímica e a imuno-histoquímica do tubo digestivo de *Phrynops geoffroanus*, relacionando as características dos órgãos com o hábito alimentar da espécie. O esôfago, estômago e intestino de quatro espécimes fixados em formol 10% e depositados na Universidade Federal de Juiz de Fora, foram processados por técnica histológica de rotina para obtenção de cortes de 5 µm de espessura. Posteriormente, corou-se com Hematoxilina-Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Alcian Blue (AB) pH 0.4 e 2.5. Observou-se que o trato é formado pelas camadas mucosa, submucosa, muscular e adventícia ou serosa. A camada mucosa do esôfago e do estômago é revestida pelo epitélio simples cilíndrico com células secretoras de muco, onde estão inseridas glândulas intraepiteliais na porção do esôfago e fossetas gástricas desembocando em glândulas tubulares no estômago. O estômago divide-se em anterior, médio e posterior, de acordo com a profundidade das fossetas e a densidade de glândulas gástricas. O intestino é revestido pelo epitélio simples cilíndrico com borda estriada e células caliciformes e divide-se em anterior e posterior, de acordo com o padrão de dobramentos da camada mucosa e o número de células caliciformes. Reatividade ao PAS e AB foi observada em todo o TD. A muscular da mucosa está presente em todos os compartimentos. A camada muscular é formada por duas subcamadas de músculo liso, exceto na porção posterior do estômago. Células imunorreativas (IR) ao anti-soro anti-serotonina (5-HT) estão presentes entre as células epiteliais e na base das glândulas intraepiteliais no esôfago; no epitélio do estômago e do intestino e na base das glândulas gástricas observam-se células IR aos anti-soros anti-serotonina (5-HT), anti-somatostatina (SOM) e anti-insulina (INS). Nenhuma reação aos anti-soros: anti-gastrina (GAS), anti-glucagon (GLUC) e anti-polipeptídeo pancreático (PP) é observada. Este estudo vai ajudar no entendimento da fisiologia digestiva da espécie investigada e fornecer dados para análises comparativas com outros quelônios.

Palavras chaves: Réptil, histoquímica, mucinas, células endócrinas.

GENERAL ABSTRACT

Histological and histochemical characterization and immunohistochemical detection of diffuse neuroendocrine system cells of the digestive tube of *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudine: Chelidae). 2013. 124p. Dissertation (Master in Animal Biology). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

An understanding of the physiological processes in vertebrates is essential to understand the biology of species. Knowledge of ecology and evolution is key to appropriate management, conservation and improvement of ecosystems. Therefore, clarification of the morphology of the digestive system is fundamental because this reflects to pressures exercised by the environment on the organism. The adaptation to different environmental niches leads to anatomic and physiological changes, mainly in the digestive system, among and within the different reptile orders. This work describes the histology histochemistry and immunohistochemical of the digestive tube of *Phrynops geoffroanus*, to relate the characteristics of the digestive organs to the species' eating habit. The esophagus, stomach and intestine of four specimens fixed in 10% formal and deposited in the reptile collection of Juiz de Fora Federal University were processed by routine histological techniques to obtain 5- μ m sections. These were stained with hematoxylin-eosin (HE), periodic acid-Schiff (PAS) and Alcian Blue (AB) pH 0.4 and 2.5. The tube is formed by the mucosa, submucosa, muscular and adventitia or serosa layers. The mucosa layer of the esophagus and stomach is lined with a simple cylindrical epithelium with mucus-secreting cells, with intraepithelial glands inserted in part of the esophagus and gastric fossettes emptying into tubular glands in the stomach. The stomach is divided into an anterior, middle and posterior region, according to the depth of the fossettes and the concentration of gastric glands. The intestine is lined by a simple cylindrical epithelium with striated boundaries and goblet cells and is divided into an anterior and posterior region, according to the pattern of folds of the mucosa layer and the number of goblet cells. Reactivity to PAS and AB was observed in the entire tube. The muscularis mucosa is present in all the segments. The muscular layer is formed by two sub-layers of smooth muscle, except for the posterior part of the stomach. Immunoreactive (IR) cells to anti-serotonin (5-HT) are present among the epithelial cells and at the base of the intraepithelial glands in the esophagus and epithelium of the stomach and intestine, while at the base of gastric glands there are IR sells to anti-serotonin (5-HT), anti-somatostatin (SOM) and anti-insulin (INS). There was no reaction observed to anti-gastrin (GAS), anti-glucagon (GLUC) and anti-pancreatic polypeptide (PP). This study will help understanding of the digestive physiology of *P. geoffroanus* and provide data for comparative analyses with other turtles.

Keywords: *Reptiles, histochemistry, mucins, endocrine cells.*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Exemplar de *Phrynos geoffroanus*.....21
- Figura 2: Morfologia geral do tubo digestivo de *P. geoffroanus*. (A)** Superfície interna da transição esôfago-estômago.....34
- Figuras 3 e 4: Fotomicrografias do esôfago de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). (3)** Mucosa pregueada formada por epitélio simples cilíndrico (Ep) com células secretoras de muco, seguida por lâmina própria (Lp) vascularizada. Presença de glândulas intraepiteliais (seta); Camada submucosa (Sm) evidenciada pela presença da camada muscular da mucosa (Mm) representada por feixes de fibras musculares em sentido circular. HE. Barra = 50 µm. **(4)** Maior aumento mostrando a organização de uma glândula intraepitelial. HE. Barra = 100 µm.....34
- Figura 5:** Fotomicrografias da transição **esôfago-estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Presença de GAG's neutras nas células que compõem o epitélio (seta), nas glândulas intraepiteliais do esôfago (cabeça de seta) e nas glândulas gástricas do estômago anterior (*). PAS. Barra = 100 µm.....35
- Figura 6:** Fotomicrografia da transição **esôfago-estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Presença e GAG's ácidas tanto nas células que compõem o epitélio (seta) quanto nas glândulas intraepiteliais (cabeça de seta). AB. Barra = 100 µm.....36
- Figura 7:** Fotomicrografia do **esôfago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Camada muscular composta por dois feixes de fibras organizados em sentido: interno longitudinal (il) e externo circular (ec). HE. Barra = 50 µm.....36
- Figura 8:** Fotomicrografia de células IR ao anticorpo anti-5-HT **no esôfago** de *P. geoffroanus*. Células IR, dos tipos aberto (seta) e fechado (cabeça de seta), compõem o epitélio esofágico (Ep) e também as glândulas intraepiteliais (Gl). Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barra = 50 µm.....37
- Figura 9: Morfologia geral do tubo digestivo de *P. geoffroanus*. Superfície interna: (A)** Esôfago e Estômago anterior **(B)** Estômago Médio **(C)** Estômago posterior **(D)** Transição Estômago-Intestino.....51
- Figuras 10 e 11: Fotomicrografias da região anterior do estômago de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). (10)** Visão geral mostrando camada mucosa formada por epitélio gástrico (Ep), lâmina própria (Lp) com glândulas gástricas (Gl) e submucosa (Sm) evidenciada pela presença da camada muscular da mucosa (Mm) em sentido longitudinal. HE. Barra = 100 µm. **(11)** Ampliação da camada mucosa evidenciando epitélio simples cilíndrico mucossecretor (Ep) formando fossetas gástricas (*), que desembocam em glândulas gástricas (Gl) de formato tubular. HE. Barra = 50 µm.....52

- Figuras 12 e 13:** Fotomicrografias do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal) **(12)** Região média - Maior densidade de glândulas gástricas (Gl) na lâmina própria tornando ínfima a porção de tecido conjuntivo. Camada muscular da mucosa (Mm) representada por feixe de fibras musculares em sentidos interno circular (ic) e externo longitudinal (el). **(13)** Região posterior (corte transversal) - Epitélio formando fossetas gástricas profundas (*) desembocando em glândulas gástricas (Gl). Camada muscular da mucosa presente. HE. Barra = 100 µm.....53
- Figura 14:** Fotomicrografia da transição **esôfago-estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Presença de GAG's neutras nas células que compõem o epitélio (seta), nas glândulas intraepiteliais do esôfago (cabeça de seta) e nas glândulas gástricas do estômago anterior (*). PAS. Barra = 100 µm.....54
- Figura 15:** Fotomicrografia do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Região média - GAG's neutras no epitélio (seta) e nas glândulas gástricas (cabeça de seta). PAS. Barra = 100 µm.....54
- Figura 16:** Fotomicrografia do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Região posterior - Coloração rósea marcando a presença de GAG's neutras no epitélio (seta) e nas glândulas gástricas (cabeça de seta). PAS. Barra = 100 µm.....55
- Figura 17:** Fotomicrografia do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Região anterior - Presença de GAG's ácidas na mucosa (seta). Glândulas gástricas apresentando positividade alta (cabeça de seta). Barra = 50 µm.....55
- Figura 18:** Fotomicrografia do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Região média - GAG's ácidas no epitélio gástrico (seta). Glândulas gástricas com positividade moderada (cabeça de seta). Barra = 50 µm.....56
- Figura 198:** Fotomicrografia do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Região posterior Coloração azulada marcando a presença de GAG's ácidas (seta). Glândulas gástricas com positividade baixa. Barra = 50 µm.....56
- Figura 20:** Fotomicrografia do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Região anterior - Camada muscular da região anterior apresentando feixes de fibras musculares em dois sentidos: interno circular (ic) e externo longitudinal (el). HE. Barra = 100 µm.....58
- Figura 21:** Fotomicrografia do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Região média - Camada muscular representada por feixe de fibras musculares em sentidos interno circular (ic) e externo longitudinal (el). HE. Barra = 50 µm.....58
- Figura 22:** Fotomicrografia do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte transversal). Região posterior - Camada muscular (Mc) formada por feixes de fibras em sentido circular, intercaladas por porções de tecido conjuntivo (tc). Camada serosa. HE. Barra = 100 µm.....59
- Figuras 23 e 24:** Fotomicrografias de células IR ao anticorpo anti-5-HT no **estômago** de *P. geoffroanus*. **(23)** Região anterior - Marcação celular apenas a nível glandular: células do tipo aberto (seta) e do tipo fechado (cabeça de seta). **(24)** Região média - semelhante ao encontrado na porção anterior. Células IR do tipo aberto (seta) e do tipo fechado (cabeça de

seta) apenas na altura das glândulas gástricas. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barra = 100 µm.....	60
Figura 25: Fotomicrografia de células IR ao anticorpo anti-5-HT no estômago de <i>P. geoffroanus</i> . Região posterior - Exibiu os dois formatos celulares: tipo aberto (seta) e fechado (cabeça de seta), tanto na porção epitelial quanto na porção glandular da região. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barra = 100 µm.....	61
Figuras 26 e 27: Fotomicrografias de células IR ao anticorpo anti-SOM no estômago de <i>P. geoffroanus</i> . (26) Região média - Células IR, dos tipos aberto (seta) e fechado (cabeça de seta), compondo as glândulas gástricas. Barra: 50 µm. (27) Região posterior - Visão geral mostrando células dos dois formatos: aberto (seta) e fechado (cabeça de seta), tanto na porção epitelial quanto na porção glandular da região. Barra: 100 µm. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.....	62
Figura 28: Fotomicrografias de células IR ao anticorpo anti-SOM no estômago de <i>P. geoffroanus</i> . Em destaque células dos tipos aberto (seta) e fechado (cabeça de seta). Barra: 50 µm. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.....	63
Figuras 29 e 30: Fotomicrografias de células IR ao anticorpo anti-INS no estômago de <i>P. geoffroanus</i> . (29) Região média - Células IR, dos tipos aberto (seta) e fechado (cabeça de seta), compondo as glândulas gástricas. Barra: 50 µm. (30) Região posterior - Visão geral mostrando células dos dois formatos, tanto na porção epitelial quanto na porção glandular da região. Barra: 100 µm. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.....	64
Figura 31: Fotomicrografia do intestino de <i>P. geoffroanus</i> (corte longitudinal). Porção anterior - Visão geral do intestino anterior, mostrando a organização das vilosidades. Detalhe do epitélio simples cilíndrico (Ep) com borda estriada e células calciformes (seta). HE. Barra = 100 µm.....	82
Figura 32: Fotomicrografia do intestino de <i>P. geoffroanus</i> (corte longitudinal). Porção posterior (corte transversal) - Espessamento do epitélio causado pelo elevado número de células calciformes (seta). Camada mucosa (M), junto com a submucosa (sm) e a camada muscular da mucosa (*), formando grandes pregas longitudinais. HE. Barra = 100 µm.....	83
Figuras 33: Fotomicrografias do intestino de <i>P. geoffroanus</i> (corte longitudinal). Porção anterior - Presença de GAG's neutras (seta). PAS. Barra = 50 µm.....	83
Figura 34: Fotomicrografia do intestino de <i>P. geoffroanus</i> (corte longitudinal). Presenças de GAG's ácidas (seta). AB. Barra = 50 µm.....	84
Figura 35: Fotomicrografia do intestino de <i>P. geoffroanus</i> (corte longitudinal). Porção posterior - Presença de GAG's neutras (seta). PAS. Barra = 100 µm.....	84
Figura 36: Fotomicrografia do intestino de <i>P. geoffroanus</i> (corte longitudinal). Presença de GAG's ácidas (seta). AB. Barra = 100 µm.....	85
Figura 37: Morfologia geral do tubo digestivo de <i>P. geoffroanus</i>. Superfície interna: (D) Transição Estômago-Intestino (E) Intestino anterior com vilosidades digitiformes (F)	

Intestino anterior com vilosidades em forma de folha (G) Transição Intestino anterior-posterior (H) Intestino posterior.....	86
Figura 38: Fotomicrografia do intestino de <i>P. geoffroanus</i> (corte transversal). Porção anterior - Camada muscular de fibras musculares lisas, composta por uma subcamada interna circular (ic) e a externa longitudinal (el). HE. Barra = 100 µm.....	87
Figura 39: Fotomicrografia do intestino de <i>P. geoffroanus</i> (corte transversal). (38) Porção posterior - Porção posterior . Organização da camada muscular, circular interna (ic) e longitudinal externa (el). HE. Barra = 100 µm.....	87
Figura 40: Fotomicrografia do intestino de <i>P. geoffroanus</i> (corte transversal). (38) Porção posterior - Plexo mioentérico. HE. Barra = 50 µm.....	88
Figura 41: Fotomicrografia de células IR ao anticorpo anti-5-HT na região anterior do intestino de <i>P. geoffroanus</i> . Células IR, dos tipos aberto (seta) e fechado (cabeça de seta), compoendo a camada epitelial do intestino e também entremeada na lâmina própria. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barra 50 µm.....	89
Figura 42: Fotomicrografia de células IR ao anticorpo anti-5-HT na região posterior do intestino de <i>P. geoffroanus</i> . Marcações de ambas as morfologias celulares inseridas no epitélio intestinal: aberto (seta) e fechado (cabeça de seta). Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barra 50 µm.....	89
Figura 43: Fotomicrografia de células IR ao anticorpo anti-SOM na região anterior do intestino de <i>P. geoffroanus</i> . Células IR compoendo a camada epitelial do intestino. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barra 50 µm.....	90
Figuras 44 e 45: Fotomicrografias de células IR ao anticorpo anti-SOM no intestino de <i>P. geoffroanus</i> . Intestino anterior – (44) Células IR, dos tipos aberto (seta) e fechado (cabeça de seta), compoendo a camada epitelial do intestino. (45) Intestino posterior – células do tipo aberto (seta) e do tipo fechado (cabeça de seta) Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barra 50 µm.....	91
Figura 46: Morfologia geral do tubo digestivo de <i>P. geoffroanus</i>. Superfície interna: (A) Esôfago e Estômago anterior (B) Estômago Médio (C) Estômago posterior (D) Transição Estômago-Intestino (E) Intestino anterior com vilosidades digitiformes (F) Intestino anterior com vilosidades em forma de folha (G) Transição Intestino anterio-posterior (H) Intestino posterior.....	96
Figura 47: Histologia geral do tubo digestivo de <i>P. geoffroanus</i>. (1) Glândulas intraepiteliais do esôfago. (2) Células endócrinas. (3) Glândulas gástricas. (4) Fossetas Gástricas. (5) Células oxintopépticas. (6) Células caliciformes. (7) Plexo mioentérico.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produtos de algumas células endócrinas.....	18
Tabela 2 - Dados do registro dos espécimes de <i>P. geoffroanus</i> depositados na Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da UFJF, MG.....	21
Tabela 3 - Detalhes dos anticorpos primários usados neste estudo.....	22
Tabela 4 : Frequência relativa e valores médios (\pm DP) de células endócrinas imunorreativas por mm ² da mucosa dos segmentos TD de <i>P. Geoffroanus</i>	98

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 . 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/~chm/vchemook/614hormone.htm	22
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 Sistemática da Espécie.....	16
1.2 Sistema Digestório de Testudines	17
1.2.1 Anatomia geral	17
1.2.2 Histologia geral	17
2 OBJETIVO GERAL	19
2.1 Objetivos Específicos	19
3 HIPÓTESE	19
4 JUSTIFICATIVA	20
5 METODOLOGIA	20
5.1 Procedência dos Animais Utilizados.....	20
5.2 Processamento Histológico.....	21
5.3 Método Imuno-histoquímico Utilizado	22
5.4 Observações e Fotomicrografias	23
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO I - <i>Esôfago de Phrynops geoffroanus</i>: Caracterização histológica e histoquímica e detecção por imuno-histoquímica de células do Sistema Neuroendócrino Difuso	29
RESUMO I	30
ABSTRACT I	31
1 INTRODUÇÃO	32
2 MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1 Processamento dos Tecidos	32
2.2 Imuno-histoquímica.....	33
3 RESULTADOS	33
3.1 Histologia e Histoquímica	33
3.2 Imuno-histoquímica.....	37

3.2.1 Serotonina (5-HT)	37
4 DISCUSSÃO	37
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
CAPÍTULO II - Estômago de <i>Phrynos geoffroanus</i>: Caracterização histológica e histoquímica e detecção por imuno-histoquímica de células do Sistema Neuroendócrino Difuso	46
RESUMO II	47
ABSTRACT II	48
1 INTRODUÇÃO	49
2 MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1 Processamento dos Tecidos	50
2.2 Imuno-histoquímica	50
3 RESULTADOS	51
3.1 Histologia e Histoquímica	51
3.2 Imuno-histoquímica	59
3.2.1 Serotonina (5-HT)	59
3.2.2 Somatostatina (SOM)	61
3.2.3 Insulina (INS)	63
4 DISCUSSÃO	65
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
CAPÍTULO III - Intestino de <i>Phrynos geoffroanus</i>: Caracterização histológica e histoquímica e detecção por imuno-histoquímica de células do Sistema Neuroendócrino Difuso	77
RESUMO III	78
ABSTRACT III	79
1 INTRODUÇÃO	80
2 MATERIAL E MÉTODOS	81
2.1 Processamento dos Tecidos	81
2.2 Imuno-histoquímica	81
3 RESULTADOS	82
3.1 Histologia e Histoquímica	82

3.2 Imuno-histoquímica.....	88
3.2.1 Serotonina (5-HT)	88
3.2.2 Somatostatina (SOM)	90
3.2.3 Insulina (INS).....	90
4 DISCUSSÃO.....	92
CONCLUSÃO GERAL	99
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXO A.....	110
ANEXO B	111

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os Testudines são um dos principais representantes das redes tróficas dos ecossistemas aquáticos, muitas vezes compondo a maior biomassa destes habitats (BURY, 1979; SOUZA & ABE, 1997, 2000). Sendo assim, possuem uma posição importante no fluxo de energia, no ciclo de nutrientes e na manutenção da qualidade da água dentro destes sistemas (MOLL & MOLL, 2004). Até o presente foram identificadas 327 espécies, destas 36 ocorrem no Brasil (BÉRNILS & COSTA, 2012). Apesar do grande número de espécies, os ambientes aquáticos e o modo de vida destes animais dificultam os estudos *In-situ*, o que justifica a carência de informações sobre a biologia do grupo (CARPENTER & FERGUSON, 1977) e a pouca utilização destes como modelos para estudos de zoologia (BURY, 1979).

A degradação dos sistemas aquáticos vinculada à remoção de florestas de galeria, à redução de sombreamento e de nutrientes, ao aumento da erosão, assoreamento, poluição industrial e doméstica (RODRIGUES, 2005); somada à caça predatória, ao tráfico de animais e de produtos medicinais, à competição com espécies invasoras e ao aquecimento global (BUJES, 2008) podem acarretar a extinção local de algumas espécies ou abrir oportunidades à ocupação por outras (MURPHY, 1997). Se tratando de quelônios, apesar de muitos destes danos causarem um declínio na fauna de invertebrados que compõem sua alimentação (PINGLE *et al.*, 2000; NILSSON & BERGGREN, 2000) e consecutivamente levar a vulnerabilidade de muitas espécies deste grupo, algumas espécies são consideradas fisiologicamente oportunistas (MOLL, 1980), tirando proveito do maior aporte de matéria orgânica gerado pela ação antrópica (JULIO *et al.*, 1997).

A alimentação é um dos assuntos mais abordados nos estudos envolvendo cágados (ERNST & BARBOUR, 1989, FACHÍN-TERÁN *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 1997; SOUZA & ABE, 1995, 1997, 1998, 2000). Os quelônios dulcícolas neotropicais têm hábitos alimentares amplos que abrangem invertebrados, pequenos vertebrados, carniça e partes vegetais como talos, frutos, sementes e algas (MEDEM, 1960; FACHÍN-TERÁN *et al.*, 1995; PÉREZ-EMÁN & PAOLILLO, 1997; SOUZA & ABE, 2000; SOUZA, 2004; HAHN, 2005; BRASIL, 2008). A disponibilidade de muitos destes recursos alimentares depende de fatores climáticos, o que provoca variações sazonais na dieta destes animais (SCHOENER, 1971). O desenvolvimento ontogenético também pode ocasionar mudanças no hábito alimentar. Quelônios mais jovens precisam de um aporte maior de nutrientes para garantir seu crescimento (CLARK & GIBBONS, 1969; BOUCHARD & BJORNDAL, 2006), para isso consomem mais alimentos de origem animal. Quando na fase adulta, estes passam a utilizar também itens de origem vegetal (CLARK & GIBBONS, 1969; GEORGES, 1982; HART, 1983; BURY, 1986, BOUCHARD & BJORNDAL, 2006). Algumas espécies de testudines também apresentaram diferença na dieta entre os sexos (BURY, 1986; FACHÍN-TERÁN *et al.*, 1995; CHEN & LUE, 1999; HAHN, 2005). Esta diferença é explicada pelo micro-habitat escolhido pelos machos e fêmeas. As fêmeas tendem a buscar locais com águas mais profundas, já os machos preferem águas rasas perto das margens.

P. geoffroanus, espécie de quelônio integrante da família Chelidae, é intimamente dependente do ambiente aquático, sendo a integridade desse ecossistema indispensável para as atividades vitais da espécie. Segundo um estudo realizado por BRITES (2002), alterações ambientais provocadas pelo homem podem comprometer as funções orgânicas da espécie, uma vez que espécimes habitantes de áreas urbanizadas mostraram-se mais propensas à aquisição de doença. Sendo assim, informações detalhadas sobre o hábito alimentar deste quelônio, com o intuito de esclarecer fenômenos fisiológicos e patológicos do TD, são

primordiais na implementação de projetos de manejo e conservação, podendo servir de base para estudos com outras espécies de cágados, tendo em vista a carência de estudos com esta vertente. Arelado a isto, os conhecimentos histológico, histoquímico e imuno-histoquímico torna-se potencialmente importante uma vez que se encarrega de esclarecer o arranjo e a morfologia celular do TD, elucidando a presença e frequência de células endócrinas do sistema neuro-endócrino difuso, facilitando o entendimento da biologia do animal.

1.1 Sistemática da Espécie

Com base na filogenia, os répteis são divididos em quatro ordens: Testudines (tartarugas, cágados, e jabutis), Lepidosauria (lagartos, serpentes, anfisbênia e tuatara), Crocodylia (crocodilos, jacaré e gaviais) e Aves, cada grupo com características conspícuas (RIEPEL & REISZ, 1999; POUGH & HEISER, 2003). Estes são assim classificados por apresentarem peculiaridades que os permitem explorar o ambiente terrestre independente da presença de água. Dentre as inúmeras características que os agrupa a mais marcante é a presença de uma pele seca, praticamente carente de glândulas, revestida por escamas epidérmicas ou placas córneas.

Os Testudines compõem um grupo parafilético dentro da classe Reptilia, devido a especializações morfológica, fisiológica e ecológicas peculiares ao grupo, não sendo identificado nenhum estado intermediário que os ligue a outros vertebrados (POUGH & HEISER, 2008). São únicos pelo fato de apresentarem as cinturas escapular e pélvica no interior de um casco coberto por escudos córneos epidérmicos. Este é formado por uma parte convexa dorsal, denominado carapaça, e uma parte achatada ventral, o plastrão. Até o presente, foram identificadas 327 espécies, destas 36 ocorrem no Brasil (SBH, 2012).

Atualmente encontram-se duas sub-ordens entre os Testudines, Cryptodira (Grego, *crypto* = escondido, *dire* = pescoço) e Pleurodira (Grego, *pleuro* = lado) (POUGH & HEISER, 2008). A primeira agrupa indivíduos com capacidade de retraírem a cabeça e escondê-la dentro do casco (jabutis, tartarugas marinhas e algumas tartarugas de água doce), os quais compõem a maioria dos quelônios atuais. Já a segunda sub-ordem reúne aqueles que flexionam o pescoço lateralmente sendo incapazes de recolherem a cabeça para o interior do casco (cágados).

Dentre os pleurodira, destaca-se a família Chelidae, representada pelos cágados semi-aquáticos, a qual agrupa 50 espécies (BONIN *et al.*, 2006) que habitam somente a América do Sul e a Austrália (GREER, 2003), das quais 20 são encontradas no Brasil (BÉRNILS & COSTA, 2012). São animais de carapaças baixas e com patas anteriores em forma de remos, o que facilita a vida aquática, uma vez que tais características diminuem a resistência imposta pela água ao deslocamento, potencializando assim a locomoção destes animais (POUGH & HEISER, 2008).

De acordo com METRAILLER (2002), o gênero *Phrynops* é constituído por quatro espécies, sendo a espécie *P. geoffroanus* (SCHWEIGGER, 1812), de pequeno porte, encontrada com frequência em rios, lagos e lagoas de correnteza lenta (ERNEST & BARBOUR, 1989). *P. geoffroanus* tem hábito diurno, expondo-se sobre troncos, pedras ou ao longo das margens dos rios nas horas do dia com picos elevados de temperaturas (MEDEM 1960; MONTEIRO & DIEFENBACH, 1987; MOLINA 1989; SOUZA & ABE, 1999). É encontrada desde a Colômbia, Venezuela, Guiana, extremo sul do Paraguai até sudeste, centro-oeste e nordeste do Brasil (MOURA, 2009). Apesar da extensa distribuição geográfica, são escassas as informações a respeito desta espécie. De acordo com GUIX *et al.*, (1989), por esta ampla distribuição geográfica, a qual abrange diferentes biotas, *P. geoffroanus* pode ser um conjunto de espécies crípticas ainda não diferenciadas.

De modo geral, o “Cágado de Barbicha”, nome vulgar dado à espécie, chega a medir 35 cm de comprimento. FERRAREZI (2006) o descreveu como portador de uma carapaça achatada e larga com coloração preta ou cinza esverdeada. O plastrão possui um entalhe anal e tem uma coloração vermelha rosada com manchas irregulares e pretas. A cabeça é larga e lisa, com coloração preta, linhas brancas e irregulares. A parte inferior é branca com linhas e pontos pretos. A característica mais proeminente dessa espécie é uma linha preta e larga que se estende longitudinalmente pelo olho. Possui também um par de “barbelas” no “queixo”, e os membros são cinza com manchas brancas.

P. geoffroanus foi inicialmente considerado uma espécie quase exclusivamente carnívora por MEDEM (1960) e MOLINA (1989). Estudos mais recentes caracterizou a espécie como onívora, consumindo desde sementes e frutos a peixes e insetos (FACHÍN-TERÁN *et al.*, 1995; SOUZA & ABE, 2000; DIAZ & SOUZA, 2005; GUARDIA *et al.*, 2007; DECONTE, 2012). Estudos sugerem que esta variação no hábito alimentar de *P. geoffroanus* está diretamente ligada a características do ambiente. FACHÍN-TERÁN *et al.*, (1995) observaram que em períodos secos na Amazônia, insetos e crustáceos predominam na dieta de *P. geoffroanus*, porém, na mesma região em período chuvoso apenas frutos foram notados. Observou-se também que em locais antropofizados, esta espécie aproveita-se do esgoto doméstico (SOUZA & ABE 1999, 2000; SOUZA, 2004; DECONTE, 2012).

1.2 Sistema Digestório de Testudines

1.2.1 Anatomia geral

O sistema digestório é constituído, basicamente, de boca, faringe, esôfago, estômago, intestinos delgado e grosso, reto e cloaca, além dos órgãos anexos: glândulas salivares, pâncreas e fígado (BERNARDE, 2003). São desprovidos de dentes, possuindo no lugar deste um bico córneo rígido, que atuam tanto na apreensão de alimento quanto na defesa do animal. Apresentam mandíbula com resistente musculatura, o que facilita na quebra de alimento. A língua acomoda-se no assoalho da boca, seguida da glote. As glândulas salivares atuam na produção de muco, as quais não sintetizam enzimas digestivas. Estas são fabricadas pelo estômago, intestino delgado, fígado, pâncreas e vesícula biliar. O ceco é pouco desenvolvido nos animais ainda jovens, aumentando seu volume à medida que estes se tornam adulto, indício da crescente ingestão vegetal ao longo do desenvolvimento. O sistema digestório é finalizado pela cloaca, composta pelo ânus e pelos orifícios urinário e genital (LUZ & REIS, 1999; MADER, 1996).

Anatomicamente, em um estudo realizado por BRITO (2007), caracterizou o TD de *P. geoffroanus* como sendo curto e simples. Observou-se que o estômago faz uma curva acentuada para a direita e a transição com o duodeno é notada apenas pelo estreitamento da parede do órgão. O duodeno situa-se inteiramente no antímero direito do animal. O jejuno-íleo tem dimensões maiores que o segmento anterior, sendo mais comprido e mais largo, posicionando-se medianamente. Na passagem deste para o cólon-retos, há um considerável aumento da luz do órgão que se mantém constante até o final.

1.2.2 Histologia geral

No epitélio gastrintestinal permeiam um conjunto de células, oriundas do SND, denominadas células endócrinas, as quais se encarregam, por meio de secreções, de controlar o funcionamento eficiente da digestão dos alimentos. Segundo DEVENEY & WAL (1983), estas secreções operam na regulação dos processos digestivos, controlando a absorção de nutrientes, além de desempenharem importantes funções na secreção intestinal e das

glândulas associadas, na motilidade e no fluxo sanguíneo intestinal. Alguns hormônios, produtos destas células, estão apontados na tabela a seguir (Tabela 1) e em sequência serão discriminados individualmente.

Tabela 1- Produtos de algumas células endócrinas.

Hormônio produzido	Efeito principal
Serotonina	Aumento da mobilidade intestinal
Gastrina	Estimulação da secreção ácida gástrica
Somatostatina	Inibição localizada de outras celas enteroendócrinas
Glucagon	Glicogenólise hepática
Insulina	Manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular.
Polipeptídeo pancreático	Atua na musculatura do TD estimulando o esvaziamento gástrico

Serotonina (5-HT) - Também conhecido como 5-hidroxitriptamina, 5-HT é um neurotransmissor produzido por neurônios serotoninérgicos do Sistema Nervoso Central (SNC) e por células do SND, estas amplamente distribuídas no TD produzindo mais de 90% da serotonina do corpo (AHLMAN & NILSSON, 2001). Este hormônio tem ação moduladora geral da conduta afetiva associada a ações sobre cognição e comportamentos homeostáticos. Regula o humor, o sono, a atividade sexual, o apetite, o ritmo circadiano, as funções neuroendócrinas e autonômicas, a temperatura corporal, a sensibilidade à dor, a atividade motora, as funções cognitivas e também age aumentando a motilidade intestinal (RESNICK *et al.*, 1961).

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

Somatostatina (SOM) - A SOM é assim denominada devido à habilidade de inibir a secreção do hormônio responsável pelo crescimento (somatotrofina). Elevadas concentrações de SOM foram encontradas no pâncreas, estômago e duodeno (ARIMURA *et al.*, 1975) e tem função inibidora em muitos órgãos como tireóide, pâncreas, estômago e vesícula biliar. Inibe também a liberação de hormônios pelas células enteroendócrinas da vizinhança. A SOM atua nas células produtoras de gastrina e nas células semelhantes à enterocromafins inibindo a liberação de secreções (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Glucagon (GLUC) - É um hormônio polipeptídico sintetizado pelas células alfa das ilhotas pancreáticas e também por células dispersas pelo TD. Inúmeras evidências permitem afirmar que os enteroglucagons e o glucagon pancreático são frutos da clivagem enzimática

diferencial da molécula de um precursor comum a ambos (BERNE & LEVY, 2000). De acordo com FOA *et al.*, (1957), o aumento da glicemia, por meio da glicogenólise hepática, é uma das ações mais relevantes do GLUC, mas este possui outras ações biológicas, tais como a lipólise e a cetogênese.

Insulina (INS) - Secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas, em virtude do aumento dos níveis de glicose e aminoácidos na circulação após a ingestão de alimento, a INS é um hormônio anabólico fundamental para o controle da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. Regula a variação de glicose por meio da redução da produção hepática (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e também ampliando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. Este peptídeo também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação protéica (CARVALHEIRA *et al.*, 2002).

Polipeptídeo pancreático (PP) - A secreção de PP é estimulada pelos hormônios CCK, GAS e secretina, e também pelo nervo vago. Este atua na musculatura do TD estimulando o esvaziamento gástrico (RODRIGUES, 2005). Os níveis de PP aumentam após a alimentação, a ingestão de proteínas, o jejum, o exercício e a hipoglicemia, sendo inibida pela somatostatina e glicose intravenosa (GANONG, 1998). Este hormônio controla as secreções de ácido gástrico e enzimas, a motilidade do TD e as secreções pancreáticas (RODRIGUES, 2005).

2 OBJETIVO GERAL

Os conhecimentos morfológicos do TD da maioria dos Testudines, principalmente das espécies que ocorrem no Brasil são ínfimos. Visando ampliar esta linha de pesquisa, o atual trabalho objetiva caracterizar através de técnicas histológicas a morfologia e organização celular do TD nos segmentos esôfago, estômago e intestino da espécie *Phrynops geoffroanus* pertencente à família Chelidae, relacionando-o com o hábito alimentar deste réptil. Bem como evidenciar a produção hormonal do sistema digestório a partir de técnicas de imunohistoquímica.

2.1 Objetivos Específicos

- Analisar e descrever a histologia do TD de *P. geoffroanus*, visando obter dados para efetivação de estudos futuros.
- Avaliar através de técnicas histoquímicas a mucosa do TD deste réptil.
- Verificar a presença e distribuição de células endócrinas produtoras de serotonina (5-HT), gastrina (GAS), somatostatina (SOM), glucagon (GLUC), insulina (INS) e polipeptídeo pancreático (PP) nos segmentos do TD desta mesma espécie.
- Relacionar a morfologia do TD da espécie analisada à dieta alimentar.

3 HIPÓTESE

A morfologia do TD e a distribuição de células endócrinas em *P. geoffroanus* obedecem ao padrão alimentar onívoro.

4 JUSTIFICATIVA

No Brasil, criar animais selvagens visando à reintrodução dos mesmos em seu habitat natural, uma vez que este tenha sido afetado negativamente, tem sido uma alternativa para amenizar os estragos cometidos pela ação humana. Esta atividade valoriza a sustentabilidade dos recursos naturais, promovendo a prevenção da fauna nacional (SÀ *et al.*, 2004). Entretanto, a escassez de estudos que possam agregar conhecimentos e informações acerca da produção de animais silvestres, restringe e dificulta a atividade. Havendo deficiência em abordagens mais amplas como aspectos ecológicos e evolutivos das espécies, que são primordiais em eventuais planos de conservação e manejo (SOUZA, 2004).

Nota-se, hoje, uma ampliação em pesquisas com animais silvestres em diversas áreas, tais como morfologia, nutrição, manejo. Uma vez que, de acordo com Morlock (1979), as doenças desenvolvidas em quelônios criados em cativeiros estão ligadas às más condições de sanidade. Nesse sentido, diversos estudos têm sido conduzidos com o grupo Testudines, com o intuito de esclarecer fenômenos fisiológicos e patológicos do TD (BEREGI *et al.*, 2000, 2002 *apud* BRITO, 2007, p. 2). Por estar envolvido com processos digestivos e homeostáticos, é fundamental o entendimento de todos os segmentos do TD no processamento dos alimentos, de modo a contribuir com fatores nutricionais e assim melhorar o manejo e condicionamento das espécies em seus ecossistemas. Se tratando de espécies de quelônios brasileiros esta atenção se redobra uma vez que grande parte é classificada como espécie vulnerável pela IUCN (2010), devido às alterações antrópicas sofridas por seus habitats naturais.

O cágado *P. geoffroanus* não possui importância econômica, pois não é consumido com regularidade pelo homem, devido a carne por vezes causar reações alérgicas. Mas alguns ribeirinhos da Bacia do Rio Amazonas, ocasionalmente, alimentam-se desta espécie (VOGT 2008; SCHNEIDER *et al.*, 2011). Apesar de não ser frequentemente predada pelo homem esta espécie tem sido afetada negativamente por mudanças em seu habitat natural. Ao longo do Rio Guaporé, por exemplo, o desmatamento para criação de gado, além de modificar o nicho ecológico da espécie *P. geoffroanus*, interfere na reprodução, uma vez que por ação mecânica o gado destrói seus ninhos e altera seu habitat de nidificação. Além disso, o desmatamento também provoca mudanças na oferta de alimentos da região, o que pressiona os organismos a buscar novas alternativas, como o lagarto *Tupinambis teguxin* que aumentou a predação aos ovos de *P. geoffroanus* (SCHNEIDER *et al.*, 2011). Em outras cidades brasileiras é a poluição a causa das alterações no ambiente utilizado pela espécie. Um estudo realizado por SOUZA & ABE (2000) registrou espécimes de *P. geoffroanus* em rios poluídos, incluindo o Rio Preto e alguns de seus afluentes (Bacia Rio Grande, SP).

5 METODOLOGIA

5.1 Procedência dos Animais Utilizados

Para realização deste estudo foi coletado o tubo digestivo de quatro espécimes adultos de *P. geoffroanus* (Figura 1) que se encontram depositados na Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), MG. Estes animais são tombados (Tabela 2) e estão acondicionados em meio líquido, solução de formol

10% e devidamente etiquetados. O material coletado foi encaminhado ao Laboratório de Histologia e Embriologia da UFRRJ.



Figura 1: Exemplar de *Phrynops geoffroanus*.

Tabela 2 - Dados do registro dos espécimes de *P. geoffroanus* depositados na Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da UFJF, MG.

Número de tombo	Sexo	Procedência
565	Macho	Museu Mariano Procópio, Juiz de Fora, MG.
567	Macho	Museu Mariano Procópio, Juiz de Fora, MG.
568	Fêmea	Museu Mariano Procópio, Juiz de Fora, MG.
570	Macho	Museu Mariano Procópio, Juiz de Fora, MG.

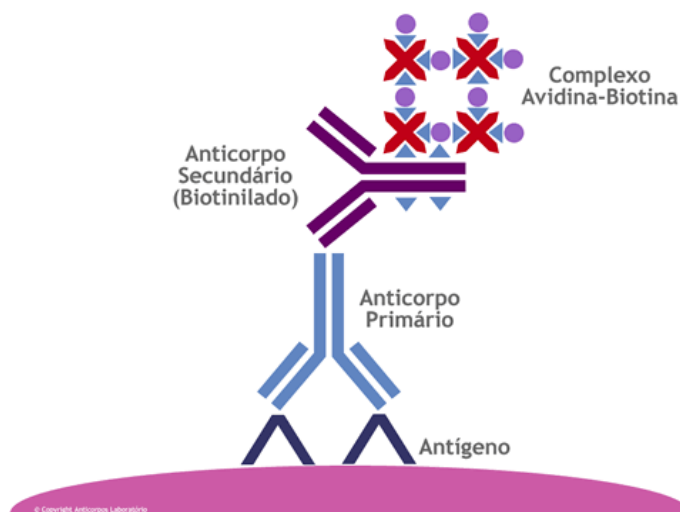
5.2 Processamento Histológico

No laboratório os tubos digestivos coletados dos exemplares de *P. geoffroanus* foram clivados em fragmentos seriados transversais e longitudinais (Figura 44). Posteriormente, estes foram submetidos aos processamentos de técnica histológica de rotina para obtenção de cortes histológicos de 5 μ m espessura em micrótomo. Os cortes obtidos foram submetidos aos protocolos histológicos convencionais de Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Gomori (TG) e aos histoquímicos do Ácido periódico de Schiff (PAS) e do Alcian Blue (AB) pH 0.4 e pH 2.5.

5.3 Método Imuno-histoquímico Utilizado

O complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) foi o método aplicado neste trabalho. Nesta técnica são usados três reagentes: Um anticorpoprimário, que se liga ao receptor do hormônio específico, o qual se deseja evidenciar; Um anticorpo secundário, que é produzido ligado a uma molécula da vitamina biotina (C) e que se une aos receptores do anticorpo primário; e o complexo de glicoproteínas - Avidina pronta a partir da biotina e peroxidase - (AB), que se liga ao reagente anterior, o anticorpo secundário (Esquema 1). O protocolo contendo as etapas do processo foi anexado ao final deste trabalho (Anexo A).

Neste estudo imuno-histoquímico os cortes histológicos foram submetidos às etapas de processamento de rotina da técnica de imuno-histoquímica, entre as quais inclui a incubação com os anticorpos específicos listados na Tabela 3.



Esquema 1. 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

Tabela 3 - Detalhes dos anticorpos primários usados neste estudo.

Anticorpos primários	Doador	Código	Diluição	Laboratório
Serotonina (5HT)	coelho	S5545	1:8.000	Sigma-Aldrich, Inc. USA
Gastrina (GAS)	coelho	G0785	1:1.000	Sigma-Aldrich, Inc. USA
Somatostatina (SOM)	coelho	A566	1:300	Dako Corp., CA, USA
Glucagon (GLUC)	rato	G2654	1:2.000	Sigma-Aldrich, Inc. USA
Insulina (INS)	rato	I2018	1:1.000	Sigma-Aldrich, Inc. USA
Polipeptídeo Pancreático (PP)	coelho	RP030	1:25	Diagnostic Biosystems, Inc. CA, USA

5. 4 Observações e Fotomicrografias

Todas as lâminas foram observadas e fotografadas com auxílio do microscópio Olympus BX41 e câmera digital Sony Cybershot DSCW 230. 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 (mm²) da mucosa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLMAN, H. & NILSSON, O. The gut as the largest endocrine organ in the body. **Annals of Oncology**, v. 12, n. 2, p. S63-S68, 2001.
- ARIMURA, A.; SATO, H.; DUPONT, A.; NISHI, N. & SCHALLY, A.V. Somatostatin: abundance of immunoreactive hormone in rat stomach and pancreas. **Science**, v. 189, n. 4207, p. 1007-1009, 1975.
- BEREGI, A.; MOLNAR, V.; FELKAI, F.; BIRO, F. Teknosok rontgendiagnosztikai vizsgalata: 1. Felvetel elkeszitesenek tekhnikaja, a tekosok rontgenanatomiaja. **Mávsz.**, Budapest, v. 122, n. 12, p. 723-728, 2000.
- BEREGI, A.; MOLNAR, V.; FELKAI, F.; BIRO, F. Teknosok rontgendiagnosztikai vizsgalata: 2. A radiologiai vizsgalat indikacioci, a koros elvaltozasok rontgenleletei. **Mávsz.**, Budapest, v. 124, n. 1, p. 655-662, 2002.
- BERNARDE, P. S. **Sistema digestório dos répteis**. Disponível em: <<http://www.herpetofauna.hpg.ig.com.br/Pages/SistemaDigestorio>>. Acesso em: agosto 2003.
- BERNE, R. M. & LEVY, M. N. **Fisiologia**. 4. ed. . Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2000. 988p.
- BÉRNILS, R. S. & COSTA, H. C. (org.). **Répteis brasileiros: Lista de espécies**. Versão 2012.2. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acesso em: janeiro de 2012.
- BONIN, F., DEVAUX, B. & DUPRE, A. **Turtles of the world**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2006. 416p.
- BOUCHARD, S. S. & BJORNDAL, K. A. Ontogenetic diet shifts and digestive constraints in the omnivorous freshwater turtle *Trachemys scripta*. **Physiological and Biochemical Zoology**, v.79, n.1, p. 150-158, 2006.
- BRASIL, M. A. **Ecologia alimentar de *Acanthochelys spixii* (Testudines, Chelidae) no Parque Nacional de Brasília, Distrito Federal**. 2008. 42f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

- BRITES, V. L. C. **Hematologia, bioquímica do sangue, parasitologia, microbiologia, algas epizoárias e histopatologia de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudinata, Chelidae), expostos a diferentes influências antrópicas no rio Uberabinha, Minas Gerais.** 2002. 196f. Tese (Doutorado em Ecologia dos Recursos Naturais) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, SP, 2002.
- BRITO, F. M. M. **Aspectos anátomo-radiográficos e tempo do trânsito gastrintestinal em cágados-de-barbicha *Phrynops geoffroanus* Schweigger, 1812 (Testudines, Chelidae).** 2007. 30f. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias - Saúde animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, MG, 2007.
- BUJES, C. S. **Biologia e conservação de quelônios no delta do rio Jacuí – RS: aspectos da história natural de espécies em ambientes alterados pelo homem.** 2008. 248f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2008.
- BURY, R. B. Population ecology of freshwater turtles. In: HARLESS, M.; MORLOCK, H. (Ed.). **Turtles: perspectives and research.** New York: John Wiley, 1979. p. 571-604.
- BURY, R. B. Feeding ecology of the turtle, *Clemmys marmorata*. **Journal of Herpetology**, v.20, n.4, p. 515-521, 1986.
- CARPENTER, C. C. & FERGUSON, G. W. Variation and evolution of stereotyped behavior in reptiles. In: GANS, C. E TINKLE, D. W. (ed.). **Biology of the reptilian: Ecology and Behavior**, v. 7A. London: Academic Press, 1977. p. 335-554.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G. & SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, 2002.
- CHEN, T. & LUE, K. Food habits of the Chinese Stripe-Necked Turtle, *Ocadia sinensis*, in the Keelung River, Northern Taiwan. **Journal of Herpetology**, v. 33, n. 3, p. 463-471, 1999.
- CLARK, D. B. & GIBBONS, J. W. Dietary shift in the turtle *Pseudemys scripta* (Schoepff) from youth to maturity. **Copeia**, v.1969, n.4, p.704-706, 1969.
- DECONTE, M. R. **Impacto antrópico na dieta do cágado-de-barbicha, *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae) no rio Uberabinha, Uberlândia, Minas Gerais.** 2012. 49f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais) - Universidade Federal de Uberlândia, MG, 2012.
- DEVENEY, C. W. & WAY, L. W. Regulatory peptides of gut. In: GREENSPAN, F. S.; FORSHAM, P. H. (Eds.). **Basic and Clinical Endocrinology**. Asian edn. Singapore: Maruzen, p. 479-499, 1983.
- DIAZ, L. C. & SOUZA, F. L. *Phrynops geoffroanus* (Geoffroy's side-necked turtle) DIET. **Herpetological Review**, Salt Lake City, v. 36, n.1, p. 56-57, 2005.

- ERNEST, C. H. & BARBOUR, R. W. **Turtles of the world**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1989. 313p.
- FACHÍN-TERÁN, A.; VOGT, R. C. & GOMEZ, M. F. S. Food habits of an assemblage of five species of turtles in the Rio Guaporé, Rondônia, Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 29, p. 536-547, 1995.
- FERRAREZI, A. L. **Estudos estruturais e funcionais das hemoglobinas de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812)**. 2006. 140f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, 2006.
- FOA, P. P.; GALANSINO, G. & POZZA, G. Glucagon, a second pancreatic hormone. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 13, p. 473-503, 1957.
- GANONG, W. F. **Fisiologia Médica**. 17. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 578 p.
- GEORGE, A. Diet of the Australian freshwater turtle *Emydura krefftii* (Chelonia: Chelidae), in an unproductive lentic environment. **Copeia**, v.1982, n.2, p. 331-336, 1982.
- GREER, A.E. 2003. **Encyclopedia of Australian Reptiles**. Australian Museum Online. Disponível em: <http://www.amonline.net.au/>. Acesso em: janeiro de 2007.
- GUARDIA, I.; MARQUES, T. S.; FERRONATO, B. O.; LONGO, A. L. B.; BERTOLUCI, J. & VERDADE, L. M. Dieta do cágado *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae) em ambientes antrópicos na cidade de Piracicaba, SP. In: **resumos do 15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo – Siicusp**, SP, 2007.
- GUIX, J. C.; SALVATTI, M.; PERONI, M. A. & LIMA-VERDE, J. S. Aspectos da reprodução de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em cativeiro (Testudines, Chelidae). **Grupo Estudos Ecológicos Série Documentos** 1:1–19, 1989.
- HAHN, A. T. **Análise da dieta de *Trachemys dorbigni* (Duméril e Bibron, 1835) no sul do Rio Grande do Sul, Brasil (Testudines: Emydidae)**. 2005. 53f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2005.
- HART, D. R. Dietary and habitat shift with size of Red-Eared Turtles (*Pseudemys scripta*) in a Southern Louisiana Population. **Herpetologica**, v. 39, n. 3, p. 285-290, 1983.
- IUCN. The International Union for Conservation of Nature. **Red List of Threatened Species**. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em: junho de 2010.
- JOHNSON, L. R.; COPELAND, E. M.; DUDRICK, S. J.; LICHTENBERGER, L. M. & CASTRO, G. A. Structural and hormonal alterations in the gastro-intestinal tract of parenterally fed rats. **Gastroenterology**, v. 68, p. 1177-1183, 1975.
- JULIO JÚNIOR, H. F.; BONECKER, C. C. & AGOSTINHO, A. A. Reservatório de Segredo e sua inserção na bacia do rio Iguaçu. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. (Ed.).

- Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo.** Maringá: EDUEM, 1997. p. 1-17.
- JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 542p.
- LIMA, A. C.; MAGNUSSON, W. E. & COSTA, V. L. Diet of the Turtle *Phrynops rufipes* in Central Amazônia. **Copeia**, v. 1997, p. 216-219, 1997.
- LUZ, V. L. F. & REIS, I. J. **Conservação e criação comercial de quelônios.** Goiânia: CENAQUA, 1999. 34p.
- MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery.** Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1996. 512p.
- MEDEM, F. Informe sobre reptiles colombianos (V). Observaciones sobre la distribución geográfica y ecología de la tortuga *Phrynops geoffroana* ssp. en Colombia. **Novedades Colombianas**, v. 1, p. 291-300, 1960.
- METRAILLER, S. **Chelidae d' Amerique du Sud. Bramois, 2002.** Disponível em: <<http://www.chelidae.com>>. Acesso em: junho de 2002.
- MOLINA, F. B. **Observações sobre a biologia e o comportamento de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em cativeiro (Reptilia, Testudines, Chelidae).** 185f. 1989. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, SP, 1989.
- MOLL, D. Dirty river turtles. **Natural History**, v. 89, n. 5, p. 43-49, 1980.
- MOLL, D. & MOLL, E. O. **The ecology, Exploration, and conservation of river turtles.** New York: Oxford University Press, 2004. 393p.
- MONTEIRO, L. P. & DIEFENBACH C. O. C. Thermal regime of *Phrynops hilarii* (Reptilia, Chelonia). **Boletim de Fisiologia Animal**, São Paulo v. 11, p. 41-50, 1987.
- MORLOCK, H. **Turtles: perspectives and research.** Norwich: John Wiley & Sons, 1979. 165p.
- MOURA, L. R.; **Aspectos morfológicos do fígado de tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) e *Phrynops geoffroanus* (Schwiegger, 1812) (Testudines, Chelidae).** 2009. 59f Dissertação (mestrado, em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, MG, 2009.
- MURPHY, D. D. Desafios à diversidade biológica em áreas urbanas. In: WILSON, E. O. (Ed.). **Biodiversidade.** Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.
- NILSSON, C. & BERGGREN, K. Alterations of riparian ecosystems caused by river regulation. **BioScience**, Washington, v. 50, n. 9, p. 783-792, 2000.

- PÉREZ-EMÁN, J. L. & PAOLILLO, O. A. Diet of the pelomedusid turtle *Peltocephalus dumerilianus* in the Venezuelan Amazon. **Journal of Herpetology**, v.31, n.2, p.173-179, 1997.
- PINGLE, C. M.; FREEMAN, M. C. & FREEMAN, B. J. Regional effects of hydrologic alterations on riverine macrobiota in the new world: Tropical-temperate comparisons. **BioScience**, Washington, v. 50, n. 9, p. 807- 823, 2000.
- POUGH, F. H. & HEISER J. B. **A vida dos vertebrados**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.798p.
- POUHG, F. H.; JANIS, M. C. & HEISER. B. J. **A vida dos Vertebrados**. 3ª ed. Atheneu São Paulo: Atheneu, 2003.699p.
- RESNICK, R. H.; SMITH, G. T. & GRAY, S. J. Endocrine influences on tissue serotonin content of the rat. **American Journal of Physiology**. v. 201, p. 571-573, 1961.
- RIEPEL, O. & REISZ, R. R. The Origin and Early Evolution of Turtles. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 30, p. 1-22, 1999.
- RODRIGUES, S. S.; FONSECA, C. C. & NEVES M. T. D. Células endócrinas do sistema gastro-entero-pancreático: Conceitos, distribuição, secreções, ação e controle. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 8, n. 2, p. 171-180, 2005.
- SÁ, V. A.; QUINTANILHA, L. C.; FRENEAU, E.; LUZ, V. L. F.; BORJA, A. L. R. & SILVA, P. C. Crescimento ponderal de filhotes de tartaruga gigante da Amazônia (*Podocnemis expansa*) submetidos a tratamento com rações isocalóricas contendo diferentes níveis de proteína bruta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n.6, p. 2351-2358, 2004.
- SCHNEIDER, L.; FERRARA, C. R.; VOGT. R. C. & GUILHON, A. V. Nesting Ecology and Nest Predation of *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae) in the Guaporé River of the Brazilian and Bolivian Amazon. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 10, n. 2, p. 206–212, 2011.
- SCHOENER, T. W. Theory of feeding strategies. **Annual Review of Ecology and Systematics**, n.2, p. 369-404, 1971.
- SCHWEIGGER, A. F. Prodrömus monographiae cheloniorum. Königsberg. Schweigger 1812. **Archives Naturwissenschaften Mathematiks**, v. 1, p. 271-368, 1812.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. **Lista brasileira de répteis**. Disponível em: <<http://www.sbherpetologi.org.br/checklist/repteis.htm>>. Acesso em: dezembro de 2012.
- SOUZA, F. L.& ABE, A. S. Feeding ecology, density and biomass of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting a polluted urban river in south-eastern Brazil. **Journal of Zoology**, n. 252, p. 437-446, 2000.

- SOUZA, F. L. & ABE, A. S. Population structure, activity, and conservation of the neotropical freshwater turtle, *Hydromedusa maximiliani*, in Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 2, n. 4, p. 521-525, 1997.
- SOUZA, F. L. & ABE, A. S. Observations on feeding habits of *Hydromedusa maximiliani* (Testudines: Chelidae) in South Eastern Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 1, p. 320-322, 1995.
- SOUZA, F. L. & ABE, A. S. Seasonal variation in the feeding habits of *Hydromedusa maximiliani* (Testudines, Chelidae). **Boletín de la Asociación Herpetológica Española**, v. 8, p. 17-20, 1997.
- SOUZA, F. L. & ABE, A. S. Resource partitioning by the Neotropical freshwater turtle, *Hydromedusa maximiliani*. **Journal of Herpetology**, v. 32, p. 106-112, 1998.
- SOUZA, F. L. & ABE, A. S. Fauna urbana: o cágado e a poluição dos rios. **Ciência Hoje**, v. 25, p. 59-61, 1999.
- SOUZA, F. L. & ABE, A. S.; Feeding ecology, density and biomass of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting a polluted urban river in south-eastern Brasil. **Journal of the Zoological society of London**, v. 252, p. 437-446, 2000.
- SOUZA, F. L. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa**, v. 3, n. 1, p. 15-27, 2004.
- VOGT, R. C. **Amazon Turtles, Lima, Peru**. Wust Editions: Grafica Biblos, 2008.

CAPÍTULO I

Esôfago de *Phrynops geoffroanus*: Caracterização histológica e histoquímica e detecção por imuno-histoquímica de células do Sistema Neuroendócrino Difuso

RESUMO I

VIEIRA-LOPES, Danielle Alcantara. **Esôfago de *Phrynops geoffroanus*: Caracterização histológica e histoquímica e detecção por imuno-histoquímica de células do Sistema Neuroendócrino Difuso**. 2013. 124p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O sistema digestório atua no processamento dos alimentos permitindo que compostos sejam assimilados e incorporados ao organismo dos animais. Mas a maneira com que cada ser vivo desenvolve este procedimento difere devido a fatores como a diversidade dos regimes alimentares e o modo de vida. Estes fatores moldam características morfológicas e fisiológicas dos órgãos digestores de maneira a potencializar este processo. O objetivo deste estudo é analisar a morfologia do esôfago de *Phrynops geoffroanus* usando métodos histológicos, histoquímicos e imunohistoquímicos. A parede do esôfago deste réptil é formada por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e adventícia. A camada mucosa é revestida pelo epitélio cilíndrico simples mucossecretor, onde estão inseridas glândulas intraepiteliais. Ambos apresentam positividade ao PAS e AB (pH 0.4 e pH 2.5). A lâmina própria e a submucosa são formadas por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos, sendo ausentes as glândulas esofágicas. Entre lâmina própria e a submucosa existe a muscular da mucosa que consiste de uma camada de fibras musculares lisas em sentido longitudinal ao trânsito da ingesta. A camada muscular é composta por uma subcamada interna de fibras musculares lisas longitudinais e uma subcamada externa de fibras circulares. Externamente encontra-se a adventícia. Células imunorreativas à serotonina estão presentes entre as células epiteliais e na base das glândulas intraepiteliais. Nenhuma reação aos anti-soros: anti-gastrina, anti-somatostatina, anti-glucagon, anti-insulina e anti-polipeptídeo pancreático é observada. Esta pesquisa visa colaborar com estudos sobre a fisiologia digestiva dos répteis, possibilitando uma futura comparação com outras espécies para maior compreensão dos aspectos evolutivos.

Palavras chaves: Réptil, histoquímica, mucinas, células endócrinas

ABSTRACT I

The esophagus of *Phrynops geoffroanus*: Histological and histochemical characterization and immunohistochemical detection of diffuse neuroendocrine system cells. 2013. 124p. Dissertation (Master in Animal Biology). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The digestive system allows compounds from food to be assimilated and incorporated in the organism. This procedure differs in each living being depending on the eating habits and lifestyle. These factors determine the morphological and physiological characteristics of the digestive organs. This study analyzes the morphology of the esophagus of *Phrynops geoffroanus* based on histological, histochemical and immunohistochemical techniques. The esophagus wall of this reptile is formed of four layers: mucosa, submucosa, muscular and adventitia. The mucosa layer is lined with a simple cylindrical epithelium with mucus-secreting cells with insertion of intraepithelial glands. Both react positively to PAS and AB (pH 0.4 and pH 2.5). The lamina propria and submucosa are formed of connective tissue and blood vessels, but esophageal glands are absent. There is a muscular layer between the lamina propria and submucosa consisting of smooth muscular fibers in the longitudinal direction of the passage of the ingesta. This muscular layer is composed of an internal sublayer of longitudinal smooth muscle fibers and an external sublayer of circular fibers. The adventitia layer is located externally. Immunoreactive cells to serotonin are present among the epithelial cells and at the base of the intraepithelial glands. There was no reaction to anti-gastrin, anti-somatostatin, anti-glucagon, anti-insulin and anti-pancreatic polypeptide observed. This study will help understanding of the digestive physiology of reptiles, enabling comparison with other species, to shed light on evolutionary questions.

Keywords: *Reptiles, histochemistry, mucins, endocrine cells.*

1 INTRODUÇÃO

A compreensão dos processos fisiológicos nos vertebrados é essencial para obtenção de dados sobre a biologia das espécies, e a possível utilização como instrumento diagnóstico para um manejo apropriado e para conservação. Sendo assim, a investigação de elementos do sistema digestório torna-se fundamental, uma vez que este reflete fielmente as pressões exercidas pelo ambiente sobre o organismo. A adaptação dos répteis a diferentes nichos ambientais leva a mudanças anatómicas e fisiológicas principalmente do sistema digestório, entre e dentro das diferentes ordens de répteis (MITCHELL & DIAZ-FIGUEROA, 2005). A literatura ressalta a importância do conhecimento da morfologia do tubo digestivo (TD), por este ser muito variável nos répteis relacionando à diversidade dos regimes alimentares e ao modo de vida (BICCA *et al.*, 2006). Uma ferramenta eficiente capaz de elucidar estes processos são os estudos histológicos (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2011).

Os testudines apresentaram um estilo de vida bem sucedido a partir do Triássico, e desde então pouco se modificaram. Estes combinam aspectos primitivos com características altamente especializadas não encontradas em nenhum outro vertebrado (POUGH & HEISER, 2008). *Phrynops geoffroanus* (cágado-de-barbicha) é um representante onívoro, da família Chelidae, consumindo desde sementes e frutos a peixes e insetos (FACHÍN-TERÁN *et al.*, 1995). A família amplamente distribuída na América do Sul, desde a Colômbia, Venezuela, Guiana, no extremo sul do Paraguai até sudeste, centro-oeste e nordeste do Brasil (MOURA, 2009).

Um estudo, realizado por BRITO (2007), caracterizou anatomicamente o TD de *P. geoffroanus* como sendo curto e simples, mas nenhuma averiguação acerca da histologia, histoquímica ou imuno-histoquímica foi realizada. Alguns estudos dedicados a investigar a anatomia microscópica do esôfago podem ser mencionados em: Peixes (SILVA, 2005; SANTOS *et al.*, 2007); Anfíbios (SANTANA & MENIN, 1997; GALLEGO-HUIDOBRO *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2008), Répteis (PEREIRA *et al.*, 2005; AHMED *et al.*, 2009; KOCA & GÜRCÜ, 2011), Aves (MONTEIRO *et al.*, 2009) e Mamíferos (CHAVES & SILVA, 1988; PEREIRA *et al.*, 2002; HELENO *et al.*, 2011).

Células endócrinas, oriundas do Sistema Neuroendócrino (SND), por meio de secreções, são indispensáveis para o funcionamento eficiente da digestão dos alimentos, pois regulam os processos digestivos, a absorção de nutrientes, a secreção intestinal e das glândulas associadas, a motilidade e o fluxo sanguíneo (DEVENEY & WAL, 1983).

A intenção deste trabalho foi descrever a histologia, a histoquímica e a imuno-histoquímica do esôfago de *P. geoffroanus*, de modo a avaliar a presença, distribuição e frequência relativa de células endócrinas produtoras de serotonina (5-HT), gastrina (GAS), somatostatina (SOM), glucagon (GLUC), insulina (INS) e polipeptídeo pancreático (PP), possibilitando uma futura comparação com outras espécies para maior compreensão dos aspectos evolutivos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Processamento dos Tecidos

No laboratório esôfago dos quatro espécimes de *P. geoffroanus* foi clivado em fragmentos seriados transversais e longitudinais (Figura 4). Posteriormente, estes foram

processados por técnica histológica de rotina: desidratação (em uma série de concentrações crescentes de etanol de 70° GL a 100° GL), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em Histosec (Merck, Darmstadt, Germany) para obtenção de cortes histológicos de 5 µm espessura em micrótomo. As lâminas com os fragmentos foram coradas pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE), para análise da arquitetura tecidual e Tricrômico de Gomori (TG), para visualização diferencial do tecido conjuntivo e de fibras colágenas. Para identificação de células mucossecretoras foi realizado o estudo histoquímico através dos métodos Ácido periódico de Schiff (PAS - Mc Manus, 1948 / glicoproteínas com diol vicinal oxidável e/ou glicogênio) e do Alcian Blue (AB - Lev e Spicer, 1964) com pH 0.4 (glicoproteínas altamente sulfatadas) e com pH 2.5 (glicoproteínas com grupos carboxila - ácido siálico e ácido urônico - e/ou com ésteres sulfatados) para evidenciação de glicosaminoglicanas (GAG's) neutras e ácidas, respectivamente.

2.2 Imuno-histoquímica

Para o estudo imuno-histoquímico, foram separados cortes histológicos do esôfago e colocados em lâminas previamente tratadas com poly-L-lysina (Sigma Aldrich, Inc). Posteriormente estes foram desparafinados e hidratados segundo protocolo de rotina. Em seguida foi feita a recuperação antigênica dos tecidos por meio de incubação em tampão citrato (pH 6,0 - 0,01M) e aquecimento no forno microondas por 15 minutos. Com o intuito de bloquear a enzima peroxidase endógena as secções foram incubadas em uma solução de H₂O₂ a 3% em metanol por um período de 15 minutos. Feito o bloqueio as mesmas foram colocadas em câmara úmida à temperatura ambiente e tratadas com soro não imune por 30 minutos. Em seguida as secções foram incubadas por 1 hora com anticorpos primários anti-hormônios gastrintestinais (Tabela 2). Depois foram tratadas com anticorpo biotilado "universal" secundário diluído a 1:200 durante 30 minutos, logo após com avidina-biotina-peroxidase complexo (ABC), diluído a 1:200, durante 30 min (ambos da PK 6200, Vector Laboratories, Inc., EUA). Subsequentemente, a revelação foi feita por reação com DAB/Plus (K 047, Diagnostic Biosystems, Inc., EUA), preparado de acordo com as instruções do kit. As diluições foram feitas com um diluente específico (Antibody Diluent - Spring Bioscience ADS-125) e para as lavagens entre fases utilizou-se tampão PBS (pH 7,4). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris e após desidratação em álcool e diafanização em xilol, as lâminas foram montadas com laminula e Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Para garantir a especificidade das reações, controles positivos e negativos foram utilizados. Por substituição do anticorpo primário por soro não imune os controles negativos foram definidos. Para os controles positivos foram utilizados cortes dos tipos de tecidos indicados no datasheet de cada anticorpo (Anexo B).

3 RESULTADOS

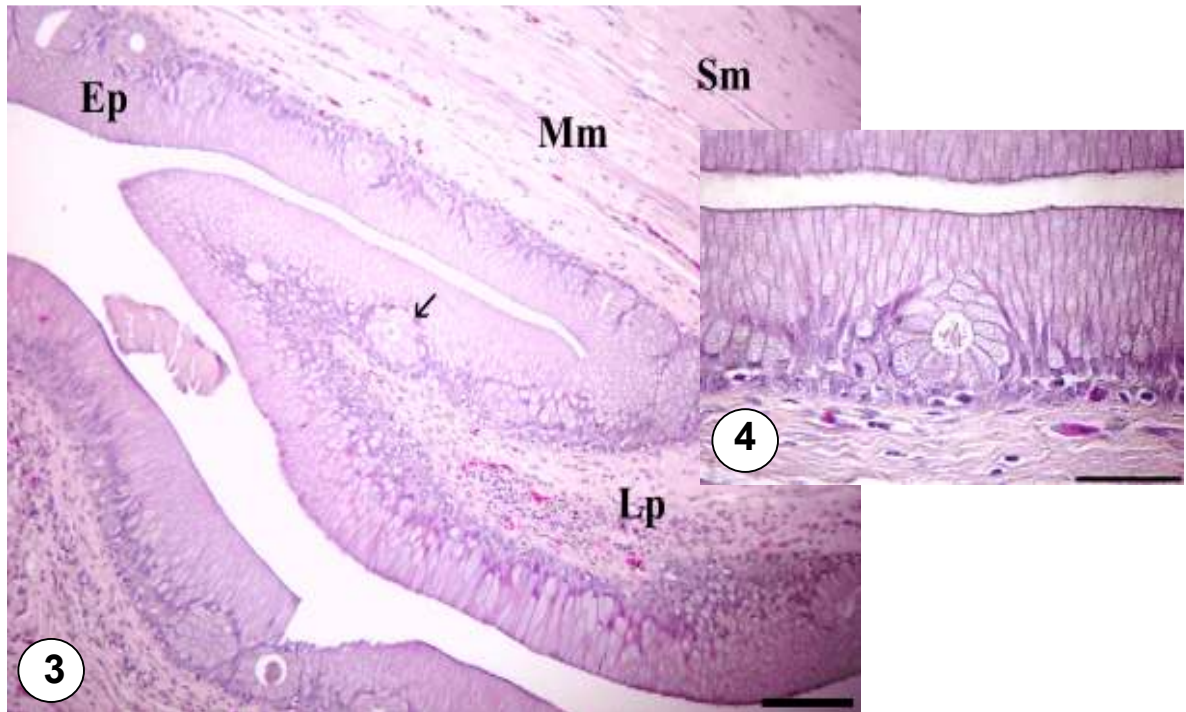
3.1 Histologia e Histoquímica

Os cortes evidenciam que a parede do esôfago dessa espécie constitui-se por: mucosa, submucosa, muscular e adventícia. É característica do esôfago de *P. geoffroanus* a presença de uma camada mucosa com pregas digitiformes longas e espessas (Figura 2). Revestindo estas pregas nota-se um epitélio simples cilíndrico alto com células secretoras de muco de núcleo basal. Entremeadas no epitélio são observadas glândulas bem definidas, formadas por

células claras em disposição semi-circular (Figuras 3 e 4). Na base do epitélio encontra-se a lâmina própria bem vascularizada.



Figura 2: Morfologia geral do tubo digestivo de *P. geoffroanus*. (A) Superfície interna da transição esôfago-estômago.



Figuras 3 e 4: Fotomicrografias do esôfago de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). (3) Mucosa pregueada formada por epitélio simples cilíndrico (Ep) com células secretoras de muco, seguida por lâmina própria (Lp) vascularizada. Presença de glândulas intraepiteliais (seta); Camada submucosa (Sm) evidenciada pela presença da camada muscular da mucosa (Mm) representada por feixes de fibras musculares em sentido circular. HE. Barra = 50 μ m. (4) Maior aumento mostrando a organização de uma glândula intraepitelial. HE. Barra = 100 μ m.

Tanto as células secretoras do epitélio quanto as células que compõem as glândulas intraepiteliais apresentam positividade aos métodos do PAS e do AB (pH 0.4 e 2.5) o que indica a presença de GAG's neutras e ácidas: altamente sulfatadas e carboxiladas, respectivamente (Figuras 4 e 5). A lâmina própria desta região é constituída por tecido conjuntivo e desprovida de glândulas. Adjacente a esta, existe uma camada denominada muscular da mucosa formada por feixes de fibras de músculo liso em sentido longitudinal. Logo abaixo, a camada submucosa é formada por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas com capilares sanguíneos e vasos linfáticos.

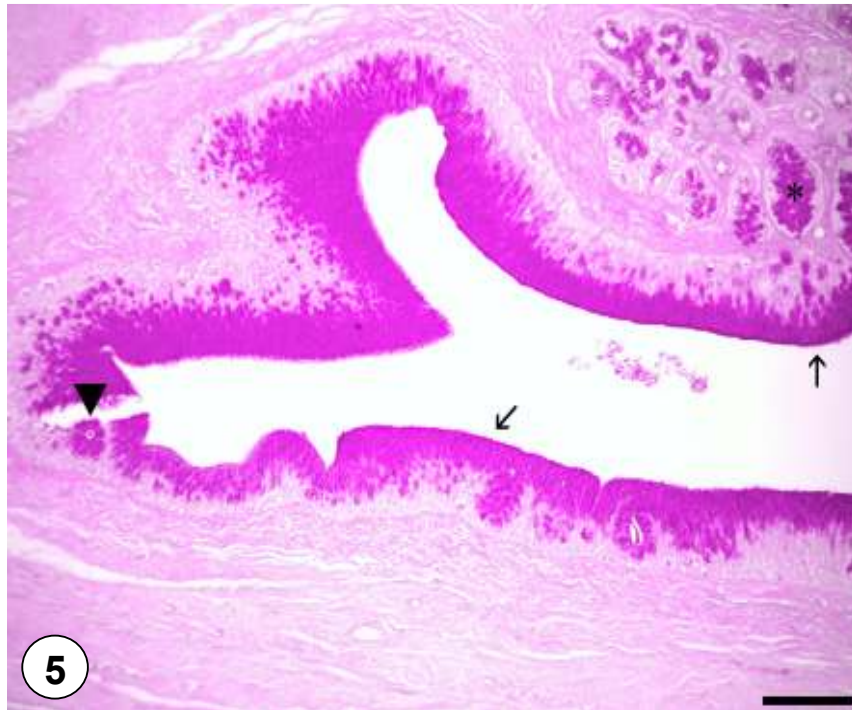


Figura 5: Fotomicrografia da transição **esôfago-estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Presença de GAG's neutras nas células que compõem o epitélio (seta), nas glândulas intraepiteliais do esôfago (cabeça de seta) e nas glândulas gástricas do estômago anterior (*). PAS. Barra = 100 μ m.

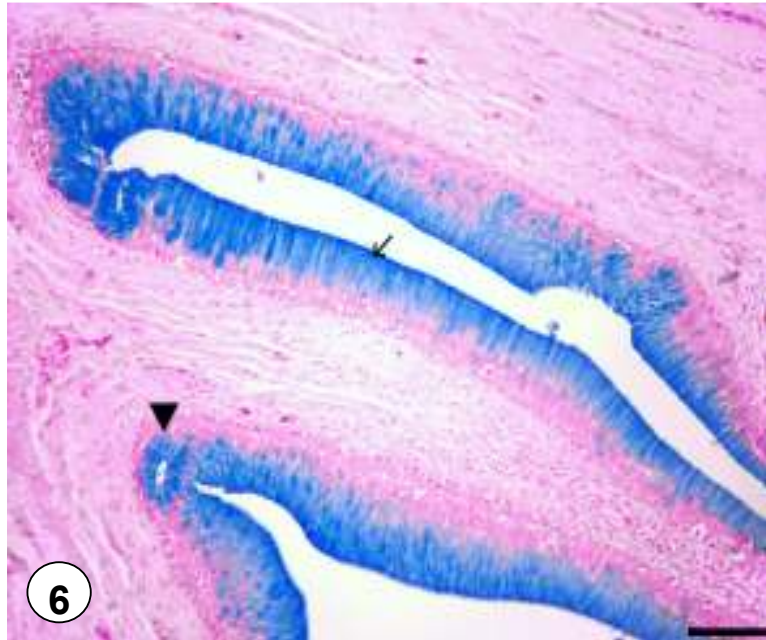


Figura 6: Fotomicrografia da transição **esôfago-estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Presença e GAG's ácidas tanto nas células que compõem o epitélio (seta) quanto nas glândulas intraepiteliais (cabeça de seta). AB. Barra = 100 µm.

A camada muscular é composta por duas subcamadas de músculo liso, que em cortes longitudinais apresenta-se como uma subcamada interna, longitudinal, e uma externa, circular (Figura 6). Externamente, o esôfago é envolvido por uma adventícia, constituída de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos.

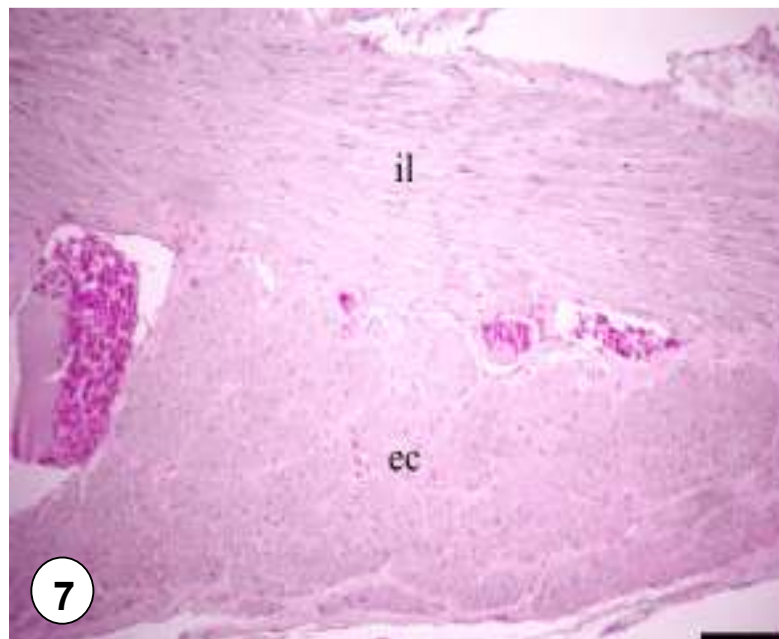


Figura 7: Fotomicrografia do **esôfago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Camada muscular composta por dois feixes de fibras organizados em sentido: interno longitudinal (il) e externo circular (ec). HE. Barra = 50 µm.

3.2 Imuno-histoquímica

3.2.1 Serotonina (5-HT)

Dos seis anticorpos testados, foi diagnosticada apenas a marcação de células imunorreativas (IR) ao anticorpo anti-5-HT no esôfago de *P. geoffroanus* (Tabela 4).

No esôfago, estas células IR encontram-se tanto na base do epitélio cilíndrico simples mucossecretor quanto nas células das glândulas intraepiteliais. Quanto à morfologia das células são classificadas de duas formas: células do tipo aberto, nas quais o ápice da célula está em contato com o lúmen do órgão e células do tipo fechado, as quais não tem comunicação com o lúmen. A frequência relativa destas células na região é considerada baixa (Figura 8).

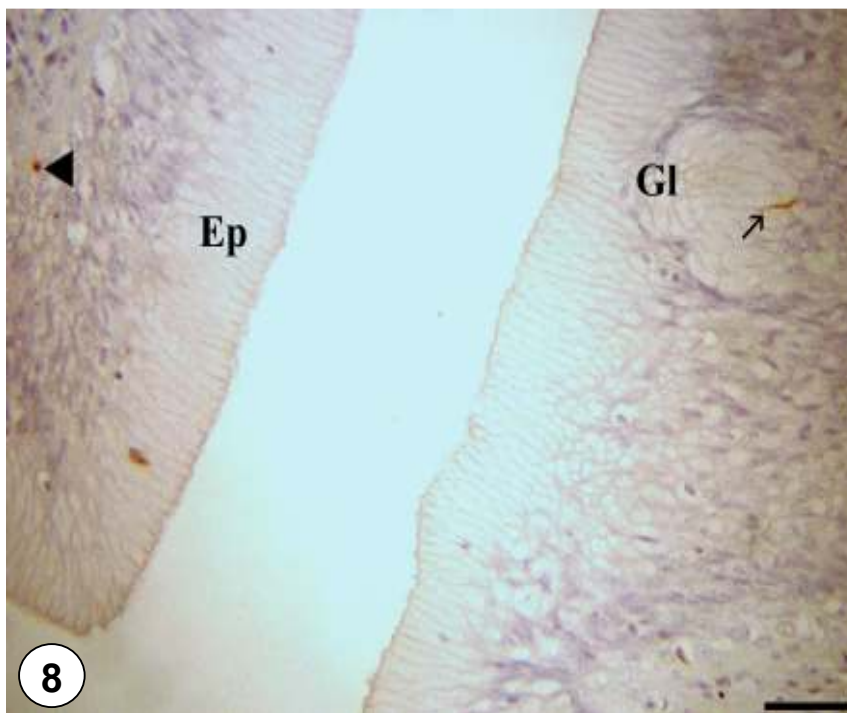


Figura 8: Fotomicrografia de células IR ao anticorpo anti-5-HT no esôfago de *P. geoffroanus*. Células IR, dos tipos aberto (seta) e fechado (cabeça de seta), compoem o epitélio esofágico (Ep) e também as glândulas intraepiteliais (GI). Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barra = 50 µm.

4 DISCUSSÃO

A parede do esôfago de *P. geoffroanus*, semelhante ao visto em outros vertebrados, é formada por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e adventícia.

A primeira camada apresenta-se bastante pregueada, com pregas dispostas longitudinalmente ao sentido do trânsito da ingesta, como também visto em anfíbios (GALLEGO-HUIDOBRO *et al.*, 2005) e répteis (JIN, *et al.*, 1985; MACHADO-SANTOS *et al.*, 2011). A presença de pregas bem desenvolvidas é importante para ampliar o diâmetro do

órgão, e torna-o mais distensível. (LEGLER, 1993; ZUG *et al.*, 2001). Além disso, as pregas possibilitam um aumento da superfície de absorção e a acomodação de grandes quantidades de alimentos (MITCHELL & DIAZ-FIGUEROA, 2005).

Segundo AHMED & COLABORADORES (2009), em quelônios, a mucosa do esôfago é formada por papilas cônicas e cornificadas e as glândulas estão ausentes, padrão que diverge do visualizado em *P. geoffroanus*, é semelhante ao observado em tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) e para espécies de quelônios da família Podocnemididae (VOGT *et al.*, 1998). Em *P. geoffroanus*, no lagarto *Tropidurus torquatus* (FIRMIANO *et al.*, 2010) e no jacaré *Caiman latirostris* (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2011) foram identificadas glândulas pluricelulares intraepiteliais, com aspecto mucoso, cuja função provavelmente é a lubrificação do órgão. Já nas tartarugas *Emys europaea* e *Chelonia virgata*, (ZAMITH, 1952) e no cágado *Kinosternon scorpioides* o esôfago apresenta-se aglandular (PEREIRA, 2005).

Estudos revelam que a transição entre esôfago e estômago é percebida, macroscopicamente, por um estrangulamento e, histologicamente, pela mudança abrupta no epitélio e pelo aparecimento de glândulas gástricas. Em *P. geoffroanus*, isto não é visualizado; tanto a mucosa do esôfago quanto a mucosa da porção inicial do estômago apresentam epitélio cilíndrico simples com células secretoras de muco, sendo possível visualizar a transição dos órgãos apenas pela presença de glândulas intraepiteliais no esôfago e a formação de fossetas gástricas onde desembocam glândulas tubulares, na porção do estômago. Nenhuma divisão macroscópica foi notada. MAGALHÃES (2010), ao estudar cinco espécies da família Podocnemididae, identificou a mudança de epitélio do esôfago para o estômago, variando de estratificado pavimentoso ou estratificado cilíndrico para estratificado cilíndrico mucossecretor. Esta semelhança entre o epitélio esofágico e o gástrico, descaracteriza a função primordial do esôfago, que é de apenas armazenar e transportar o alimento da cavidade oral para o estômago, e sugere que o esôfago, neste caso, também auxilie na digestão dos alimentos, derrubando a ideia de que a digestão inicia-se no estômago, segundo alguns estudiosos: WYNEKEN, 2001; LUZ *et al.*, 2003; MACHADO JUNIOR *et al.*, 2005.

Diferente do epitélio esofágico observado na espécie em estudo, em *Diplometopon zarudnyi* (AL-THANI E EL-SHERI, 1996) e *P. expansa* (SANTOS *et al.*, 1998) descreve-se o órgão com epitélio estratificado cilíndrico; Em quelônios da família Pelomedusidae (VOGT *et al.*, 1998) descreve-se um epitélio estratificado pavimentoso; Em *Tupinambis teguixin* (ZAMITH, 1952), *Xenodon merremii* (FERRI & MEDEIROS, 1976), *Egernia kingii* (ARENA *et al.*, 1990), *Alligator mississippiensis* (URIONA *et al.*, 2005) e *C. latirostris* (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2011), o revestimento é do tipo pseudo-estratificado cilíndrico com células caliciformes. O epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado mucossecretor foi registrado no cágado *Hydraspis sp.* (ZAMITH, 1952), na tartaruga *K. scorpioides* (PEREIRA *et al.*, 2005), nos lagartos *Lacerta hispânica* (PANIAGUA & NISTAL, 1983) e *Lacerta lepida* (MADRID *et al.*, 1989), na lagartixa *Hermidactylus mabouia* (SARTORI, 2009), e na maioria dos anfíbios (ZAMITH, 1952; GALLEGO-HUIDOBRO *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2008; SANTANA & MENIN, 1997; GEOGE & CASTRO 1998).

Segundo SANTANA & MENIN (1997), o muco sintetizado pelas células presentes no epitélio esofágico auxilia na progressão do bolo alimentar para o estômago, além de protegê-lo contra lesões mecânicas causadas pelo atrito dos alimentos. MAGALHÃES (2010) acrescenta que estas secreções podem também auxiliar na hidratação do alimento. Protocolos histoquímicos, PAS, AB pH 0.4 e AB pH2.5, revelam a produção de GAG's neutras, ácidas sulfatadas e ácidas carboxiladas, respectivamente, no esôfago do cágado-de-barbicha. A primeira, por formar um muco pouco viscoso, atua na constituição de um fluxo laminar durante a lubrificação e o tratamento de partículas, o que vai permitir que o alimento seja transferido do esôfago para o estômago. Já as GAG's ácidas por possuírem alta viscosidade são fundamentais no aprisionamento de partículas (SIBBING & URIBE, 1985). São

observadas reações positivas a estes protocolos no epitélio do esôfago de outros répteis (ELLIOTT, 2007); *A. mississippiensis* (URIONA *et al.*, 2005), *H. mabouia* (SARTORI, 2009), *Varanus niloticus* (AHMED *et al.*, 2009), *C. latirostris* (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2011); e de representantes da família Podocnemididae (VOGT *et al.*, 1998), sendo relatada positividade apenas ao PAS no esôfago de *D. zarudnyi* (AL-THANI & EL-SHERI, 1996) e de *K. scorpioides* (PEREIRA, 2005).

Glândulas esofágicas na lâmina própria e na submucosa não foram identificadas em *P. geoffroanus*, esta ausência também percebida em *Agama stellio* (AMER & ISMAIL, 1976), *Lacerta agilis*, *Natrix matrix* e *Vipera berus* (PRYZYSTALSKI, 1980), *C. crocodilus yacare* (JIN *et al.*, 1985), *Agama adramitana* (FARAG & AL-ROBAI, 1986), *L. lepida* e *Mauremys caspica* (MADRID *et al.*, 1989), *Natrix tessellata* (ABO-TAIRA *et al.*, 1988), *Coluber florulentus* (DEHLAWI & ZAHER, 1989; AFIFI *et al.*, 1990), *A. mississippiensis* (URIONA *et al.*, 2005), *C. latirostris* (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2011) e *Uromastix aegyptiaca* (ZAHER *et al.*, 2012). Já nas espécies *Chelonia imbricata* e *Testudo graeca* (MADRID *et al.*, 1989), *Testudo horsfieldii* (JEKSAJEW & KOLOSS, 1964; DILMUHAMIDOV, 1975), e *Scincus hemprichi* (FARAG & EL-ROBAI, 1986) estas glândulas foram registradas.

A muscular da mucosa, segundo ELLIOTT (2007) está ausente na porção do esôfago da maioria dos répteis sendo encontrada apenas em algumas espécies de tartarugas. A muscular da mucosa está presente no quelônio *K. scorpioides* (PEREIRA *et al.*, 2005), na lagartixa *H. mabouia* (SARTORI, 2009) e no jacaré *C. latirostris* (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2011). Na espécie em questão esta é formada por apenas uma camada de fibras musculares em sentido longitudinal, mesmo padrão visualizado em *U. aegyptiaca* (ZAHER *et al.*, 2012). Esta musculatura é inexistente ou ínfima no esôfago de alguns quelônios (ANDREW & HICKMAN, 1974; MAGALHÃES, 2010) e alguns anfíbios (SANTANA & MENIN, 1997; GEORGE & CASTRO, 1998; CASTRO *et al.*, 2008). CHAVES & VAZZOLER, 1984 e SANTOS *et al.*, 2007 admitem que a existência de tecido muscular entre a lâmina própria e a submucosa auxilia na eliminação das substâncias produzidas pelas glândulas.

A estruturação da camada muscular é apresentada como uma subcamada de fibras musculares longitudinais interna e outra circular externa, diferente do que ocorre em *C. florulentus* (DEHLAWI & ZAHER, 1989), em *K. scorpioides* (PEREIRA, 2005), em *H. mabouia* (SARTORI, 2009), em *C. latirostris* (MACHADO-SANTOS *et al.*, 2011) e em *U. aegyptiaca* (ZAHER *et al.*, 2012). Já na tartaruga *C. myda* esta camada organizou-se em apenas uma subcamada longitudinal (MAGALHÃES, 2010).

Os resultados imuno-histoquímicos comprovam a existência de células que sintetizam serotonina no esôfago de *P. geoffroanus*, não sendo encontradas células que produzem SOM e GAS na mesma porção. Identificaram-se células ditas do tipo aberta e do tipo fechada. Acredita-se que as células do tipo aberta detectem pequenas alterações do pH ou da composição do conteúdo do lúmen, enquanto que as células do tipo fechado responde à distensão ou a estimulação humoral (FUJITA & KOBAYASHI, 1977).

É papel da 5-HT estimular a contração muscular do TD e promover a secreção exócrina (CECCARELLI *et al.*, 1995), incitar os plexos mioentéricos a causar respostas vasodilatadoras na submucosa (VANNER, 2000). Esta é secretada diante de vários estímulos no lume como, acidificação, instilação de glicose hipertônica ou solução de sacarose, estimulação vagal, aumento da pressão intraluminal, obstrução mecânica do intestino e isquemia intestinal (LI *et al.*, 2000). Em *P. geoffroanus*, células IR à 5-HT são visualizadas tanto nas células do epitélio de revestimento quanto na base das glândulas intraepiteliais do esôfago. Padrão semelhante é observado no jacaré *C. latirostris* por MACHADO-SANTOS *et al.* (2011). Estas células também foram identificadas no esôfago de *Mabuya quinquetaeniata* e *Chalcides ocellatus* (EL-SALHY *et al.*, 1985), *T. graeca* (PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989), *E.*

kingii (ARENA *et al.*, 1990), *Rhabdophis tigrinus tigrinus* (LEE *et al.*, 1999), *Alligator sinensis* (WU *et al.*, 1999), *Trachemys scripta elegans* (KU *et al.*, 2001), *Takydromus wolteri* (LEE & KU, 2004) e *Ocadia sinensis* (LIU *et al.*, 2007). Estudiosos assumem que todos os vertebrados possuem células produtoras deste hormônio no TD, admitindo, então, que a localização destas células é um caráter evolutivo (EL-SALHY *et al.*, 1985).

Em conclusão, os estudos histológico, histoquímico e imuno-histoquímico do esôfago de *P. Geoffroanus* sugerem que, além de atuar no transporte do alimento até o estômago, o órgão possivelmente colabore com processos digestivos. Este estudo visa colaborar e complementar estudos sobre a fisiologia digestiva da espécie investigada, possibilitando maior compreensão dos aspectos evolutivos, além de fornecer dados histológicos com intuito de serem usados como referência à compreensão de alterações histopatológicas que possam afetar o TD desta espécie.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-TAIRA, A. M.; ZAHER, M. M.; DEHLAWI, G. Y. & MANSOUR, A. B. Anatomical, histological and morphometrical studies on the alimentary tract of the snake *Natrix tesellata* (family Colubridae). **Egyptian Journal of Histology**, v. 11, n. 2, p. 221-232, 1988.
- AFIFI, A. M.; ABDEEN, A. M.; ABO-TAIRA, A. M.; ZAHER, M. M. & BASSIOUNI, W. M. Histochemical aspects of gut mucosa in the snake *Cerastes vipera* (Viperidae). **Proceedings of the Zoological Society. A.R. Egypt**, v. 20, p. 147-163, 1990.
- AHMED, Y. A.; EL-HAFEZ, A. A. E. & ZAYED, A. E. Histological and histochemical studies on the oesophagus, stomach and small intestines of *Varanus niloticus*. **Journal of Veterinary Anatomical**, v. 2, n. 1, p. 35-48, 2009.
- AL-THANI, A. S. & EL-SHERI, G. Histological and histochemical study of the digestive tract of the worm-like reptile, *Diplometopon zarudnyi* (Squamata). **Qatar University Science Journal**, v. 16, n. 1, p. 113-117, 1996.
- AMER, F. & ISMAIL, M. H. Histological studies on the alimentary canal of the Agamid lizard *Agama stellio*. **Annales Zoologici**, v. 12, n. 1, p. 12-26, 1976.
- ANDREW, W. & HICKMAN, C. P. **Histology of the vertebrates**. A comparative text. Saint Louis: The C.V. Mosby Company, 1974. 439p.
- ARENA, P. C.; RICHARDSON, K. C. & YAMADA, J. An immunohistochemical study of endocrine cells of the alimentary tract of the King's skink (*Egernia Kingii*). **Journal of Anatomy**, v. 170, p. 73-85, 1990.
- BICCA, D. F.; QUEIROL, E. & BRACCINI, M. C. Aspectos morfológicos e histológicos do estômago de *Acestrorhynchus pantaneiro* (Menezes, 1992) (Teleostei, Acestrorhynchidae) na Bacia do Rio Uruguai médio. **Biodiversidade Pampeana** v. 4, p. 05-10, 2006.

- BRITO, F. M. M. **Aspectos anátomo-radiográficos e tempo do trânsito gastrintestinal em cágados-de-barbicha *Phrynops geoffroanus* Schweigger, 1812 (Testudines, Chelidae).** 2007. 30f. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias - Saúde animal) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.
- CASTRO, J. C.; LIMA, S. L. L.; BRAGA, G. T.; AZEVEDO, R. V.; PINTO, C. E. L. & SILVA, A. R. Anatomia-histologia do esôfago da rã toiro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 1, p. 130-139, 2008.
- CECCARELLI, P.; PEDINI, V. & GARGIULO, M. Serotonin containing cells in the horse gastrointestinal tract. **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine**, v. 24, p. 97-99, 1995.
- CHAVES, P. T. C. & SILVA, V. M. F. Aspectos histológicos do trato digestório de *Sotaua fluviatilis* (Cetacea, Delphinidae): esôfago e estômago. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 5, n. 1, p. 89-99, 1988.
- CHAVES, P. T. C. & VAZZOLER, C. Aspectos biológicos de peixes anátômicos. III. Anatomia microscópica do esôfago, estômago e cecos pilóricos de *Semaprochilodus insignis* (Characiformes: Prochilodontidae). **Acta Amazônica**, v. 14, n. 3-4, p. 343-353, 1984.
- DEHLAWI, G. Y. & ZAHER, M. M. Histological studies on the alimentary tract of the colubrid snake, *Coluber florulentus* (Family: Colubridae). **Proceedings of the Zoological Society. A. R. Egypt**, v. 1, p. 95-112, 1989.
- DEVENEY, C. W. & WAY, L. W. Regulatory peptides of gut. In: Greenspan, FS. e Forsham, PH. (Eds.). **Basic and Clinical Endocrinology**. Asian edn. Singapore: Maruzen, 1983. p. 479-499.
- DILMUHAMEDOV, M. E. **The comparative morphology of the digestive tract of some reptiles.** Dissertation, Alma-ata. 1975.
- ELLIOTT, J. R. Overview of Reptile Biology, Anatomy, and Histology. In: Elliott, J. R. **Infectious Diseases and Pathology of Reptiles**. Brooklyn, New York: Taylor & Francis Group, 2007. p. 1-25.
- EL-SALHY M.; WINDER, E. & LUNDQVIST, M. Comparative studies of serotonin-like immunoreactive cells in the digestive tract of vertebrates. **Biomedical Research**, v. 6, p. 371-375, 1985.
- FACHÍN-TERÁN, A.; VOGT, R. C. & GOMEZ, M. F. S. Food habits of an assemblage of five species of turtles in the Rio Guaporé, Rondônia, Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 29, p. 536-547, 1995.
- FARAG, A. A. & AL-ROBAI, A. A. S. Comparative histology of the alimentary tract of the lizard, *Scincus heaprichi* and *Agama adramitana*. **Sci. Educ. Res. Prog., King Abdul Aziz Univ. Madina Munawarah**, Saudi Arabia, p. 1-5, 1986.

- FERRI, S.; JUNQUEIRA, L. C.; MEDEIROS, L. F. & MEDEIROS, L. O. Gross, microscopic and ultrastructural study of the intestinal tube of *Xenodon merremii* Wagler, 1824 (Ophidia). **Journal of Anatomy**, v. 121, Pt 2, p. 291-301, 1976.
- FIRMIANO, E. M. S. **Aspectos histológicos e imuno-histoquímicos do tubo gastrintestinal do lagarto *Tropidurus torquatus* Wied 1820, (Squamata: Tropiduridae)**. 2010. 53f. Monografia (Graduação - Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.
- FUJITA, T. & KOBAYASHI, S. Structure and function of gut endocrine cells. **International Review of Cytology**. Supplement. v. 6, p. 187-233, 1977.
- GALLEGO-HUIDOBRO, J.; PASTOR, L. M. & CALVO, A. Histology of the esophagus of the adult frog *Rana perezii* (Anura: Ranidae). **Journal of Morphology**. v. 212, n. 3, p. 191-200, 2005.
- GEORGE, L. L. & CASTRO, R. R. L. **Histologia Comparada**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1998. 286p.
- HELENO, A. R.; SANTOS, L. M.; MIGLINO, M. A.; PERES, J. A. & GUERRA, R. R. Biometria, histologia e morfometria do sistema digestório do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre. **Biotemas**, v. 24, n. 4, p. 111-119, 2011.
- JEKSAJEWA, V. A. & KOLOSS, E. I. Histological observations on the epithelial lining of the oesophagus in vertebrate animals. **Izvestiya Akademii Nauk SSSR. Serija Biologiceskaja**, p. 388-395, 1964.
- JIN, S. M.; RODRIGUES, C. A. T.; SILVA, M. P. & SANTOS, F. R. Observações morfológicas do esôfago do *Caiman crocodilus yacare* crocodilia-reptilia (Daudin, 1802). **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**, v. 2, n. 1, p. 49-58, 1985.
- KOCA, Y. B. & GÜRCÜ, B. Morphological and Histochemical Investigations of Esophagogastric Tract of a Lizard, *Laudakia stellio* (Agamidae, LINNAEUS 1758). **Acta Biologica Hungarica**, v. 62, n. 4, p. 376-387, 2011. DOI: 10.1556/ABiol.62.2011.4.4
- KU, S. K.; LEE, H. S.; LEE, J. H. & PARK, K. D. An immunohistochemical study on the endocrine cells in the alimentary tract of the reared slider (*Trachemys scripta elegans*). **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine**, v. 30, p. 33-39, 2001.
- LEE, H. S. & KU, S. K. An immunohistochemical study of endocrine cells in the alimentary tract of the grass lizard, *Takydromus wolteri* Fischer (Laceridae). **Acta Histochemica**, v. 106, p. 171-178, 2004.
- LEE, S. K.; KU, H. S. & LEE, A.M. An immunohistochemical study of endocrine cells in the alimentary tract of the snake, *Rhabdophis tigrinus tigrinus*. **Korean Journal of Veterinary Research**, v. 35, p. 67-73, 1999.

- LEGLER, J. M. Morphology and physiology of the Chelonia. In: Glasby, C. J.; Ross, G. J. B. e Beesley, P. L. ed. **Fauna of Australia**. Caberra, 1993. p. 108-119.
- LI, Y.; HAO, Y.; ZHU J. & OWYANG, C. Serotonin released from intestinal enterochromaffin cells mediates luminal non-cholecystokinin-stimulated pancreatic secretion in rats. **Gastroenterology**, v. 118, p. 1197-1207, 2000.
- LIU, C.; ZHEN, L.; LI, S. & ZHAO, W. Distribution and Morphological Observation of 5-HT Immunoreactive Endocrine Cells in Digestive Tract of *Ocadia sinensis*. **Sichuan Journal of Zoology**, 2007-02.
- LUZ, V. L. F.; STRINGHINI, J. H.; BATAUS, Y. S. L.; PAULA, W. A.; NOVAIS, M. N. & REIS, I. J. Morfometria do trato digestório da tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) criada em sistema comercial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 10-18, 2003.
- MACHADO JÚNIOR, A. A. N.; SOUSA, A. L.; CARVALHO, M. A. M.; SANTOS, F. C. F. & ALVES, F. R. Anatomia do fígado e vias bilíferas do muçã (*Kinosternon scorpioides*). **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 125-133, 2005.
- MACHADO-SANTOS, C.; ZECA, S. G.; ABIDU-FIGUEIREDO, M.; RIBEIRO, I. C. A. & SALES, A. The esophagus of the crocodilian *Caiman latirostris* (Reptilia, Crocodylia): histological, histochemical and immunohistochemical study. **Journal of Morphological Science**, v. 28, p. 113-119, 2011.
- MADRID J. F.; BALLESTA, J.; PASTOR, L. M.; PEREZ-TOMAS, R. & HERNANDEZ, F. Distribution of mucins in the mucosa of the digestive tract of reptiles: a histochemical study. **Acta Histochemica**, v. 85, p. 117-129, 1989.
- MAGALHÃES, M. S. **Morfologia do tubo digestório aplicada à compreensão da dieta em quelônios da família Podocnemididae**. 2010. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia de água doce e pesca interior) - INPA, Manaus, AM, 2010.
- MITCHELL, M. A. & DIAZ-FIGUEROA, O. Clinical Reptile Gastroenterology, Philadelphia, **Gastroenterology**, v.8, n.2, p. 277-298, 2005.
- MONTEIRO, C. M. R.; SOUZA, N. T. M.; CARVALHO, R. G. & SOUZA, W. M. Análise histológica do trato gastrintestinal de avestruzes jovens (*Struthio camelus* Linnaeus, 1758). **Biotemas**, v. 22, n. 3, p.149-155, 2009.
- MOURA, L. R. **Aspectos morfológicos do fígado de tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) e *Phrynops geoffroanus* (Schwiegger, 1812) (Testudines, Chelidae)**. 2009. 59f. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil, 2009.
- PANIAGUA, R. & NISTAL, M. **Introducción a la histologia animal comparada**. Barcelona: Editora Labor, 1983. 438 p.

- PEREIRA, J.G.; FONSECA, C.C.; MENIN, E. & NEVES, M.T.D. Estudo histológico e histoquímico do esôfago do muçã *Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766 Reptilia, Chelonia, Kinosternidae). **Arquivos de Ciências Veterinária e Zoologia UNIPAR**, v. 8, n. 1, p. 3-10, 2005.
- PEREIRA, M. P.; SILVEIRA, A. F. & SILVEIRA, S. O. Aspectos Microscópicos do Esôfago do Bugio Ruivo (*Alouatta fusca clamitans*). **Arquivos de Ciências Veterinária e Zoologia UNIPAR**, v. 5, n. 1, p. 45-52, 2002.
- PÉREZ-TOMÁS, R.; BALLESTA, J.; PASTOR, L. M.; MADRID, J. F. & POLARK, J. M. Comparative immunohistochemical study of the gastroenteropancreatic endocrine system of three reptiles. **General and Comparative Endocrinology**, v. 76, p. 171-191, 1989.
- POUGH, F. H. & HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 798p.
- PRZYSTALSKI, A. The dimension of the mucosa and the structure of the alimentary canal in some reptiles. **Acta Biologica racoviensia, Serie Zool.**, v. 13, 1980.
- SANTANA, M. A. & MENIN, E. Histologias do esôfago de *Leptodactylus labyrinthicus* Spix, 1824 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Revista Ceres**, v. 44, n. 251, p.111-123, 1997.
- SANTOS, A. L. Q.; BELETTI, M. E. & QUEIROZ, R. P. **Estudo morfológico do tubo digestório da tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa***. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 1998, 15p. Relatório.
- SANTOS, C. M.; DUARTE, S.; SOUZA, T. G. L.; RIBEIRO, T. P.; SALES, A. & ARAÚJO, F. G. Histologia e caracterização histoquímica do tubo gastrintestinal de *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) no reservatório de Funil, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Série. Zoológica**, v. 97, p. 411-417, 2007.
- SARTORI, S. S. R. **Morfologia do tubo digestivo da lagartixa *Hemidactylus mabouia* Moreau de Jonnés, 1818 (Squamata:Gekkonidae)**. 2009. 98f. Tese (Doutorado em Biologia celular e estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil, 2009.
- SIBBING, F. A. & URIBE, R. Regional specialisation in the oro-pharyngeal wall and food processing in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Netherlands Journal of Zoology**, v. 35, p. 377-422, 1985.
- SILVA, N. B. Histologia do sistema digestório de sagüiru, *Steindachnerina notonota* (Miranda Ribeiro 1937) (Pisces, Curimatidae), do rio Ceará-Mirim, Rio Grande do Norte, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2005.
- URIONA, T. J.; FARMER, C. G.; DAZELY, J.; CLAYTON, F. & MOORE, J. Structure and function of the esophagus of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Journal of Experimental Biology**, v. 208, Pt. 16, p. 3047-53, 2005.

- VANNER, S. Myenteric neurons activate submucosal vasodilator neurons in guinea pig ileum. **American Physiological Society - Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 279, p. 380-387, 2000.
- VOGT, R. C.; SEVER, D. M. & MOREIRA, G. Esophageal papillae in Pelomedusid turtles. **Journal of Herpetology**, v. 32, n. 2, p. 279-282, 1998.
- WU, X. B.; ZHANG, S. Z.; CHEN, B. H.; DENG, Z. P.; ZHOU, Z. X.; WANG, C. L.; NIE, J. S. & XIE, W. S. Immunohistochemical studies on endocrine cells in the digestive tract of *Alligator sinensis*. **Dongwu Xuebao**, v. 45, p. 155-161, 1999.
- WYNEKEN, J. **The anatomy of sea turtle**. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470, US Department of Commerce, 2001.172p.
- ZAHER, M.; EL-GHAREEB, A. W.; HAMDY, H.; ESSA, A. & LAHSIK, S. Anatomical, Histological and Histochemical Adaptations of the Reptilian Alimentary Canal to Their Food Habits: I. *Uromastix aegyptiaca*. **Life Science Journal**, v. 9, n. 3, p.84-104, 2012.
- ZAMITH, A. P. L. Contribuição para o conhecimento da estrutura da mucosa do esôfago dos vertebrados. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 9, n. 179, p. 359-434, 1952.
- ZUG, G. R.; VITT, L. J. & CALDWELL, J. P. **Herpetology: An introduction biology of amphibians and reptiles**, 2 ed. Florida: Academic Press. 2001.

CAPÍTULO II

Estômago de *Phrynops geoffroanus*: Caracterização histológica e histoquímica e detecção por imuno-histoquímica de células do Sistema Neuroendócrino Difuso

RESUMO II

VIEIRA-LOPES, Danielle Alcantara. **Estômago de *Phrynops geoffroanus*: Caracterização histológica e histoquímica e detecção por imuno-histoquímica de células do Sistema Neuroendócrino Difuso**. 2013. 124p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Associado ao sistema digestório dos vertebrados existem células do Sistema Neuroendócrino Difuso que controlam a motilidade e a velocidade da ingesta, e as secreções do tubo digestivo, garantindo a ação das enzimas no momento exato. O intuito deste estudo é analisar a morfologia e a produção de peptídeos no estômago de *Phrynops geoffroanus* usando métodos histológicos, histoquímicos e imuno-histoquímicos. O estômago é dividido em anterior, médio e posterior e é formado por mucosa, submucosa, muscular e serosa. A camada mucosa é revestida pelo epitélio cilíndrico simples mucossecretor que desemboca em glândulas gástricas por meio de fossetas, que se tornam mais profundas da região anterior para a posterior. As glândulas gástricas são mais numerosas na porção média do estômago. Positividade ao PAS e AB (pH 0.4 e pH 2.5) é observada nas três regiões do órgão. A lamina própria e a submucosa são formadas por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos, e separadas pela muscular da mucosa. A camada muscular, nas regiões anterior e média, é composta por fibras musculares lisas em sentido circular interno e longitudinal externo, sendo que a região posterior apresenta apenas uma camada muscular em sentido circular. Externamente encontra-se a serosa. São encontradas células imunorreativas aos anti-soros anti-serotonina, anti-somatostatina e anti-insulina entre as células epiteliais e na base das glândulas gástricas. Nenhuma reação a gastrina, glucagon e polipeptídeo pancreático é observada. A finalidade deste estudo é agregar dados sobre a fisiologia digestiva dos répteis, possibilitando uma futura comparação com outras espécies para maior compreensão dos aspectos evolutivos.

Palavras chaves: *Réptil, histoquímica, mucinas e células endócrinas*

ABSTRACT II

The stomach of *Phrynops geoffroanus*: Histological and histochemical characterization and immunohistochemical detection of diffuse neuroendocrine system cells. 2013. 124p. Dissertation (Master in Animal Biology). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The digestive system of vertebrates contains cells of the diffuse neuroendocrine system. These cells control the motility and velocity of the ingesta and the secretions of the digestive tube, to assure the action of enzymes at the right moment. This article describes the morphology and production of peptides in the stomach of *Phrynops geoffroanus* based on histological, histochemical and immunohistochemical techniques. The stomach is divided into anterior, middle and posterior regions and is formed by the mucosa, submucosa, muscular and serosa layers. The mucosa is lined with a simple cylindrical epithelium with mucus-secreting cells and empties into gastric glands by means of fossettes, which become deeper from the anterior to the posterior region. The gastric glands are more numerous in the middle part of the stomach. Positivity to PAS and AB (pH 0.4 and pH 2.5) is observed in all three of the organ's regions. The lamina propria and submucosa are formed by connective tissue and blood vessels and separated by the muscular layer of the mucosa. This muscular layer, in the anterior and middle regions, is formed by smooth muscle fibers arranged circularly in the internal part and longitudinally in the external part, while the posterior region only contains a circular muscular layer. The serosa is found externally. Immunoreactive cells to anti-serotonin, anti-somatostatin and anti-insulin are found among the epithelial cells and at the base of the gastric glands, but no reaction to gastrin, glucagon and pancreatic polypeptide can be observed. This study provides additional information on the digestive physiology of reptiles, enabling comparison with other species to better understand evolutionary aspects of species.

Keywords: *Reptiles, histochemistry, mucins, endocrine cells.*

1 INTRODUÇÃO

O sistema digestório atua no processamento dos alimentos permitindo que nutrientes sejam assimilados e incorporados ao organismo dos animais. Mas a maneira com que cada ser vivo desenvolve este procedimento difere devido a fatores como a diversidade dos regimes alimentares e o modo de vida. Estes fatores moldam características morfológicas e fisiológicas dos órgãos digestores de maneira a potencializar este processo.

Os cágados representantes da família Chelidae apresentam uma variedade de hábitos alimentares, existindo desde espécies carnívoras a espécies herbívoras, mas a maioria possui hábito onívoro (LUZ *et al.*, 2003). Um integrante de hábito alimentar onívoro é *Phrynops geoffroanus*, o qual consome desde sementes e frutos a peixes e insetos (FACHÍN-TERÁN *et al.*, 1995). O “Cágado de Barbicha”, nome vulgar dado à espécie, é um animal de pequeno porte, com hábito diurno, expondo-se sobre troncos, pedras ou ao longo das margens dos rios nas horas do dia com picos elevados de temperaturas (MEDEM 1960; MONTEIRO & DIEFENBACH 1987; MOLINA 1991; SOUZA & ABE 1999). É encontrado desde a Colômbia, Venezuela, Guiana, extremo sul do Paraguai até sudeste, centro-oeste e nordeste do Brasil (ERNEST & BARBOUR, 1989). Apesar da extensa distribuição geográfica, são escassas as informações a respeito desta espécie.

As variadas formas adotadas pelo estômago ou as diferentes dimensões dos intestinos são algumas das características anatomo-fisiológicas do TD que permitem diagnosticar o regime alimentar de uma espécie (GODINHO, 1970). Estas informações, associadas à composição alimentar, segundo RODRIGUES *et al.*, (2004), são fundamentais na formulação de produtos que possam suprir as necessidades alimentares de quelônios em cativeiro.

Anatomicamente, BRITO (2007) caracterizou como curto e simples o Tubo Digestivo (TD) de *P. geoffroanus*. Acrescentou que o estômago faz uma curva acentuada para a direita e a transição com o duodeno é notada apenas pelo estreitamento da parede do órgão. Mas nada ao que se refere à anatomia microscópica, à histoquímica e à imuno-histoquímica do TD do animal foi descrito, informações estas importantes para se esclarecer a relação fisiológica do TD com o hábito alimentar (FUGI & HAHN, 1991), de modo a facilitar o manejo da espécie, as atividades de repovoamento, melhorando assim o condicionamento dos ecossistemas (CASTRO *et al.*, 2003).

A integração dos fenômenos motores, secretores e absorptivos do TD é fundamental na redução do alimento ingerido a partículas mais simples viáveis a absorção (SWENSON & REECE, 1996). Essa associação é alcançada por ações e interações dos sistemas nervoso e endócrino, que no sistema digestório estão representados pelas células endócrinas. O então denominado Sistema Neuroendócrino Difuso (SND) atua no controle da motilidade e da velocidade do trânsito da ingesta; nas várias secreções do TD, de modo a garantir a ativação e ação das enzimas no momento exato. Deste modo, os produtos da digestão podem ser absorvidos pelo organismo e chegar às circulações sanguínea e linfática (RODRIGUES *et al.*, 2005).

A intenção deste trabalho é retratar a histologia, a histoquímica e a imuno-histoquímica do estômago de *P. geoffroanus*, detectando a produção hormonal de serotonina (5-HT), gastrina (GAS), somatostatina (SOM), glucagon (GLUC), insulina (INS) e polipeptídeo pancreático (PP) por células endócrinas ao longo do estômago, averiguando a ocorrência, a distribuição e a frequência destas células em cada porção de maneira a colaborar com estudos futuros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Processamento dos Tecidos

No Laboratório estômago dos quatro espécimes de *P. geoffroanus* foi clivado em fragmentos seriados transversais e longitudinais (Figura 44). Posteriormente, estes foram processados por técnica histológica de rotina: desidratação (em uma série de concentrações crescentes de etanol de 70° GL a 100° GL), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em Histosec (Merck, Darmstadt, Germany) para obtenção de cortes histológicos de 5 µm espessura em micrótomo. As lâminas com os fragmentos foram coradas pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE), para análise da arquitetura tecidual e Tricrômico de Gomori (TG), para visualização diferencial do tecido conjuntivo e de fibras colágenas. Para identificação de células mucossecretoras foi realizado o estudo histoquímico através dos métodos Ácido periódico de Schiff (PAS - Mc Manus, 1948 / glicoproteínas com diol vicinal oxidável e/ou glicogênio) e do Alcian Blue (AB - Lev e Spicer, 1964) com pH 0.4 (glicoproteínas altamente sulfatadas) e com pH 2.5 (glicoproteínas com grupos carboxila - ácido siálico e ácido urônico - e/ou com ésteres sulfatados) para evidênciação de glicosaminoglicanas (GAG's) neutras e ácidas, respectivamente.

2.2 Imuno-histoquímica

Para o estudo imuno-histoquímico, foram separados cortes histológicos do estômago e colocados em lâminas previamente tratadas com poly-L-lysina (Sigma Aldrich, Inc). Posteriormente estes foram desparafinados e hidratados segundo protocolo de rotina. Em seguida foi feita a recuperação antigênica dos tecidos por meio de incubação em tampão citrato (pH 6,0 - 0,01M) e aquecimento no forno microondas por 15 minutos. Com o intuito de bloquear a enzima peroxidase endógena as secções foram incubadas em uma solução de H₂O₂ a 3% em metanol por um período de 15 minutos. Feito o bloqueio às mesmas foram colocadas em câmara úmida à temperatura ambiente e tratadas com soro não imune por 30 minutos. Em seguida as secções foram incubadas por 1 hora com anticorpos primários anti-hormônios gastrintestinais (Tabela 2). Depois foram tratadas com anticorpo biotilado "universal" secundário diluído a 1:200 durante 30 minutos, logo após com avidina-biotina-peroxidase complexo (ABC), diluído a 1:200, durante 30 min (ambos da PK 6200, Vector Laboratories, Inc., EUA). Subsequentemente, a revelação foi feita por reacção com DAB/Plus (K 047, Diagnostic Biosystems, Inc., EUA), preparado de acordo com as instruções do kit. As diluições foram feitas com um diluente específico (Antibody Diluent - Spring Bioscience ADS-125) e para as lavagens entre fases utilizou-se tampão PBS (pH 7,4). Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris e após desidratação em álcool e diafanização em xilol, as lâminas foram montadas com lamínula e Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Para garantir a especificidade das reacções, controles positivos e negativos foram utilizados. Por substituição do anticorpo primário por soro não imune os controles negativos foram definidos. Para os controles positivos foram utilizados cortes dos tipos de tecidos indicados no datasheet de cada anticorpo (Anexo B).

3 RESULTADOS

3.1 Histologia e Histoquímica

O estômago da espécie apresenta túnicas semelhantes às encontradas para este órgão em outros vertebrados, ou seja, camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa. Em *P. geoffroanus*, a região do estômago foi dividida em três regiões, segundo suas peculiaridades: anterior, médio e posterior (Figura 45). Isto porque o estômago da espécie estudada apresenta forma tubular, sem nenhum divertículo ou fundo cego, o qual faz apenas uma curva acentuada para a direita.

Na luz do estômago de *P. geoffroanus* existem pregas longitudinais que variam quanto à forma de uma região para a outra. Inicialmente pregas digitiformes altas e delgadas compõem as regiões anterior e média, na última fração do órgão estes dobramentos tornam-se baixos, espaçados e com lâmina própria mais abundante (Figura 9).

O epitélio de revestimento da camada mucosa ao longo do estômago é simples, constituído por células cilíndricas mucossecretoras, com núcleos basais (Figuras 10, 11, 12 e 13), as quais demonstram reatividade ao PAS e ao AB (pH 0.4 e pH 2.5), demonstrando a presença de GAG's neutras (Figuras 14, 15 e 16), ácidas sulfatadas e ácidas carboxiladas (Figuras 17, 18 e 19) respectivamente. Este epitélio dobra-se formando fossetas que são nitidamente menores na região anterior e média quando comparada com a região posterior (Figuras 10, 11, 12 e 13). Estas fossetas desembocam em glândulas gástricas nos três segmentos do estômago.

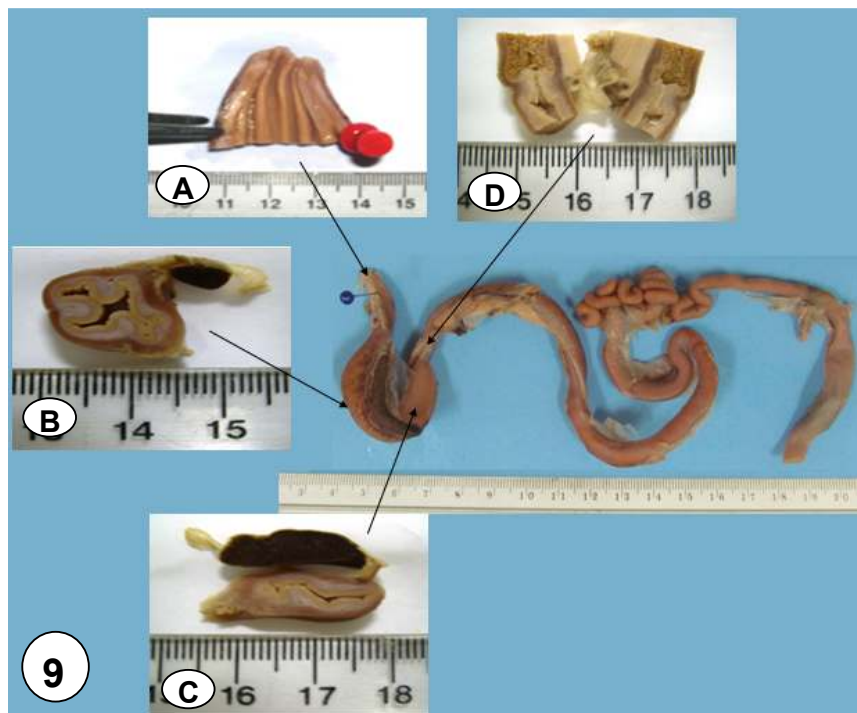
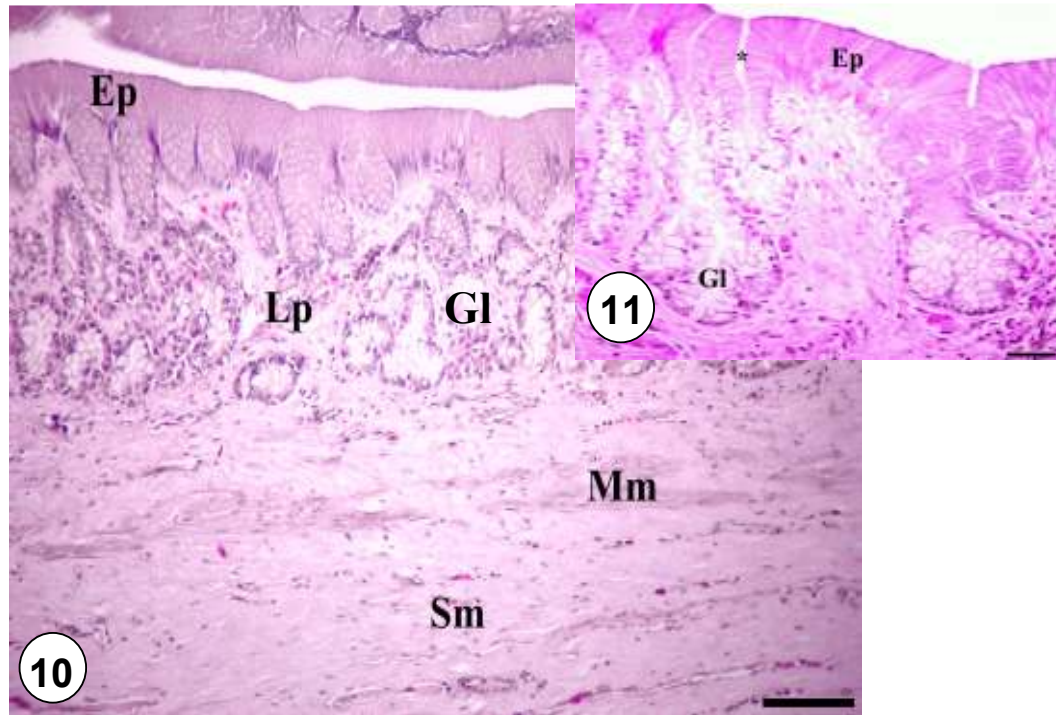
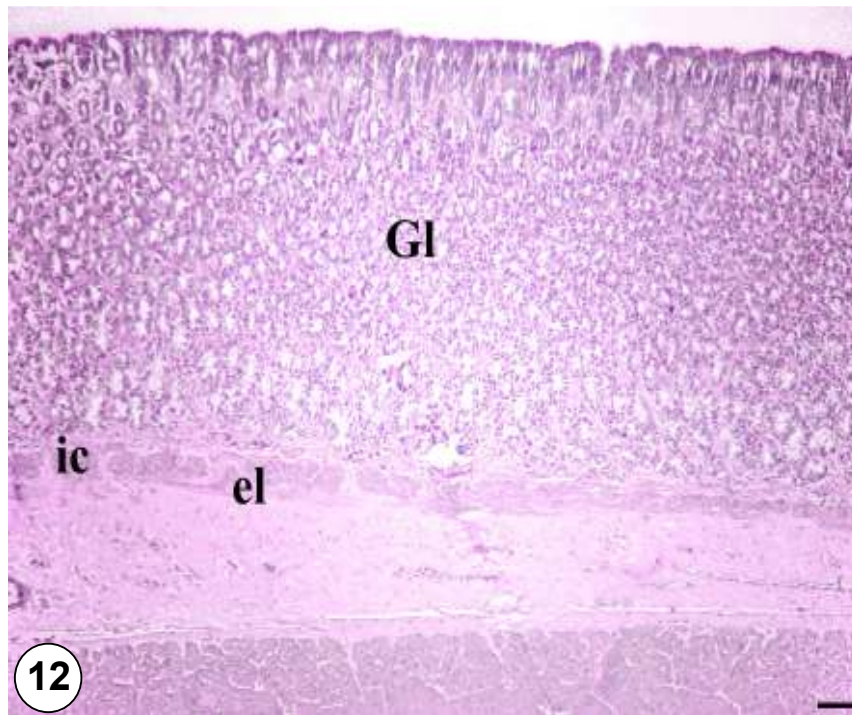


Figura 9: Morfologia geral do tubo digestivo de *P. geoffroanus*. Superfície interna: (A) Esôfago e Estômago anterior (B) Estômago Médio (C) Estômago posterior (D) Transição Estômago-Intestino.



Figuras 10 e 11: Fotomicrografias da região anterior do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). **(10)** Visão geral mostrando camada mucosa formada por epitélio gástrico (Ep), lâmina própria (Lp) com glândulas gástricas (Gl) e submucosa (Sm) evidenciada pela presença da camada muscular da mucosa (Mm) em sentido longitudinal. HE. Barra = 100 μm . **(11)** Ampliação da camada mucosa evidenciando epitélio simples cilíndrico mucossecretor (Ep) formando fossetas gástricas (*), que desembocam em glândulas gástricas (Gl) de formato tubular. HE. Barra = 50 μm .



Figuras 12 e 13: Fotomicrografias do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal) **(12)** Região média - Maior densidade de glândulas gástricas (GI) na lâmina própria tornando ínfima a porção de tecido conjuntivo. Camada muscular da mucosa (Mm) representada por feixe de fibras musculares em sentidos interno circular (ic) e externo longitudinal (el). **(13)** Região posterior (corte transversal) - Epitélio formando fossetas gástricas profundas (*) desembocando em glândulas gástricas (GI). Camada muscular da mucosa presente. HE. Barra = 100 µm.

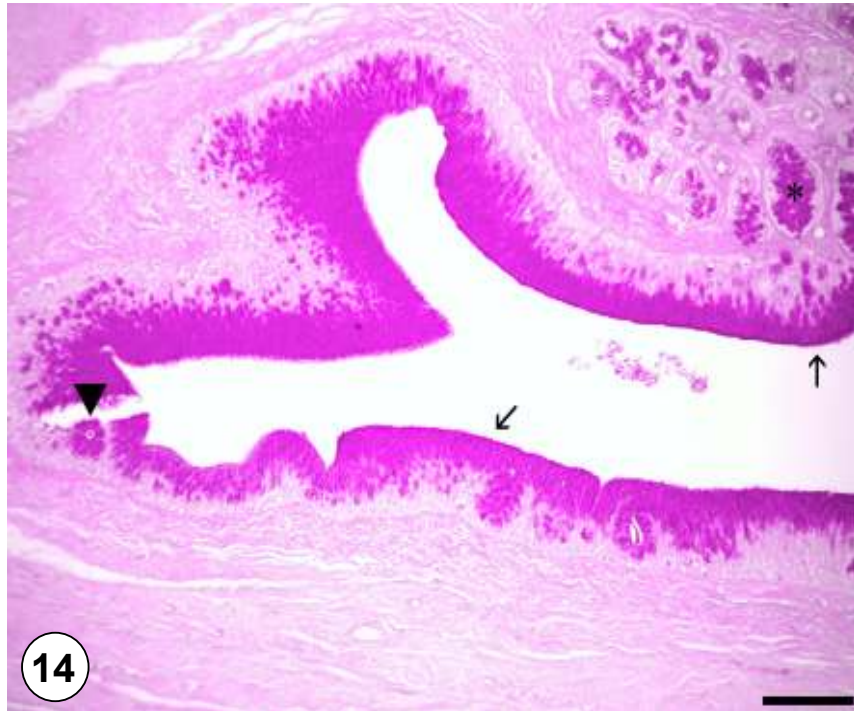


Figura 14: Fotomicrografia da transição **esôfago-estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Presença de GAG's neutras nas células que compõem o epitélio (seta), nas glândulas intraepiteliais do esôfago (cabeça de seta) e nas glândulas gástricas do estômago anterior (*). PAS. Barra = 100 μ m.

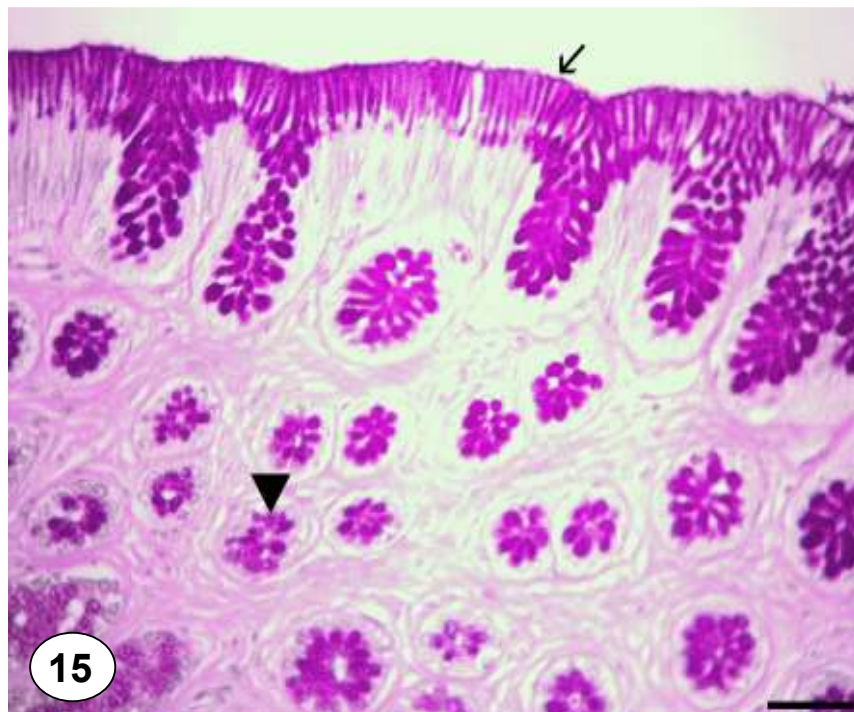


Figura 15: Fotomicrografia do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Região média - GAG's neutras no epitélio (seta) e nas glândulas gástricas (cabeça de seta). PAS. Barra = 100 μ m.

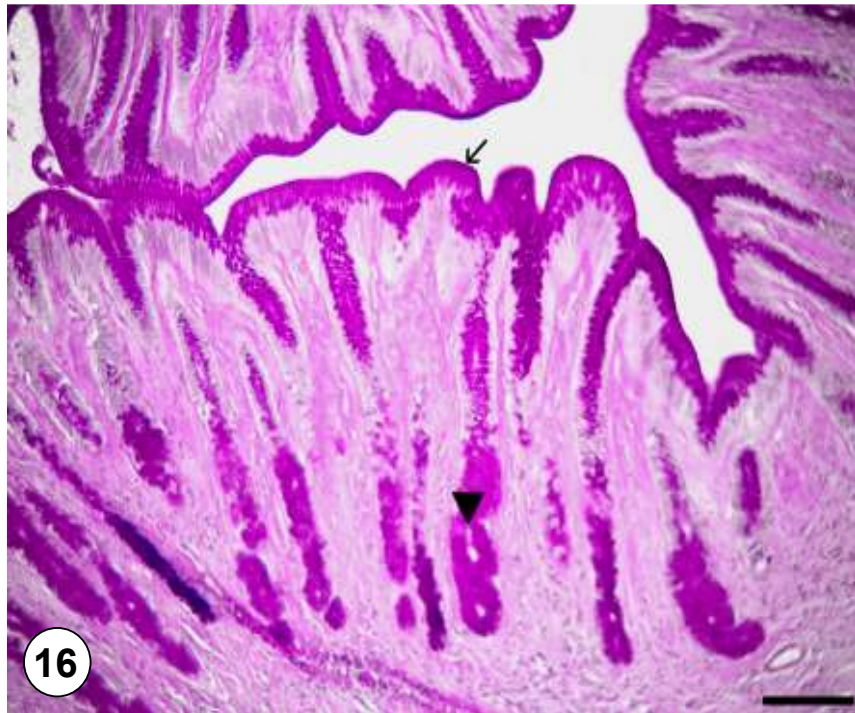


Figura 16: Fotomicrografia do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Região posterior - Coloração rósea marcando a presença de GAG's neutras no epitélio (seta) e nas glândulas gástricas (cabeça de seta). PAS. Barra = 100 μ m.

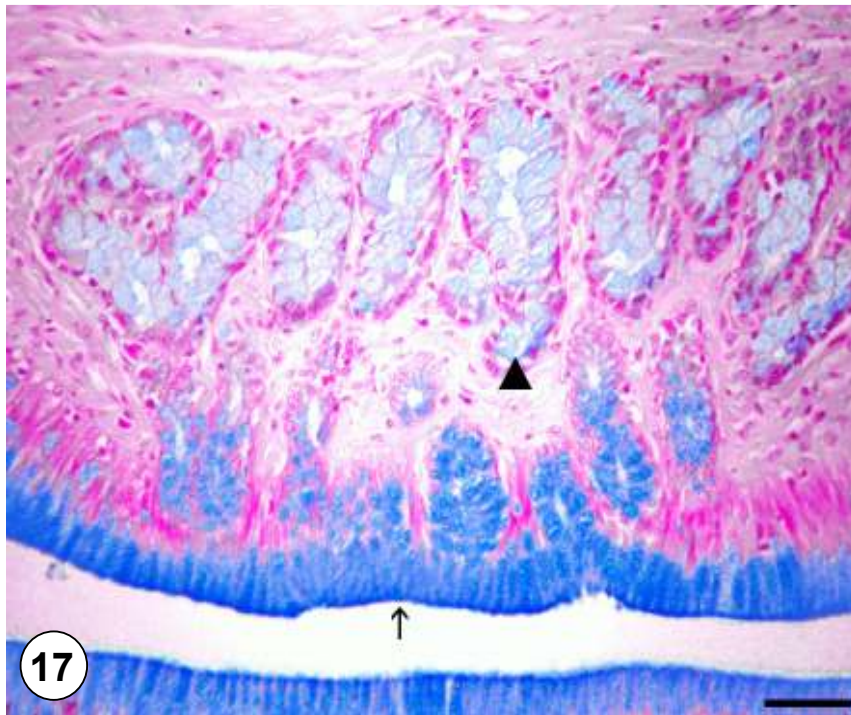


Figura 17: Fotomicrografia do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Região anterior - Presença de GAG's ácidas na mucosa (seta). Glândulas gástricas apresentando positividade alta (cabeça de seta). AB. Barra = 50 μ m.

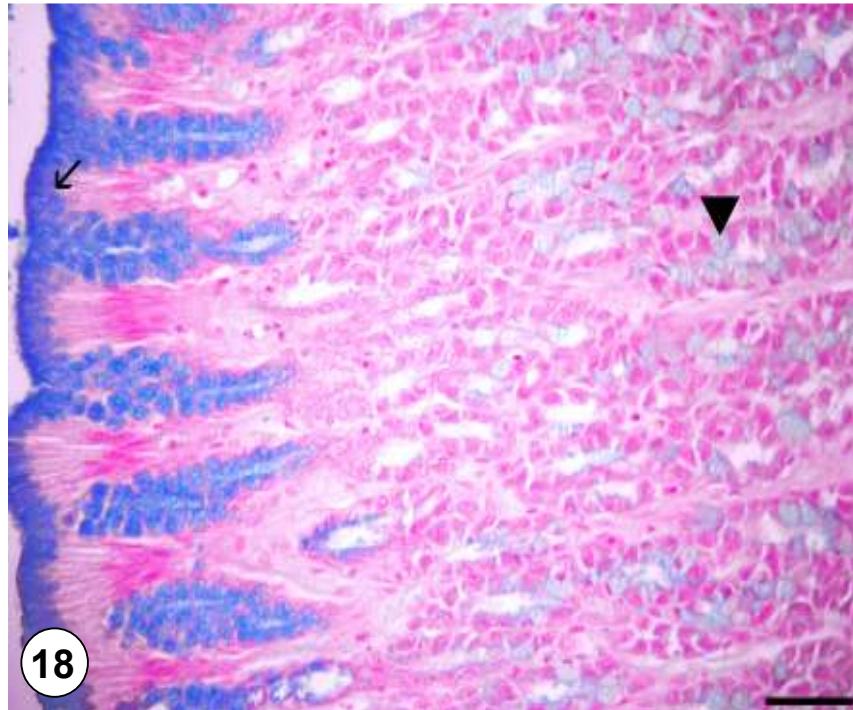


Figura 18: Fotomicrografia do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Região média - GAG's ácidas no epitélio gástrico (seta). Glândulas gástricas com positividade moderada (cabeça de seta). AB. Barra = 50 μ m.

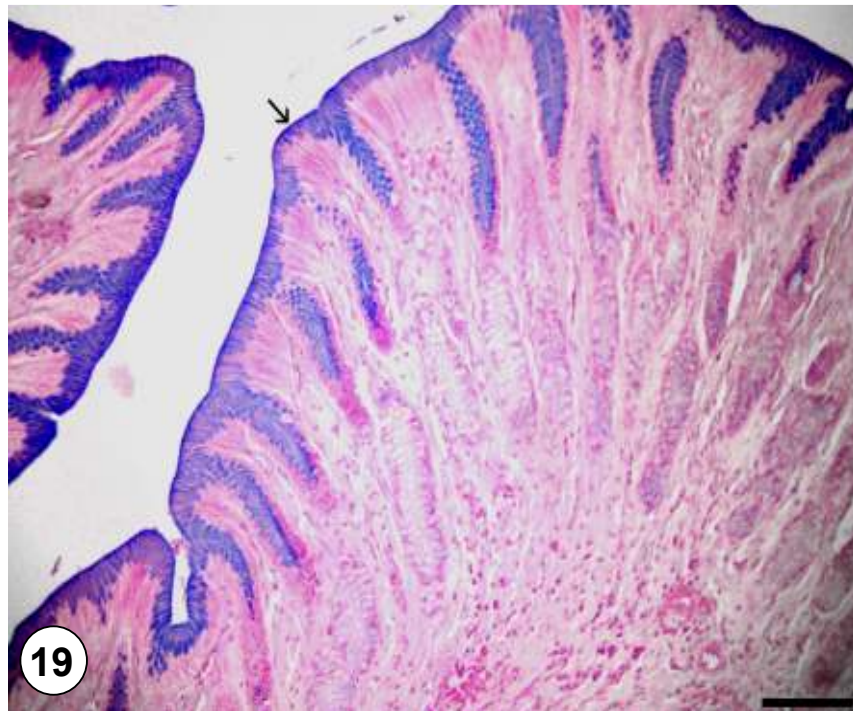


Figura 19: Fotomicrografia do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Região posterior Coloração azulada marcando a presença de GAG's ácidas (seta). Glândulas gástricas com positividade baixa. AB. Barra = 50 μ m.

Outra característica que demarca a divisão do estômago é a abundância das glândulas gástricas presentes na lâmina própria, região esta formada por tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos. Na região anterior, a densidade glandular é baixa (Figura 10), tornando-se mais abundante à medida que se afasta do esôfago. Na porção média o número de glândulas gástricas é alto tornando ínfima a porção de tecido conjuntivo presente na lâmina própria (Figura 12). A fração posterior do órgão é marcada por uma diminuição no número destas glândulas (Figura 13).

As glândulas gástricas são tubulares, ramificadas, e formadas principalmente de células escuras oxintopépticas e células claras mucosas (Figura 11). As oxintopépticas tem formato poliédrico, são acidófilas devido à presença de grânulos de zimogênio (precursores enzimáticos), com núcleo de forma irregular. Estas células desempenham papel semelhante às células principais e parietais em mamíferos, síntese de ácido clorídrico (HCl) e pepsinogênio. Não apresentam reação ao PAS e AB. As células claras são coradas palidamente pelo HE e reativas as colorações histoquímicas de PAS e AB, isto porque seu citoplasma é rico em muco. Possuem núcleos achatados e situados no polo basal da célula. A coloração das glândulas a técnica do PAS é semelhante nas três porções do órgão (Figuras 14, 15 e 16), havendo variações na reatividade ao AB de uma fração para outra, sendo decrescente a produção de GAG's ácidas da porção anterior para a posterior (Figura 17, 18 e 19).

Separando a camada mucosa da submucosa, observa-se a muscular da mucosa, que na região anterior exibe apenas uma camada de fibras musculares lisas em sentido longitudinal (Figura 10). Nas regiões média e posterior notam-se fibras musculares em sentidos: circular interno e longitudinal externo (Figura 12). A camada submucosa constitui-se por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos.

A camada muscular também é um diferencial para a distinção das regiões do órgão. As regiões anterior e média exibem feixes de fibras musculares lisas em dois sentidos: circular interna e longitudinal externa (Figuras 20 e 21). Na primeira, ambas apresentam-se com a mesma espessura, e na segunda a subcamada circular interna torna-se mais espessa em vista da longitudinal externa. Por fim, na parte posterior a camada muscular expõe feixes de fibras musculares lisas em um único sentido: circular (Figura 22). Intercalando os feixes de fibras desta região notam-se porções de tecido conjuntivo frouxo, o que remete a ideia de que a musculatura envolve o tubo de maneira helicoidal.

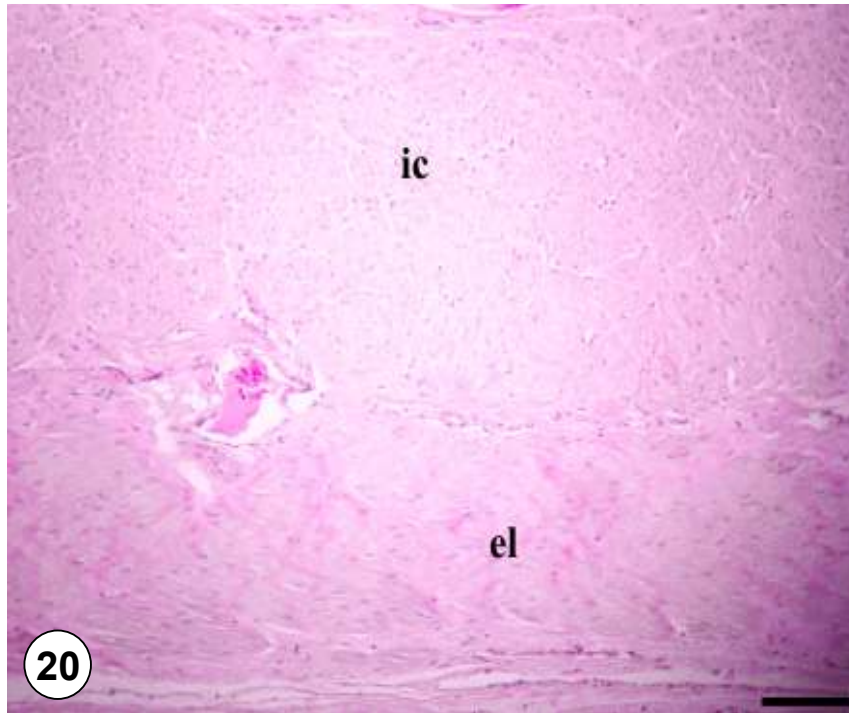


Figura 20: Fotomicrografia do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Região anterior - Camada muscular da região anterior apresentando feixes de fibras musculares em dois sentidos: interno circular (ic) e externo longitudinal (el). HE. Barra = 100 μ m.

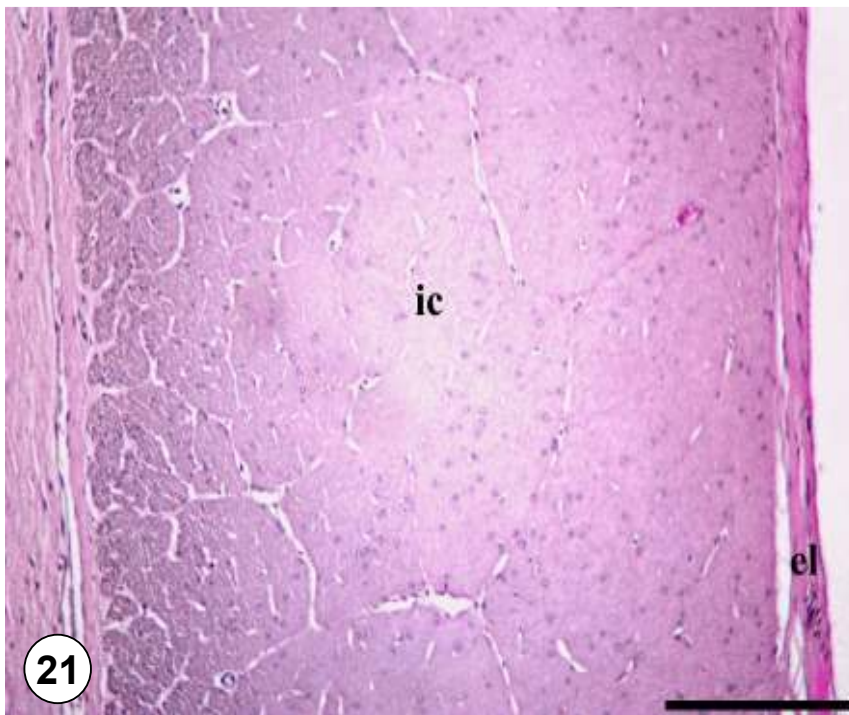


Figura 21: Fotomicrografia do **estômago** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Região média - Camada muscular representada por feixe de fibras musculares em sentidos interno circular (ic) e externo longitudinal (el). HE. Barra = 50 μ m.

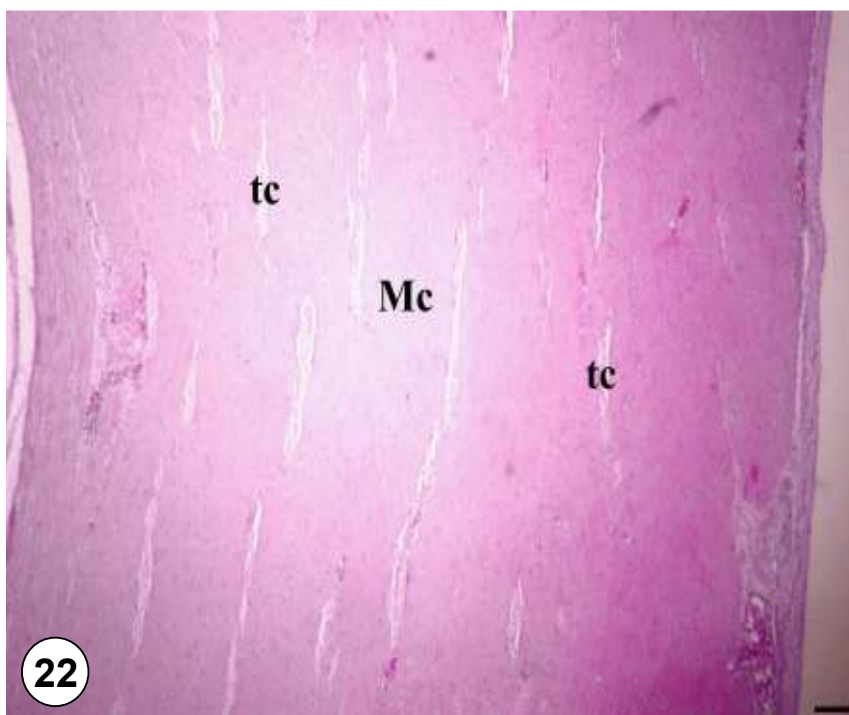


Figura 22: Fotomicrografia do **estômago** de *P. Geoffroyanus* (corte transversal). Região posterior - Camada muscular (Mc) formada por feixes de fibras em sentido circular, intercaladas por porções de tecido conjuntivo (tc). Camada serosa. HE. Barra = 100 µm.

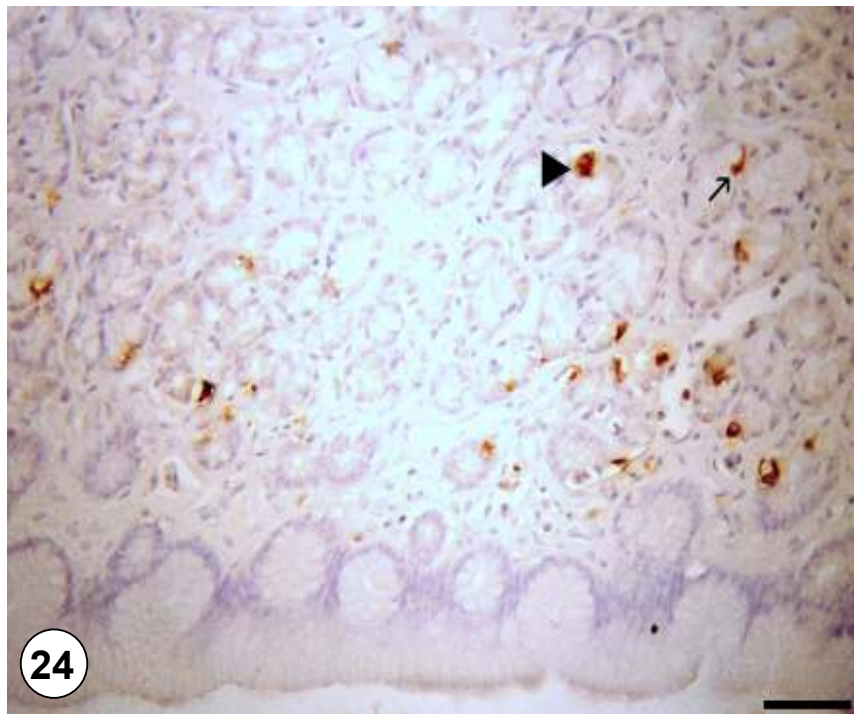
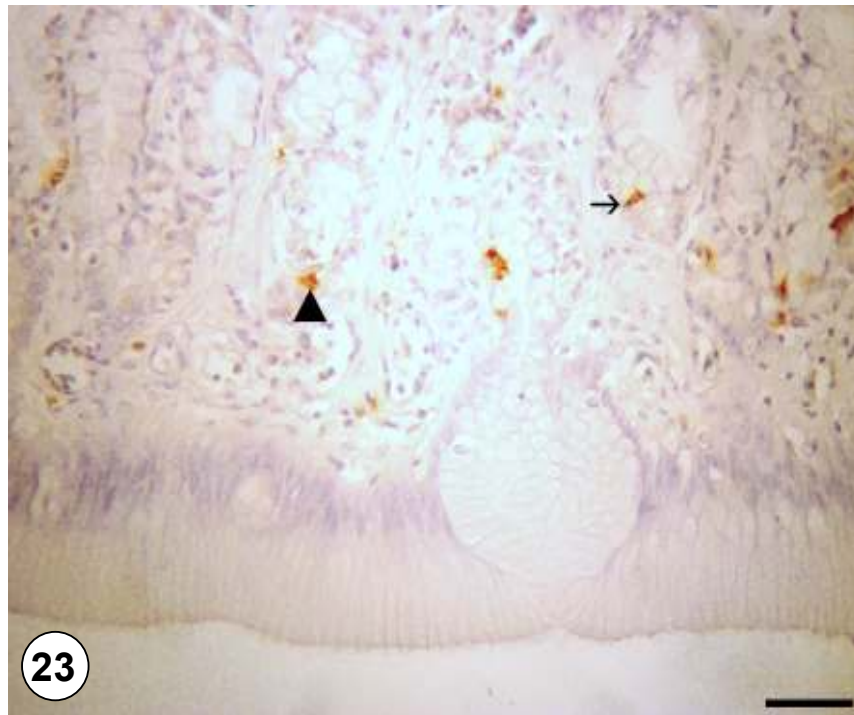
Apenas na região média do estômago observa-se a existência de plexos mioentéricos dispostos em grupos esparsos, compondo o sistema nervoso entérico, entre as subcamadas musculares. Subjacente existe uma camada serosa, constituída de tecido conjuntivo com algumas fibras nervosas, vasos sanguíneos e o mesotélio.

3.2 Imuno-histoquímica

Foram observadas células imunorreativas (IR) a três dos seis anticorpos utilizados: 5-HT, SOM e INS, ao longo do estômago de *P. Geoffroyanus* (Tabela 4).

3.2.1 Serotonina (5-HT)

Nas porções anterior e média do estômago, as células IR ao anticorpo anti-5-HT situam-se apenas nas glândulas gástricas (Figuras 23 e 24). Na porção posterior a imunorreatividade é notada tanto no epitélio de revestimento quanto em células que compõem as glândulas (Figura 25). Quanto ao formato das células que sintetizam 5-HT, observam-se células do tipo aberto que se comunicam com a superfície do epitélio, e células do tipo fechado, ou seja, células sem contato direto com a luz do órgão. A frequência de células marcadas pelo anticorpo aumentou consideravelmente da porção anterior para a porção média e posterior do estômago, sendo classificada como moderada a frequência relativa da primeira fração tornando-se alta posteriormente nas duas outras regiões.



Figuras 23 e 24: Fotomicrografias de células IR ao anticorpo anti-5-HT no estômago de *P. Geoffroyanus*. **(23)** Região anterior - Marcação celular apenas a nível glandular: células do tipo aberto (seta) e do tipo fechado (cabeça de seta). **(24)** Região média - semelhante ao encontrado na porção anterior. Células IR do tipo aberto (seta) e do tipo fechado (cabeça de seta) apenas na altura das glândulas gástricas. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barra = 100 µm.

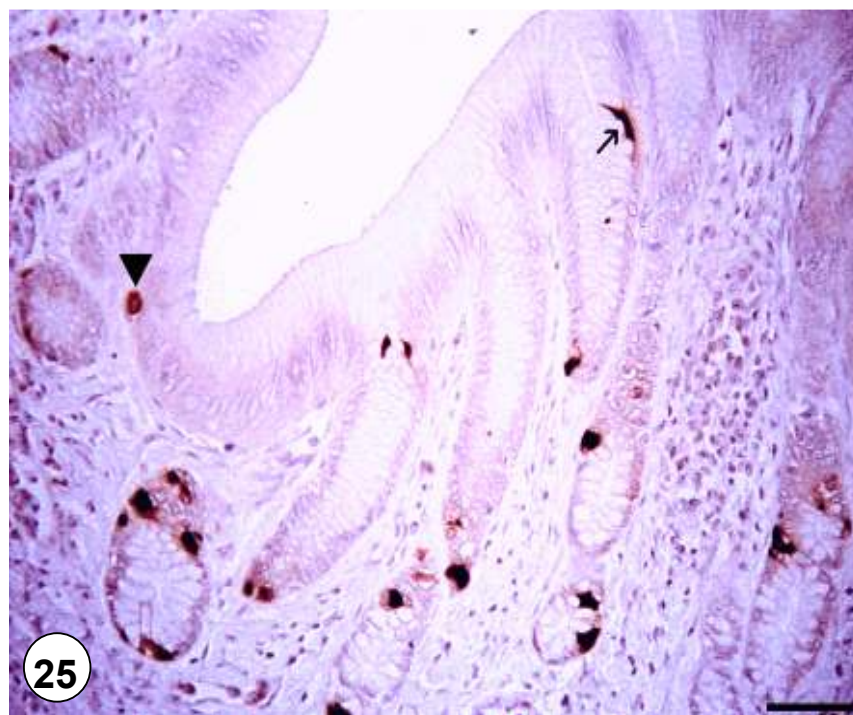
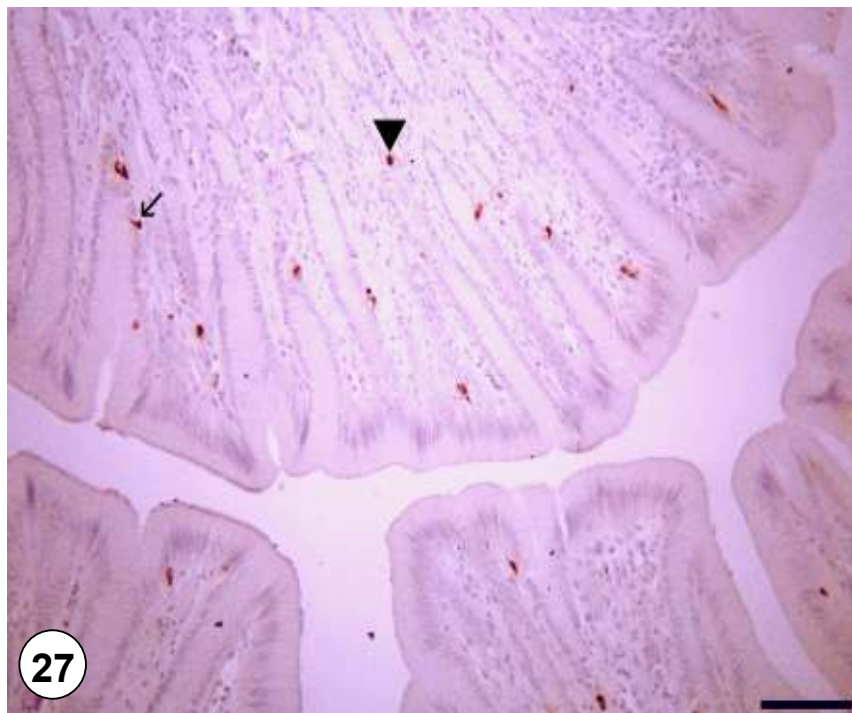
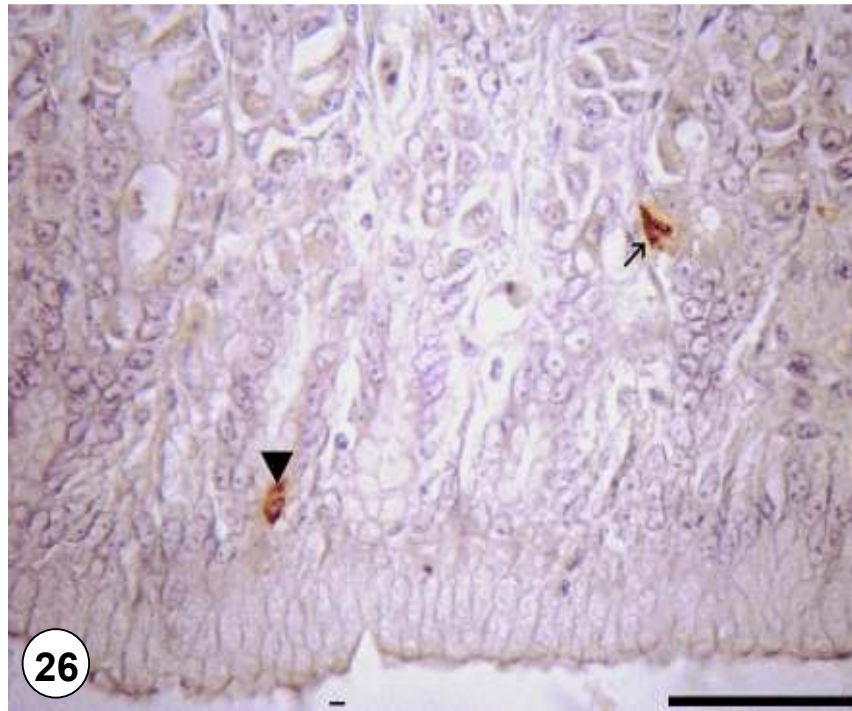


Figura 25: Fotomicrografia de células IR ao anticorpo anti-5-HT no estômago de *P. geoffroanus*. Região posterior - Exibiu os dois formatos celulares: tipo aberto (seta) e fechado (cabeça de seta), tanto na porção epitelial quanto na porção glandular da região. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barra = 100 μ m.

3.2.2 Somatostatina (SOM)

As células IR ao anticorpo anti-SOM são detectadas apenas nas regiões média (Figura 26) e posterior (Figuras 27 e 28) do estômago. No estômago, assim como para 5-HT, as células dos tipos aberto e fechado, que reagiram a anticorpo são vistas apenas nas glândulas gástricas na região média, e tanto nas glândulas gástricas quanto no epitélio na região posterior. A frequência relativa nas duas áreas é descrita como moderada.



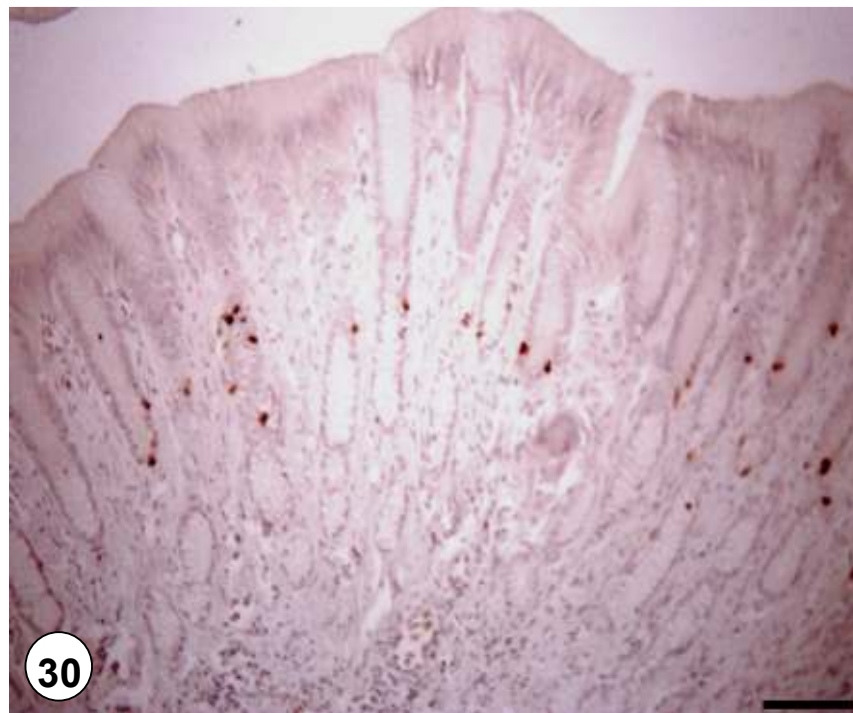
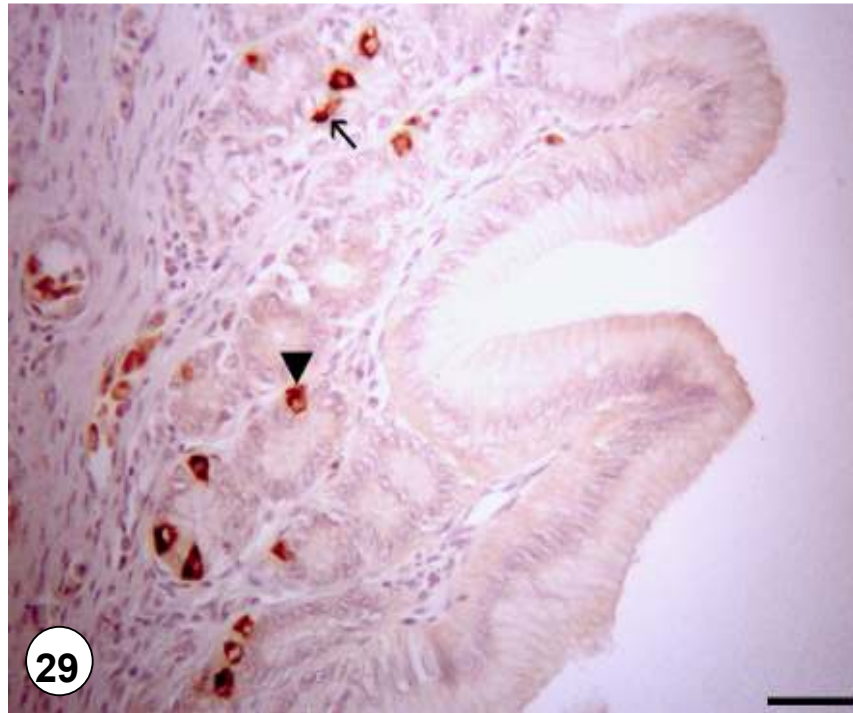
Figuras 26 e 27: Fotomicrografias de células IR ao anticorpo anti-SOM no estômago de *P. geoffroanus*. **(26)** Região média - Células IR, dos tipos aberto (seta) e fechado (cabeça de seta), compondo as glândulas gástricas. Barra: 50 μm . **(27)** Região posterior - Visão geral mostrando células dos dois formatos: aberto (seta) e fechado (cabeça de seta), tanto na porção epitelial quanto na porção glandular da região. Barra: 100 μm . Contracoloração: Hematoxilina de Harris.



Figura 28: Fotomicrografias de células IR ao anticorpo anti-SOM no estômago de *P. geoffroanus*. Em destaque células dos tipos aberto (seta) e fechado (cabeça de seta). Barra: 50 μ m. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.

3.2.3 Insulina (INS)

Assim como para SOM, as células IR ao anticorpo anti-INS são observadas somente nas regiões média (Figura 29) e posterior (Figura 30) do estômago. Células dos tipos aberto e fechado distribuem-se apenas nas glândulas gástricas da porção média do estômago, e tanto nas glândulas gástricas quanto no epitélio na porção posterior do órgão. A frequência relativa na região média do estômago é considerada baixa tornando-se moderada na porção posterior.



Figuras 29 e 30: Fotomicrografias de células IR ao anticorpo anti-INS no estômago de *P. geoffroanus*. (29) Região média - Células IR, dos tipos aberto (seta) e fechado (cabeça de seta), compondo as glândulas gástricas. Barra: 50 μ m. (30) Região posterior - Visão geral mostrando células dos dois formatos, tanto na porção epitelial quanto na porção glandular da região. Barra: 100 μ m. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.

4 DISCUSSÃO

Anatomicamente o estômago de *P. geoffroanus* apresentou-se como um órgão tubular, sem saculações, semelhante ao identificado em *Caretta caretta*, *Dernochelys coriácea* (MAGALHÃES, 2007) e *Mesoclemmys vanderhaegei* (PINHEIRO *et al.*, 2010). Não sendo este o único formato visualizado em quelônios como assegura MAGALHÃES (2010) em estudo com espécies da família Podocnemididae. A anatomia do estômago reflete diretamente o tipo de dieta do animal (WORK 2000; ROMER & PARSONS 1985). Répteis carnívoros possuem estômago mais simples se comparados aos herbívoros, pois nestes o órgão funciona como câmara fermentativa para processamento do material de origem vegetal (HILDEBRAND, 1995).

No estudo desenvolvido por MAGALHÃES (2010) a espécie onívora *P. dumerilianus* dentre outras quatro espécies foi a que apresentou o estômago mais simples e também a que consumiu maior quantidade de proteína de origem animal entre os podocnemididae (PEREZ-EMAN & PAOLILLO, 1977). Este achado vai de encontro ao encontrado na espécie onívora *P. geoffroanus*, a qual também possui estômago simples e, segundo MOLINA (1991), tem hábito alimentar preferencialmente carnívoro. Embora alguns estudos identifiquem uma preferência alimentar das espécies, ou seja, consumirem determinados itens em detrimento de outros, LEGLER (1993) sugere que os testudines são oportunistas, aproveitando-se da disponibilidade local de alimento.

O arranjo da parede do estômago de *P. geoffroanus* assemelha-se ao padrão encontrado nos vertebrados, salvo algumas particularidades relacionadas com seu hábito alimentar. São quatro as túnicas que compõem a parede: mucosa, submucosa, muscular e serosa.

Partindo do lúmen para o exterior do órgão, a primeira túnica exibe pregas longitudinais, que se mostram mais altas e delgadas nas duas primeiras porções do estômago, tornando diminuta a luz do estômago. Na porção posterior estas são mais discretas, ampliando a passagem do bolo alimentar. As mudanças nos padrões de pregas de um segmento para outro é relevante uma vez que, ao aumentar ou diminuir a luz do órgão controlam o trânsito do bolo alimentar, otimizando assim a absorção de nutrientes importantes. Este pregueamento, segundo MITCHELL & DIAZ FIGUEROA (2005) representa também o aumento da superfície de absorção, capacidade de distensão e acomodação de grandes quantidades de alimentos, pois além das funções digestivas, o estômago também funciona como reservatório de alimentos (D'ARCE & FLECHTMANN, 1985).

Histologicamente segundo MAGALHÃES (2010) é possível distinguir em quelônios as cavidades do TD por uma mudança abrupta no epitélio de revestimento, onde o esôfago é revestido pelo epitélio estratificado pavimento ou estratificado cilíndrico e passa a estratificado cilíndrico mucossecretor no estômago. Mas em *P. geoffroanus*, o limite entre os órgãos não foi pontual, devido ao epitélio de revestimento ser comum a ambos: epitélio cilíndrico simples com células secretoras de muco. A diferenciação ficou clara devido à existência de glândulas entremeadas no epitélio esofágico e a formação de fossetas gástricas onde desembocam glândulas tubulares na porção do estômago. Estudos revelam que o epitélio cilíndrico simples mucossecretor compõe o estômago da maioria dos vertebrados (SILVA 2005; CAL, 2006; SANTOS *et al.*, 2007; BANKS, 1992; SANTANA & MENIN, 1994; GALLEGO-HUIDOBRO & PASTOR, 1996; GEORGE & CASTRO, 1998; PEREIRA *et al.*, 2005). Dentro da classe dos répteis as espécies *Hemidactylus mabouia* (SARTORI, 2009) e *Ghyra mutilate* (CHOU, 1977) apresentam este mesmo revestimento no estômago. Outras espécies não apresentam células mucossecretoras, *Tiliqua scincoides* (GIRAUD *et al.*, 1979),

Pristurus rupestris (DEHLAWI & ZAHER, 1985), *Coluber florulentus* (DEHLAWI & ZAHER, 1989), *Varanus niloticus* (AHMED *et al.*, 2009) e *Uromastyx aegyptiaca* (ZAHER *et al.*, 2012). Para estes autores a provável função das secreções mucosa é resguardar as células epiteliais contra o ácido clorídrico produzido pelas glândulas gástricas, permitir o trânsito do alimento ao intestino e auxiliar na hidratação do bolo alimentar.

A produção de glicosaminoglicanas (GAG's) neutras (reativa ao PAS) e ácidas (reativa ao AB) está presente em todo revestimento do estômago do cágado-de-barbicha. As GAG's neutras se encarregam de formar um fluxo laminar responsável pelo transporte das partículas ao longo do tubo, o que confirma a semelhança de produção deste muco nas três partes do estômago. Já as GAG's ácidas são mais viscosas atuando no aprisionamento de partículas (SIBBING & URIBE, 1985). Isto justifica as taxas decrescentes de produção desta mucina da porção anterior para a posterior, estando às porções anterior e média intimamente ligadas aos processos digestivos devido ao elevado número de glândulas produtoras desta secreção; e a porção posterior, pela concentração menor de glândulas, e assim menor produção desta mucina, responsável pelo transporte do alimento para os intestinos.

Estudos mostram que alguns répteis apresentam positividade apenas à técnica de PAS como é o caso de *Diplometopon zarudnyi* (AL- THANI & EL-SHERIF, 1996), *H. mabouia* (SARTORI, 2009), *Eumeces laticutatus* (SAGANUMA *et al.*, 1981), *Lacerta lepida* (MADRID *et al.*, 1989), *Podarcis sicula* (FERRI & LIQUORI, 1992) e *Chalcides chalcides* (FERRI *et al.*, 1999), *Uromastyx aegyptiaca* (ZAHER *et al.*, 2012), mas diferente da cobra *Elaphe climacophora* (SAGANUMA *et al.*, 1981) e de muitos mamíferos (SHEAHAN & JERVIS, 1976), que produzem principalmente mucinas ácidas. *Varanus niloticus* (AHMED *et al.*, 2009) apresentou positividade epitelial apenas ao PAS, sendo que as glândulas gástricas reagiram às duas técnicas.

Ao longo de toda a extensão do estômago é observada a presença de fossetas gástricas, invaginações do epitélio de revestimento, as quais se comunicam com glândulas tubulares bem desenvolvidas, havendo apenas variações entre as regiões na profundidade destas e no número de glândulas gástricas na lâmina própria. Assim como em *Coluber florulentus* (DEHLAWI & ZAHER, 1989), a porção média apresentou maior quantidade de glândulas que a porção posterior. O mesmo foi visualizado para as espécies *Podocnemis sextuberculata*, *Peltocephalus dumerilianus* e *Chelonia myda*, mas difere do observado em *Podocnemis expansa*, *Podocnemis unifilis* e *Podocnemis erythrocephala* (MAGALHÃES, 2010). O aumento no tamanho das fossetas em direção a fração posterior do estômago pode ser justificada com o concomitante aumento do número de glândulas gástricas, garantido ao alimento contado mais duradouro com as secreções eliminadas nesta câmara. Nas espécies *Uromastyx aegyptiaca* (ZAHER *et al.*, 2012), *Agama stellio* (AMER & ISMAIL, 1976), *Uromastyx philbi* (FARAG, 1982) e *Pristurus rupestris* (DEHLAWI & ZAHER, 1985) glândulas gástricas também foram visualizadas.

As células oxinticopépticas, correspondentes às células parietais e principais dos mamíferos, cuja função já esclarecida é de secretar tanto ácido clorídrico (HCl) quanto pepsinogênio (ANDREW & HICKMAN, 1974), não aparecem apenas nas glândulas gástricas dos répteis, mas também em outros vertebrados não mamíferos (ARENA *et al.*, 1990; RUIZ *et al.*, 1993; GRABOWSKY *et al.*, 1995, GALLEGO-HUIDOBRO & PASTOR, 1996; GEORGE & CASTRO, 1998). De acordo com FERRI *et al.*, (1999), exibir dois tipos ou um único tipo de células para a síntese de HCl e pepsinogênio não está ligado a filogenia das espécies.

A muscular da mucosa, assim como descrito em *Chelonia myda* (MAGALHÃES, 2010), em *H. mabouia* (SARTORI, 2009), em *Uromastyx aegyptiaca* (ZAHER *et al.*, 2012) e em *Coluber florulentus* (DEHLAWI & ZAHER, 1989), está presente nas três porções do estômago, seguindo padrões distintos em cada região. Na região anterior, esta camada

organiza-se em feixes de fibras musculares em sentido longitudinal, já nas regiões média e posterior as fibras musculares passam a conter duas subcamadas, uma circular interna e uma longitudinal externa. CHAVES & VAZZOLER, 1984; SANTOS *et al.*, 2007 admitem que a existência de tecido muscular entre a lâmina própria e a submucosa auxilia na eliminação das substâncias produzidas pelas glândulas, fato comprovado pelo maior espessamento desta camada nas regiões com maior densidade glandular.

Na estrutura da túnica muscular também apresenta diferenças de uma área para outra. As porções anterior e média do estômago constituem-se de duas subcamadas, uma circular interna e uma longitudinal externa, o mesmo padrão descrito por PARSONS & CAMERON (1977). Já a porção posterior apenas uma subcamada circular é observada, semelhante ao encontrado ao longo do estômago de *Coluber florulentus* (DEHLAWI & ZAHER, 1989) e de *Hemidactylus mabouia* (SARTORI, 2009). Nas espécies *Diplometopon zarudnyi* (AL-THANI & EL-SHERI, 1996), *Tropidurus peruvianus peruvianus* (PAZ-CASTILLO, 1974), *Uromastix aegyptiaca* (ZAHER *et al.*, 2012), *Varanus niloticus* (AHMED *et al.*, 2009) e *Chelonia myda* (MAGALHÃES, 2010) esta camada apresenta-se de modo semelhante ao encontrado nas regiões anterior e médio do estômago de *P. geoffroanus*, em todos os segmentos do estômago. Segundo SILVA (2004) esta camada é responsável por dar mobilidade ao TD, transportando e misturando os alimentos com as secreções digestivas. Outro tecido que garante este processo são os plexos mientéricos, localizados entre as subcamadas de tecido muscular da região do corpo do estômago. Este também foi descrito para *H. mabouia* (SARTORI, 2009).

Os resultados imuno-histoquímicos comprovam a existência de células imunorreativas a três anticorpos dos seis testados: 5-HT, SOM e INS no estômago de *P. geoffroanus*. Aparecendo células ditas do tipo aberta e do tipo fechada em todas as regiões. Crê-se que as primeiras detectem alterações do pH ou da composição do conteúdo do lúmen, enquanto que as do tipo fechado respondem à distensão ou a estimulação neuro-endócrina (FUJITA & KOBAYASHI, 1977). Nenhuma marcação para os anticorpos GAS, GLUC e PP foi registrada.

Em *P. geoffroanus*, células IR ao anticorpo anti-5-HT dos tipos aberto e fechado são encontradas ao longo do estômago com distribuições distintas de uma fração para outra. A maior frequência relativa foi visualizada na porção posterior, resultado que corrobora com achados para as espécies *Egernia kingii* (ARENA *et al.*, 1990), *Trachemys scripta elegans* (KU, *et al.*, 2001), *Eumeces chinensis*, *Sphenomorphus indicus* e *Eumeces elegans* (HUANG & WU, 2005) *Mauremys caspica caspica* (PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989; TARAKÇI *et al.*, 2005) e para a família Colubridae (LEE *et al.*, 1999). Já as espécies *Testudo graeca* (Perez-Tomas *et al.*, 1989) e *Gekko japonicus* (HUANG & WU, 2004) apresentaram similaridades na frequência destas células nas três regiões. Estas células já foram identificadas na extensão do TD de todas as classes de vertebrados (YAMANAKA *et al.*, 1989; AGUNGPRIYONO *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2004; PELLI-MARTINS *et al.*, 2011; MACHADO-SANTOS *et al.*, 2011; ADNYANE *et al.*, 2011), admitindo que a localização destas células é um fator evolutivo (EL-SALHY *et al.*, 1985). A função da 5-HT é estimular a contração muscular do TD, promover a secreção exócrina (CECCARELLI *et al.*, 1995), estimular respostas vasodilatadoras na submucosa (VANNER, 2000). A secreção deste hormônio esta sujeita a estímulos no lúmen como, acidificação, instilação de glicose hipertônica ou solução de sacarose, estimulação vagal, aumento da pressão intraluminal, obstrução mecânica do intestino e isquemia intestinal (LI *et al.*, 2000).

A produção de SOM no TD é incitada pela acidez no interior do estômago, pela existência de glicose, aminoácidos e gorduras no intestino, por ação de neurotransmissores do sistema nervoso autônomo, e ainda pelos hormônios: colecistoquinina e glucagon pancreático (ALLEN, 1987; DICKSON, 1996). Neste sistema a função principal deste peptídeo é o de

bloquear a excreção de outros hormônios tais como: gastrina, colecistoquinina, glucagon, insulina, secretina, motilina, peptídio inibidor gástrico (GIP), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), substância P, polipeptídeo pancreático (PP) e enteroglucagon (TWEDT, 1987; KONG *et al.*, 2002). Também cessa a liberação de ácido gástrico, a motilidade do estômago e intestino, a função exócrina do pâncreas, a contração da vesícula biliar e a assimilação de nutrientes (GANONG, 1998; BRAZEAU *et al.*, 1973). A síntese de SOM, na espécie em estudo, restringiu-se as regiões média e posterior do estômago. Mas já foi descrita a produção deste mesmo peptídeo ao longo de todo o estômago das espécies *Testudo graeca* e *Lacerta lepida* (PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989), *Trimeresurus stejnegeri* (ZHANG *et al.*, 2001) *Trionyx sinensis* (LIN *et al.*, 2001) *Caiman latirostris* (YAMADA, *et al.*, 1987), *Alligator sinensis* (WU *et al.*, 1999), *Alligator mississippiensis* (BUCHAN *et al.*, 1983), *T. scripta elegans* (KU *et al.*, 2001), *E. chinensi*, *S. indicus* e *E. elegans*, *G. japonicus* (HUANG & WU, 2004). Alguns répteis não apresentam células produtoras de SOM no estômago, como é o caso de *Takydromus amurensis* (LEE *et al.*, 1995), *M. caspica caspica* (TARAKÇI, *et al.*, 2005) e na família Colubridae (LEE *et al.*, 1999). Estudos mostram que células que sintetizam SOM são encontradas principalmente no estômago dos vertebrados (BALTAZAR *et al.*, 1998; EERDUNCHAOLU *et al.*, 2001; AGUNGRIYONO *et al.*, 2000; ARENA *et al.*, 1990; EL-SALHY & GRIMELIUS, 1981).

Outra marcação visualizada nas porções médio e posterior do estômago de *P. geoffroanus* é de células IR ao anticorpo anti-INS. A produção deste peptídeo por células do TD de vertebrados não é comum, devido a migração destas células do intestino para a formação de um glândula individualizada durante a evolução do grupo (FALKMER *et al.*, 1977). Ainda assim, recentemente estas células foram observadas no trato de alguns quelônios, concentrando-se preferencialmente nos intestinos (GAPP *et al.*, 1985; PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989; GAPP & POLAK, 1990; MUNIZ *et al.*, 1991; TARAKÇI *et al.*, 2005). Poucos são os relatos de distribuição destas células em porções do estômago, sendo encontrado apenas em *Chrysemys picta* (GAPP *et al.*, 1985), *M. caspica* (PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989; TARAKÇI *et al.*, 2005), *Chrysemys dorsibigni* e *Phrynops hilarii* (MUNIZ *et al.*, 1991). A função deste peptídeo e os fatores que controlam a sua secreção neste órgão ainda não foram esclarecidos. Acredita-se que as concentrações de glicose e aminoácidos na circulação após a ingestão de alimento que dão início a síntese e secreção da insulina gástrica, assim como ocorre para a insulina pancreática.

Em conclusão, os estudos histológico e histoquímico do estômago de *P. geoffroanus* revelaram padrões condizentes com hábito alimentar preferencialmente carnívoro, ou seja, estômago simples glandular, produção de mucossecções ao longo do órgão, não possuindo nenhuma especialização para digestão de matéria orgânica vegetal, o que caracteriza a espécie como sendo onívora oportunista. Os dados imuno-histoquímicos mostram que na região posterior do estômago desta espécie, assim como em outros quelônios, há produção de insulina, padrão incomum em vertebrados. Este estudo vai ajudar no entendimento da fisiologia digestiva da espécie investigada e fornecer dados histológicos a serem usados como referência à compreensão de alterações histopatológicas que possam afetar o sistema digestório de quelônios, facilitando o manejo das espécies. Além disso, permitirá análises comparativas dentro do grupo, fornecendo subsídios para estudos evolutivos futuros.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADNYANE, I. K. M.; ZUKI, A. B.; NOORDIN, M. M. & AGUNGRIYONO, S.
Immunohistochemical study of endocrine cell in the gastrointestinal tract of the barking

- deer, *Muntiacus muntjak*. **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine**, v. 40, p. 365-374, 2011.
- AGUNGPRIYONO, S.; MACDONALD A. A.; LEUS K. Y.; KITAMURA, N.; ADNYANE, I. K.; GOODALL, G. P.; HONDO, E. & YAMADA, J. Immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the babirusa, *Babyrousa babyrussa* (Suidae). **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine**, v. 29, p. 173-178, 2000.
- AHMED, Y. A.; EL-HAFEZ, A. A. E. & ZAYED, A. E. Histological and histochemical studies on the oesophagus, stomach and small intestines of *Varanus niloticus*. **Journal of Veterinary Anatomical**, v. 2, n. 1, p. 35-48, 2009.
- ALLEN, T. A. The endocrine pancreas. In: DRAZNER, F. H. **Small animal endocrinology**. New York: Churchill Livingstone, 1987. 508 p.
- AL-THANI, A. S. & EL-SHERI, G. Histological and histochemical study of the digestive tract of the worm-like reptile, *Diplometopon zarudnyi* (Squamata). **Qatar University Science Journal**, v. 16, n. 1, p. 113-117, 1996.
- AMER, F. & ISMAIL, M. H. Histological studies on the alimentary canal of the Agamid lizard *Agama stellio*. **Annales Zoologici**, v. 12, n. 1, p. 12-26, 1976.
- ANDREW, W. & HICKMAN, C. P. **Histology of the vertebrates**. A comparative text. Saint Louis: The C.V. Mosby Company, 1974. 439p.
- ARENA, P. C.; RICHARDSON, K. C. & YAMADA, J. An immunohistochemical study of endocrine cells of the alimentary tract of the King's skink (*Egernia Kingii*). **Journal of Anatomy**, v. 170, p. 73-85, 1990.
- BALTAZAR, E. T.; KITAMURA, N.; HONDO, E.; YAMADA, J.; MAALA, C. P. & SIMBORIO, L. T. Immunohistochemical study of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the philippine carabao (*Bubalus bubalis*). **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine** v. 27, p. 407-411, 1998.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.
- BRAZEAU, P.; VALE, W.; BURGURS, R.; LING, N.; BUTCHER, M.; RIVIER, J. & GUILLEMIN, R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. **Science**, v. 179, p. 77-79, 1973.
- BRITO, F. M. M. **Aspectos anátomo-radiográficos e tempo do trânsito gastrintestinal em cágados-de-barbicha *Phrynops geoffroanus* Schweigger, 1812 (Testudines, Chelidae)**. 2007. 30f. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias - Saúde animal) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.
- BUCHAN, A. M.; LANCE, V. & POLAK, J. M. Regulatory peptides in the tract of Alligator mississippiensis. An immunocytochemical study. **Cell and Tissue Research**, v. 231, p. 439-449, 1983.

- CAL, J. A. **Histologia do tubo digestório de surubim-pintado (*Pseudoplatystoma coruscans* – Agassis, 1829)**. 2006. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias) - Universidade de São Paulo, 2006.
- CASTRO, E. F.; FONSECA, C. C.; MENIN, E. & NEVES, M. T. D. Caracterização histológica e detecção de células endócrinas no estômago de peixes de água doce, com diferentes hábitos alimentares. **Biotemas**, v.16, n. 2, p. 105-130, 2003.
- CECCARELLI, P.; PEDINI, V. & GARGIULO, M. Serotonin containing cells in the horse gastrointestinal tract. **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine**, v. 24, p. 97-99, 1995.
- CHAVES, P. T. C. & VAZZOLER, C. Aspectos biológicos de peixes anatómicos. III. Anatomia microscópica do esôfago, estômago e cecos pilóricos de *Semaprochilodus insignis* (Characiformes: Prochilodontidae). **Acta Amazônica**, v. 14, n. 3-4, p. 343-353, 1984.
- CHOU, L. M. Anatomy, histology and histchemistry of the alimentary canal of gecko *Ghyra mutilate* (Reptilia, Lacertidae, Gekkonidae). **Journal of Herpetology**, v. 11, n. 3, p. 349-357, 1977.
- D'ARCE, R. D. & FLECHTMANN, C. H. W. **Introdução à anatomia e Fisiologia Animal**. São Paulo: Nobel, 1985. 187p.
- DEHLAWI, G. Y.; ZAHER, M. M. Histological studies on the alimentary tract of the colubrid snake, *Coluber florudentus* (Family: Colubridae). **Proceedings of the Zoological Society. A. R. Egypt**, v. 1, p. 95-112, 1989.
- DEHLAWI, G. Y. & ZAHER, M. M. Histological studies on the mucosal epithelium of the gecko *Pristurus rupestris* (Family Geckonidae). **Proceedings of the Zoological Society. A. R. Egypt.**, v. 9, p. 91-112, 1985.
- DICKSON, W. M. Glândulas endócrinas. In: SWENSON, M. J. E REECE, W. O. **Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856 p.
- EERDUNCHAOLU, D. V.; TAKEHANA, K.; KOBAYASHI, A.; YAMADA, J.; UEDA, H.; BAIYIN; CAO, G. F. & ABE, M. Immunohistochemical Study of the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal track of the camel (*Camel bactrianus*). **European Journal of Morphology**, v. 39, p. 57-63, 2001.
- EL-SALHY, M.; GRIMELIUS, L. The endocrine cells of the gastrointestinal mucosa of a squamate reptile, the grass lizard (*Mabuya quinquetaeniata*). A histological and immunohistochemical study. **Biomedical Research**, v. 2, p. 639-658, 1981.
- EL-SALHY M.; WINDER, E.; LUNDQVIST, M. Comparative studies of serotonin-like immunoreactive cells in the digestive tract of vertebrates. **Biomedical Research**, v. 6, p. 371-375, 1985.
- ERNEST, C. H. & BARBOUR, R. W. **Turtles of the world**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1989. 313p.

- FACHÍN-TERÁN, A.; VOGT, R. C. & GOMEZ, M. F. S. Food habits of an assemblage of five species of turtles in the Rio Guaporé, Rondônia, Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 29, p. 536-547, 1995.
- FALKMER, S.; ELDE, R. P.; HELLERSTROM, C.; PETERSON, B., EFENDIC, S. & FOHLMAN, J. Some phylogenetical aspects on the occurrence of somatostatin in the gastro-entero-pancreatic endocrine system: A histological and immunocytochemical study, combined with quantitative radioimmunological assays of tissue extracts. **Archivum Histologicum Japonicum.**, 40, 99- 117, 1977.
- FARAG, A. A. Histological studies on the mucosal epithelium of the agamid lizard, *Uromastyx philbyi* Parker. **Annales Zoologici**, v. 19, n. 1, p. 1-23, 1982.
- FERRI, D.; LIQUORI, G. E. & SCILLITANI, G. Morphological and histochemical variations of mucous and oxynticopeptic cells in the stomach of the seps, *Chalcides chalcides* (Linnaeus, 1758). **Journal of Anatomy**, v. 194, p. 71-77, 1999.
- FERRI, D. & LIQUORI, G. E. Characterization of secretory cell glycoconjugates in the alimentary tract of the ruin lizard (*Podarcis sicula campestris* De Betta) by means of lectin histochemistry. **Acta Histochemica**, v. 93, p. 341-349, 1992.
- FUGI, R. & HAHN, N. S. Espectro alimentar e relações morfológicas com o aparelho digestivo de três espécies comedoras de fundo do rio Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 51, n. 4, p. 873-879, 1991.
- FUJITA, T. & KOBAYASHI, S. Structure and function of gut endocrine cells. **International Review of Cytology**. Supplement. v. 6, p. 187-233, 1977.
- GALLEGO-HUIDOBRO, J. & PASTOR, L. M. Histology of the mucosa oesophagogastric junction and the stomach in adult *Rana perezii*. **Journal of Anatomy**. v. 188, p. 439-444, 1996.
- GANONG, W. F. **Fisiologia Médica**. 17. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 578 p.
- GAPP, D. A. & POLAK, A. M. Localization of Insulin to Gastroenteropancreatic Cells in the Turtle Gastrointestinal Tract. **General and Comparative Endocrinology**, v. 18, p. 48-55, 1990.
- GAPP, D. A.; KENNY, M. P. & POLAK, J. M. The gastro-entero-pancreatic system of the turtle, *Chrysemys picta*. **Peptides**, v. 6, n. 3, p. 347-352, 1985.
- GEORGE, L. L. & CASTRO, R. R. L. **Histologia Comparada**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1998. 286p.
- GIRAUD, A. S.; YEOMANS, N. D. & ST JOHN, D. J. Ultrastructure and cytochemistry of the gastric mucosa of a reptile, *Tiliqua scincoides*. **Cell Tissue Research**, v. 197, n. 2, p. 281 - 94, 1979.

- GODINHO, H. M. Considerações gerais sobre anatomia dos peixes. In: Comissão Interstadual da Bacia Paraná-Uruguai (Ed.). **Poluição e Piscicultura**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP/Instituto de Pesca – SAA, p. 113-136, 1970.
- GRABOWSKY, G. M.; LUCIANO, L.; MACY, E. R. & REALE, E. Morphologic variations of oxynticopeptic cells in the stomach of the river Ray, *Potamotrygon sp.* **Journal of Aquaculture & Aquatic Sciences**, v. 7, p. 38-44, 1995.
- HILDEBRAND, M. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 1995. 700p.
- HUANG, X. G. & WU, X. B. Immunohistochemical study on gastrointestinal endocrine cells of four reptiles. **World Journal Gastroenterology**, v. 11, n. 35, p. 5498-5505, 2005.
- KONG, H. S.; LEE, J. H.; PARK, K. D.; KU, S. K. & LEE, H. S. Immunohistochemical study of the endocrine cells in the pancreas of the carp, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae). **Journal of Veterinary Science**, v. 3, p. 303-314, 2002.
- KU, S. K.; LEE, H. S.; LEE, J. H. & PARK, K. D. An immunohistochemical study on the endocrine cells in the alimentary tract of the reared slider (*Trachemys scripta elegans*). **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine**, v. 30, p. 33-39, 2001.
- LEE, H. S.; LEE, M. S. & LEE, J. H. A histological and immunohistochemical study of the endocrine cells in the gastrointestinal tract of the Amur lizard (*Takydromus amurensis*). **Korean Journal of Veterinary Research**, v. 35, p.67–73, 1995.
- LEE, H. S. & KU, S. K. An immunohistochemical study of endocrine cells in the alimentary tract of the grass lizard, *Takydromus wolteri* Fischer (Laceridae). **Acta Histochemica**, v. 106, p. 171-178, 2004.
- LEE, S. K.; KU, H. S. & LEE, A.M. An immunohistochemical study of endocrine cells in the alimentary tract of the snake, *Rhabdophis tigrinus tigrinus*. **Korean Journal of Veterinary Research**, v. 35, p. 67-73, 1999.
- LEGLER, J. M. Morphology and physiology of the Chelonia. In: GLASBY, C. J.; ROSS, G. J. B. & BEESLEY, P. L. ed. **Fauna of Australia**. Caberra, 1993. p. 108-119.
- LI, Y.; HAO, Y.; ZHU J. & OWYANG, C. Serotonin released from intestinal enterochromaffin cells mediates luminal non-cholecystokinin-stimulated pancreatic secretion in rats. **Gastroenterology**, v. 118, p. 1197-1207, 2000.
- LIN, S. G.; HUANG, Z. J. & WANG, S. K. Localization and identification of endocrine cells in the Gastro-Entero-Pancreatic system of *Trionyx sinensis*. **Shuichan Xuebao**, v. 25, p. 328-333, 2001.
- LUZ, V. L. F.; STRINGHINI, J. H.; BATAUS, Y. S. L.; PAULA, W. A.; NOVAIS, M. N. & REIS, I. J. Morfometria do trato digestório da tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) criada em sistema comercial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 10-18, 2003.

- MACHADO-SANTOS, C.; ZECA, S. G.; ABIDU-FIGUEIREDO, M.; RIBEIRO, I. C. A. & SALES, A. The esophagus of the crocodilian *Caiman latirostris* (Reptilia, Crocodylia): histological, histochemical and immunohistochemical study. **Journal of Morphological Science**, v. 28, p. 113-119, 2011.
- MADRID J. F.; BALLESTA, J.; PASTOR, L. M.; PEREZ-TOMAS, R. & HERNANDEZ, F. Distribution of mucins in the mucosa of the digestive tract of reptiles: a histochemical study. **Acta Histochemica**, v. 85, p. 117-129, 1989.
- MAGALHÃES, M. S. **Análise comparativa do tubo digestivo de tartarugas marinhas**. 2007. 52f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2007.
- MAGALHÃES, M. S. **Morfologia do tubo digestório aplicada à compreensão da dieta em quelônios da família Podocnemididae**. 2010. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia de água doce e pesca interior) - INPA, Manaus, AM, 2010.
- MEDEN, F., 1960. Informe sobre reptiles colombianos. (V) Observaciones sobre la distribución geografica y ecología de la tortuga *Phrynops geoffroana* 1Sp. en Colombia. **Noved. Colombianas**, v. 1, n. 5, p. 291-300, 1960.
- MITCHELL, M. A. & DIAZ-FIGUEROA, O. Clinical Reptile Gastroenterology, Philadelphia, **Gastroenterology**, v.8, n.2, p. 277-298, 2005.
- MOLINA, F. B. Observações sobre os hábitos e o comportamento alimentar de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em cativeiro (Reptilia, Testudines, Chelidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 7, n. 3, p. 319-326, 1991.
- MONTEIRO, L. P. & DIEFENBACH, C. O. C. Thermal regime of *Phrynops hilarii* (Reptilia, Chelonia). **Boletim de Fisiologia Animal**, São Paulo v. 11, p. 41-50, 1987.
- MUNIZ, W. W.; MACHADO, V. L. & MARQUES, M. Immunohistochemical localization of insulin-like materials in antral gastric mucosa and intestinal epithelial cells of the turtles *Chrysemys dorbigni* and *Phrynops hilarii*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 3, p.327-31, 1991.
- PARSONS, T. S. & CAMERON, J. E. Internai Relief of the Digestive Tract. In: **Biology of Reptilia**. ed. By.carl Gans. London and New York: Academic Press, 1977. v. 6, p. 159-224.
- PAZ-CASTILLO, J. Aspectos histológicos del tracto digestivo de *Tropidurus peruvianus peruvianus*. **Revista Peruana de Biología**, v. 1, n. 2, p. 159-163, 1974.
- PELLI-MARTINS, A. A.; MACHADO-SANTOS, C.; SALES, A. & BRITO-GITIRANA, L. Histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural observations of the esophagus morphology of *Rinnella icterica* (Anuran, Bufonidae). **Acta Zoologica**. v. 00, p. 1-8, 2011.

- PEREIRA, J.G.; FONSECA, C.C.; MENIN, E. & NEVES, M.T.D. Estudo histológico e histoquímico do esôfago do muçua *Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766 Reptilia, Chelonia, Kinosternidae). **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia UNIPAR**, v. 8, n. 1, p. 3-10, 2005.
- PEREZ-ÉMAN, J. L. & PAOLLILO, O. A. Diet of the Pelomedusid turtle *Peltocephalus dumerilianus* in the Venezuelan Amazon. **Journal of Herpetology**, v. 31, n. 2, p. 173-179, 1997.
- PEREZ-TOMAS, R.; BALLESTA, J.; PASTOR, L. M.; MADRID, J. F. & POLARK, J. M. Comparative immunohistochemical study of the gastroenteropancreatic endocrine system of three reptiles. **General and Comparative Endocrinology**, v. 76, p. 171-191, 1989.
- PINHEIRO, J. N.; GODOY, I.; BRITO, E. S.; STRÜSSMANN, C. & FERRAZ, R. H. S. Macroscopic aspects of the Gastrointestinal Tract of the South American freshwater turtle *Mesoclemmys vanderhaegei* (Bour, 1973). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 47, n. 6, p. 429-438, 2010.
- RODRIGUES, M. J. J.; CARDOSO, E. C.; CINTRA, I. H. A. & SOUZA, R. F. C. Composição química do conteúdo estomacal da tartaruga-da-amazônia, *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812), em ambiente natural. **Boletim Técnico Científico CEPNOR**, v. 4, n. 1, p. 57-65, 2004.
- RODRIGUES, S. S.; FONSECA, C. C. & NEVES M. T. D. Células endócrinas do sistema gastroenteropancreático: Conceitos, distribuição, secreções, ação e controle. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia UNIPAR**, v. 8, n. 2, p. 171-180, 2005.
- ROMER, A. S. & PARSONS, T. S. **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 1985. 481p.
- RUIZ, M. C.; ACOSTA, A.; ABAD, M. J. & MICHELANGELL, F. Nonparallel secretion of pepsinogen and acid by gastric oxyntopeptic cells of the toad (*Bufo marinus*). **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 28, p. G934- G941, 1993.
- SAGANUMA, T.; KATSUYAMA, T.; TSUKAHARA, M.; TATEMATSU, M.; SAKAKURA, Y. & MURATA, F. Comparative histochemical study of alimentary tracts with special reference to the mucous neck cells of the stomach. **American Journal of Anatomy**, v.161, p. 219-238, 1981.
- SANTANA, M. A. & MENIN, E. Anatomia funcional do aparelho digestivo de *Leptodactylus labyrinthicus* Spix, 1824 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Revista Ceres**, v. 41, p. 138-167, 1994.
- SANTOS, C. M.; DUARTE, S.; SOUZA, T. G. L.; RIBEIRO, T. P.; SALES, A. & ARAÚJO, F. G. Histologia e caracterização histoquímica do tubo gastrintestinal de *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) no reservatório de Funil, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Série. Zoológica**, v. 97, p. 411-417, 2007.

- SARTORI, S. S. R. **Morfologia do tubo digestivo da lagartixa *Hemidactylus mabouia* Moreau de Jonnès, 1818 (Squamata:Gekkonidae)**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil, 2009.
- SHEAHAN, D. G. & JERVIS, H. R. Comparative histochemistry of gastrointestinal mucosubstances. **American Journal of Anatomy**, v. 146, p. 103-132, 1976.
- SIBBING, F. A. & URIBE, R. Regional specialisation in the oro-pharyngeal wall and food processing in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Netherlands Journal of Zoology**, v. 35, p. 377-422, 1985.
- SILVA, N. B. Histologia do sistema digestório de sagüiru, *Steindachnerina notonota* (Miranda Ribeiro 1937) (Pisces, Curimatidae), do rio Ceará-Mirim, Rio Grande do Norte, Brasil. **Bolm Inst. Pesca**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2005.
- SILVA, N. B. **Estudo morfohistológico do tubo digestório de *Steindachnerina notonota* Ribeiro 1937 (Characiforme, Curimatidae) e *Hoplias malabaricus* Bloch 1794 (Characiformes, Erythrinidae) do rio Ceará-Mirim em Umari, distrito de Taipu-RN**. 2004. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN, Brasil, 2004.
- SOUZA, F. L. & ABE, A. S. Fauna urbana: o cágado e a poluição dos rios. **Ciência Hoje** v. 25, p. 59-61, 1999.
- SWENSON, M. J. & REECE, W. O. D. **Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856 p.
- TARAKÇI, B. G.; KÖPRÜCÜ, S. S. & YAMAN, M. An immunohistochemical study on the endocrine cells in the gastrointestinal tract of the freshwater turtle, *Mauremys caspica caspica*. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 29, p. 581-587, 2005.
- TWEDT, D. C. Gastrointestinal peptide hormones. In: DRAZNER, F. H. **Small animal endocrinology**. New York: Churchill Livingstone, 1987. 508 p.
- VANNER, S. Myenteric neurons activate submucosal vasodilator neurons in guinea pig ileum. **American Physiological Society - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, p. 380-387, 2000.
- WORK, T. M. **Manual de necropsia de Tortugas marinas para biólogos em refúgios o areas remotas**. Hawaii Field Station: National Wildlife Health Center, 2000. 25p.
- WU, X. B.; ZHANG, S. Z.; CHEN, B. H.; DENG, Z. P.; ZHOU, Z. X.; WANG, C. L.; NIE, J. S. & XIE, W. S. Immunohistochemical studies on endocrine cells in the digestive tract of *Alligator sinensis*. **Dongwu Xuebao**, v. 45, p. 155-161, 1999.
- YAMADA, J.; CAMPOS, V. J.; KITAMURA, N.; PACHECO, A. C.; YAMASHITA, T. & YANAIHARA, N. An immunohistochemical study of the endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the *Caiman latirostris*. **Archivum Histologicum Japonicum**, v. 50, p. 229-241, 1987.

- YAMANAKA, Y.; YAMADA, J.; KITAMURA, N. & YAMASHITA, T. An immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the chicken gastrointestinal tract. **Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung**, v. 103, p. 437-446, 1989.
- ZAHER, M.; EL-GHAREEB, A. W.; HAMDI, H.; ESSA, A. & LAHSIK, S. Anatomical, Histological and Histochemical Adaptations of the Reptilian Alimentary Canal to Their Food Habits: I. *Uromastix aegyptiaca*. **Life Science Journal**, v. 9, n. 3, p.84-104, 2012.
- ZHANG, Z. Q.; ZHANG, S. Z. & WU, X. B. Immunohistochemical localization of the endocrine cells in the digestive tract of *Trimeresurus stejnegeri*. **Dongwu Xuebao**, v. 47, p. 666-671, 2001.

CAPÍTULO III

Intestino de *Phrynosops geoffroanus*: Caracterização histológica e histoquímica e detecção por imuno-histoquímica de células do Sistema Neuroendócrino Difuso

RESUMO III

VIEIRA-LOPES, Danielle Alcantara. **Intestino de *Phrynops geoffroanus*: Caracterização histológica e histoquímica e detecção por imuno-histoquímica de células do Sistema Neuroendócrino Difuso**. 2013. 124p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Informações sobre a morfologia intestinal fornecem dados para pesquisas com enfoque fisiológico e nutricional, visando melhorar a dieta dos animais. As variedades morfológicas dos intestinos são vistas como consequência da qualidade alimentar e das necessidades energéticas dos organismos. Este estudo descreve a histologia e histoquímica do intestino de *Phrynops geoffroanus* e a ocorrência de algumas células endócrinas neste órgão. O intestino divide-se em duas regiões: intestino anterior e intestino posterior, de acordo com as características da camada mucosa. É revestido por um epitélio simples cilíndrico com borda estriada e células caliciformes que é reativo ao PAS e AB (pH 0,4 e pH 2,5). A muscular da mucosa é visualizada em ambas as regiões, sendo que na porção posterior do órgão esta acompanha a lâmina própria e a submucosa na formação das pregas intestinais, o que não ocorre nas vilosidades da porção anterior. A submucosa constitui-se de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Periférico à submucosa está a muscular, consistindo de músculo liso arranjado em uma camada circular interna e uma camada longitudinal externa. Entre as duas camadas musculares existem pequenas quantidades de tecido conjuntivo contendo vasos sanguíneos, vasos linfáticos e plexos mioentéricos. Externamente observa-se camada serosa. Células imunorreativas aos anti-soros anti-serotonina e anti-insulina são encontradas no epitélio das duas porções órgão. Imunorreatividade ao anti-soros anti-somatostatina é restritas ao epitélio do intestino anterior. Este estudo fornece dados sobre a fisiologia digestiva da espécie investigada, possibilitando uma futura comparação com outras espécies para maior compreensão dos aspectos evolutivos.

Palavras chaves: Réptil, histoquímica, mucinas, células endócrinas.

ABSTRACT III

The intestine of *Phrynops geoffroanus*: Histological and histochemical characterization and immunohistochemical detection of diffuse neuroendocrine system cells. 2013. 124p. Dissertation (Master in Animal Biology). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Information on intestinal morphology is important for studies with physiological and nutritional focus, to improve the diet of animals. The morphological varieties of the gut are a consequence of the food quality and organism's energy needs. This article describes the histology and histochemistry of the intestine of *Phrynops geoffroanus* and the occurrence of endocrine cells in this organ. The intestine is divided into an anterior and posterior region, according to the characteristics of the mucosa layer. It is lined with a simple cylindrical epithelium with striated boundaries and goblet cells, which are reactive to PAS and AB (pH 0.4 and pH 2.5). The mucosa layer can be seen in both regions. In the posterior portion this layer accompanies the lamina propria and submucosa in forming the intestinal folds, which does not occur in the villi of the anterior portion. The submucosa is composed of connective tissue and blood vessels. The muscular layer is peripheral to the submucosa, consisting of smooth muscle fibers arranged in an internal circular layer and external longitudinal one. Between the two muscular layers there are small quantities of connective tissue containing blood vessels, lymphatic vessels and a myenteric plexus. Externally there is a serosa layer. Immunoreactive cells to anti-serotonin and anti-insulin are found in the epithelium of the two parts of the organ. Immunoreactivity to anti-somatostatin is restricted to the epithelium of the anterior intestine. This study provides data on the digestive physiology of *Phrynops geoffroanus*, enabling comparison with other species for a better understanding of evolutionary aspects of species.

Keywords: *Reptiles, histochemistry, mucins, endocrine cells.*

1 INTRODUÇÃO

Phrynops geoffroanus SCHWEIGGER, 1812, integrante da classe Reptilia, ordem Testudines, família Chelidae, vulgarmente denominado “Cágado de Barbicha”, é um cágado sul-americano, de pequeno porte, com a maior distribuição geográfica, incidindo desde a Amazônia Colombiana até a região sul do Brasil, Uruguai e norte da Argentina (PRITCHARD & TREBBAU, 1984; ERNST & BARBOUR, 1989). Possui hábito onívoro, ingerindo sementes, frutos, peixes e insetos (MENDEN, 1960; ERNST & BARBOUR, 1989; FACHÍN-TERÁN *et al.*, 1995), porém em cativeiro a dieta é preferencialmente carnívora (MOLINA, 1991).

Informações sobre a biologia alimentar (MEDEN, 1960; FACHÍN-TERÁN *et al.*, 1995; DIAZ & SOUZA, 2005), comportamental e reprodutiva (MEDEN, 1960) da espécie em ambiente natural ou em criadouros (MOLINA, 1991; MOLINA, 1996) já foram documentadas. Mas nada que trate da anatomia microscópica do tubo digestivo (TD) do animal foi investigado. Estudos destacam a importância de se conhecer a morfologia do TD, devido à variabilidade da atividade digestiva (NICKEL *et al.*, 1973), e o modo de vida (BICCA *et al.*, 2006), manifestos por adaptações e modificações no sistema digestório (ANGELESCU & GNERI, 1949). Tais conhecimentos dão suporte ao manejo das espécies, atividades de repovoamento, aprimorando assim o condicionamento dos ecossistemas (CASTRO *et al.*, 2003). A utilização de répteis para estudos sobre a fisiologia digestiva tem sido sugerida por representarem um modelo biológico com respostas melhores à alimentação que a de outros animais comumente utilizados, tais como camundongos, ratos, coelhos e suínos (SECOR & DI-AMOND, 1998).

Dos segmentos do TD, destacam-se os intestinos, por sediarem a maior parte da digestão e a absorção dos produtos finais do processo digestivo, sendo, a ocorrência do desdobramento dos alimentos vista no lúmen do órgão sob a influência de enzimas digestivas (CUNNINGHAM, 2004). Informações sobre aspectos morfológicos intestinais fornecem dados para pesquisas com enfoque fisiológico e nutricional, almejando melhorar a dieta alimentar dos animais (GONZÁLEZ-JIMÉNEZ, 1977). As variedades observadas na morfologia dos intestinos são vistas como consequência da qualidade alimentar e das necessidades energéticas (GROSS *et al.*, 1985). Vários estudos desenvolvidos tratam desta variabilidade na morfologia intestinal em répteis, não só quando se considera o relevo interno (JACOBSSHANGEN, 1937) como também os aspectos histológicos (BAECKER, 1934; MORI, 1935; GABE & SAINT-GIRONS, 1972; PARSONS & CAMERON, 1977), sendo a maioria referente a intestinos de serpentes e lagartos.

Dispersas em meio à mucosa do TD dos vertebrados existe um conjunto de células oriundas do Sistema Neuroendócrino (SND), evidenciadas por técnica imuno-histoquímica, encarregadas de sintetizar diferentes qualidades de hormônios digestivos com papel importante na função fisiológica dos intestinos (BELL, 1979). A distribuição e a frequência relativa destas células variam de espécie para espécie de acordo com o hábito alimentar (SOLCIA *et al.*, 1975; ANDREOZZI *et al.*, 1997). As buscas por células endócrinas no TD tem sido importante para estudos filogenéticos (D’ESTE & RENDA, 1995).

O objetivo do presente trabalho foi analisar a histologia, a histoquímica e a imuno-histoquímica do intestino de *P. geoffroanus*, apurando a produção hormonal de serotonina (5-HT), gastrina (GAS), somatostatina (SOM), glucagon (GLUC), insulina (INS) e polipeptídeo pancreático (PP) ao longo do tubo digestivo, de modo a colaborar com estudos futuros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Processamento dos Tecidos

No Laboratório de Histologia e Embriologia da UFRRJ, o intestino dos quatro espécimes de *P. geoffroanus* foi clivado em fragmentos seriados transversais e longitudinais (Figura 44). Posteriormente, estes foram processados por técnica histológica de rotina: desidratação (em uma série de concentrações crescentes de etanol de 70° GL a 100° GL), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em Histosec (Merck, Darmstadt, Germany) para obtenção de cortes histológicos de 5 µm espessura em micrótomo. As lâminas com os fragmentos foram coradas pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE), para análise da arquitetura tecidual e Tricrômico de Gomori (TG), para visualização diferencial do tecido conjuntivo e de fibras colágenas. Para identificação de células mucossecretoras foi realizado o estudo histoquímico através dos métodos Ácido periódico de Schiff (PAS - Mc Manus, 1948 / glicoproteínas com diol vicinal oxidável e/ou glicogênio) e do Alcian Blue (AB - Lev e Spicer, 1964) com pH 0.4 (glicoproteínas altamente sulfatadas) e com pH 2.5 (glicoproteínas com grupos carboxila - ácido siálico e ácido urônico - e/ou com ésteres sulfatados) para evidenciação de glicosaminoglicanas (GAG's) neutras e ácidas, respectivamente.

2.2 Imuno-histoquímica

Lâminas tratadas com poli-L-lisina 0.1% (Sigma Aldrich, Inc.) foram utilizadas para o processamento imuno-histoquímico dos fragmentos intestinais. Os cortes foram desparafinados e hidratados segundo o protocolo de rotina. Por meio de incubação em tampão citrato (pH6,0 - 0,01M) e aquecimento no forno microondas por 15 minutos, foi feita a recuperação antigênica dos tecidos. Posteriormente, bloqueou-se a enzima peroxidase endógena pela incubação em uma solução de H₂O₂ a 3% em metanol durante 15 minutos. Feito o bloqueio, as lâminas foram armazenadas em câmara úmida a temperatura ambiente e tratadas com soro normal por 30 minutos. Em seguida, incubou-se as seções por 1 hora com anticorpos primários anti-hormônios gastrintestinais (Tabela 2). Depois foram tratadas com anticorpo biotilado “universal” secundário diluído a 1:200 durante 30 minutos, logo após com complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC), diluído a 1:200, durante 30 min (ambos da PK 6200, Vector Laboratories, Inc., EUA). A revelação foi feita por reação com DAB/Plus (K 047, Diagnostic Biosystems, Inc., EUA). Todas as diluições foram feitas com um diluente específico (Antibory Diluent - Spring Bioscience ADS-125) e para as lavagens entre fases utilizou-se tampão PBS (pH 7,4). Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris e após desidratação em álcool e diafanização em xilol, as lâminas foram montadas com laminula e Entellan (Merck). Para garantir a especificidade das reações, controles positivos e negativos foram utilizados. Por substituição do anticorpo primário por soro não imune os controles negativos foram definidos. Para os controles positivos foram utilizados cortes dos tipos de tecidos indicados no datasheet de cada anticorpo (Anexo B).

3 RESULTADOS

3.1 Histologia e Histoquímica

A parede do intestino de *P. geoffroanus*, semelhante à constituição vista em outros vertebrados, é formada por quatro camadas concêntricas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. Iniciando a caracterização das camadas intestinais, a mucosa é revestida por epitélio simples cilíndrico com borda estriada e células caliciformes (Figuras 31 e 32), o qual submetido aos protocolos histoquímicos do PAS e do AB (pH 0.4 e pH 2.5), apresentam positividade, indicando a presença de GAG's neutras e ácidas: altamente sulfatadas e carboxiladas, respectivamente (Figuras 33, 34, 35 e 36). O tipo celular predominante é o enterócito ou célula de absorção, células altas, prismáticas, com citoplasma acidófilo e núcleo basófilo situado próximo à base da célula com eucromatina e nucléolo evidente e especialização apical de membrana evidenciada pela borda estriada. Outra célula que também compõe o epitélio é a célula caliciforme, assim denominada por lembrar a forma de um cálice, possuindo núcleo deslocado para a porção basal e citoplasma apical pouco acidófilo onde é observada secreção celular.

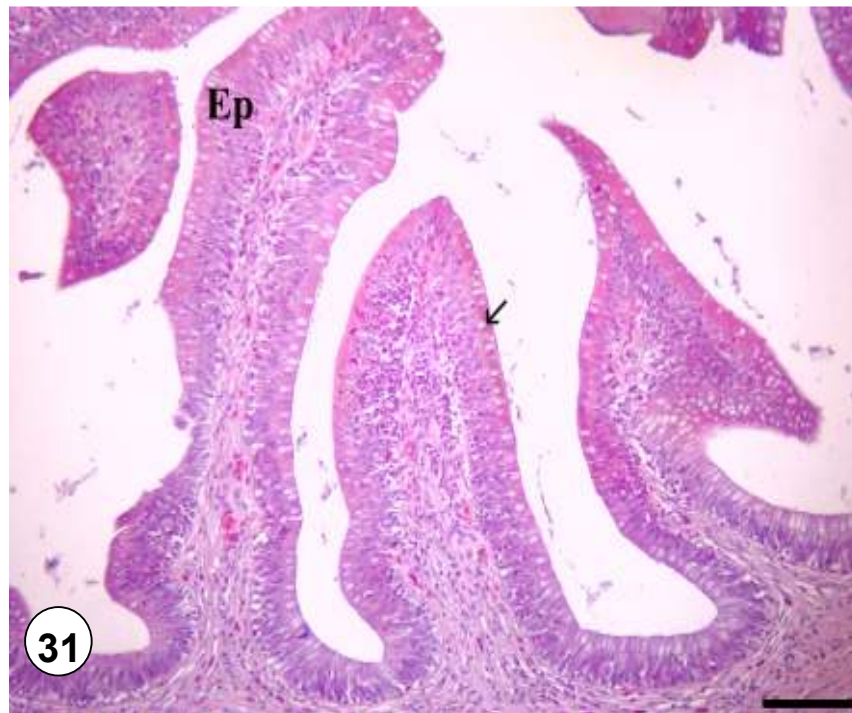


Figura 31: Fotomicrografia do **intestino** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Porção anterior - Visão geral do intestino anterior, mostrando a organização das vilosidades. Detalhe do epitélio simples cilíndrico (Ep) com borda estriada e células caliciformes (seta). HE. Barra = 100 μ m.



Figura 32: Fotomicrografia do **intestino** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Porção posterior (corte transversal) - Espessamento do epitélio causado pelo elevado número de células caliciformes (seta). Camada mucosa (M), junto com a submucosa (sm) e a camada muscular da mucosa (*), formando grandes pregas longitudinais. HE. Barra = 100 μ m.

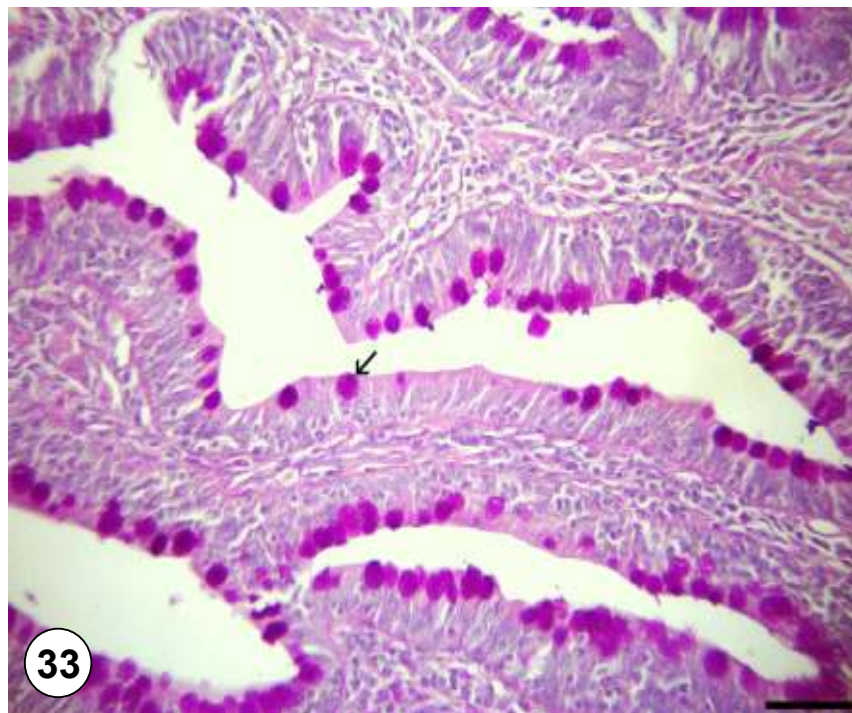


Figura 33: Fotomicrografia do **intestino** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Porção anterior - Presença de GAG's neutras (seta). PAS. Barra = 50 μ m.

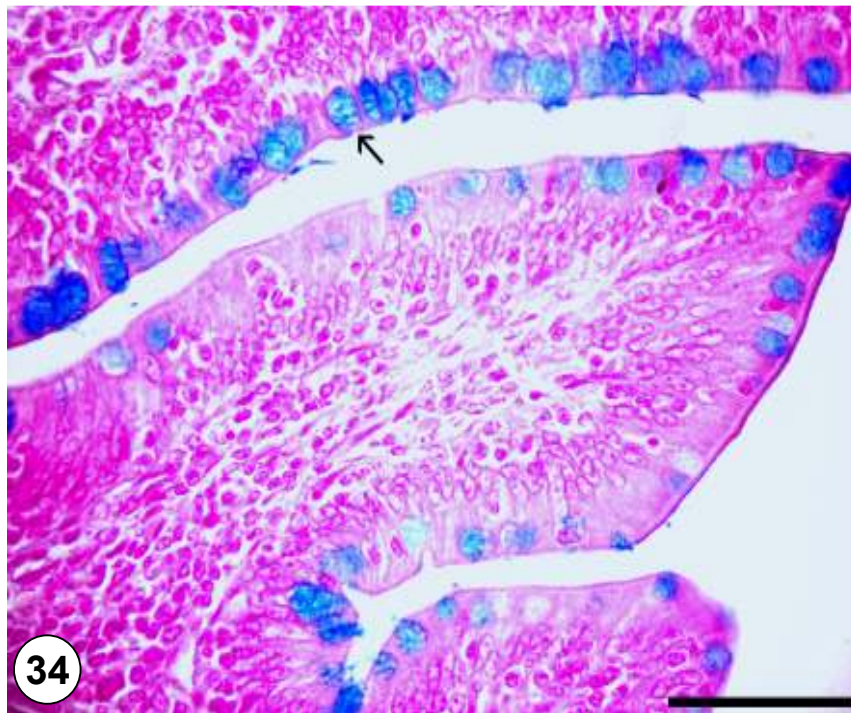


Figura 34: Fotomicrografia do **intestino** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Presenças de GAG's ácidas (seta). AB. Barra = 50 μ m.

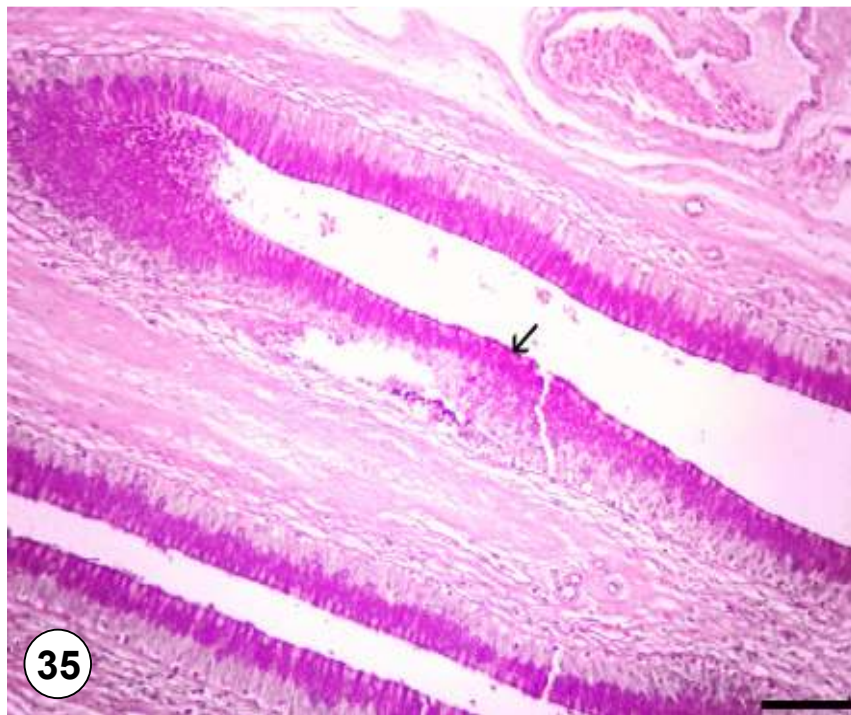


Figura 35: Fotomicrografia do **intestino** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Porção posterior - Presença de GAG's neutras (seta). PAS. Barra = 100 μ m.

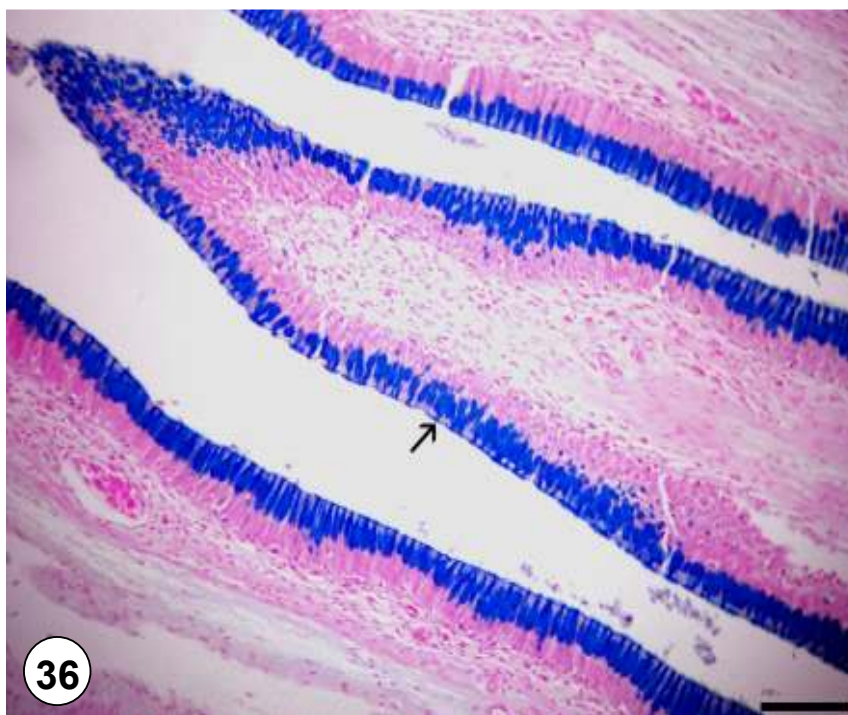


Figura 36: Fotomicrografia do **intestino** de *P. geoffroanus* (corte longitudinal). Presença de GAG's ácidas (seta). AB. Barra = 100 μ m.

A camada mucosa é a responsável pela divisão do intestino desta espécie em duas regiões: intestino anterior e intestino posterior (Figura 45). Uma das características divergentes que permite a divisão das regiões é o número de células caliciformes presentes no epitélio que se mostrou mais abundante na porção posterior quando comparada a porção anterior (Figuras 31 e 32).

Os cortes em série do intestino anterior demonstram um padrão alternado de vilosidades (Figura 37). São visualizadas vilosidades digitiformes altas, perpendiculares à luz do órgão, que por vezes anastomosam-se (Figura 31). Em contra partida observam-se também vilosidades delgadas, longas, em forma de folha, as quais tornam reduzida a luz do órgão (Figura 38). A altura, frequência e tamanho das vilosidades diminuem à medida que se aproximam da cloaca, tornando-se pregas baixas e espaçadas no intestino posterior (Figura 32).

Outra distinção das regiões do intestino está relacionada com o comportamento da muscular da mucosa, a qual é formada por feixes de fibras musculares lisas, separando a lâmina própria da submucosa, ambas formadas por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e linfáticos. Na região anterior esta se localiza na base dos dobramentos intestinais, compostos apenas por epitélio e a lâmina própria, o que caracteriza como vilosidade (Figura 31). Na região posterior a muscular da mucosa acompanha a lâmina própria e a submucosa para dentro do dobramento, caracterizando a estrutura como prega (Figura 32). A camada submucosa é constituída de tecido conjuntivo frouxo com capilares sanguíneos e vasos linfáticos, tornando-se mais espessa ao se aproximar da cloaca. Nenhum indício de glândulas de Lieberkuhn na lâmina própria ou glândulas de Brunner na submucosa é identificado. Observa-se a presença de infiltrado linfocitário disperso nesta camada.

Na camada muscular de ambos os segmentos do intestino são vistos feixes de fibras musculares que correm em sentido circular na parte interna e longitudinal na parte externa,

sendo, no entanto, o estrato circular mais desenvolvido (Figuras 38 e 39). Entre estas subcamadas observam-se tecido conjuntivo frouxo escasso, e nele plexos mioentéricos dispersos aleatoriamente na forma de aglomerados, vasos sanguíneos e (Figura 40). Adjacente a esta camada encontra-se a serosa, que envolve externamente o órgão, constituída de tecido conjuntivo frouxo, revestido por epitélio simples pavimentoso que repousa sobre uma membrana basal, formando o mesotélio.

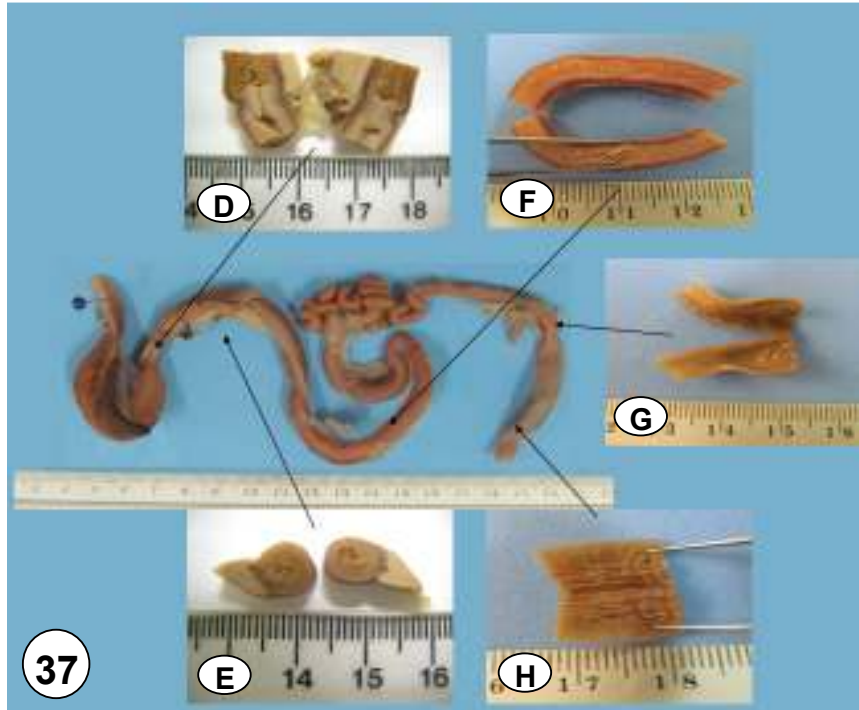


Figura 37: Morfologia geral do tubo digestivo de *P. geoffroanus*. Superfície interna: **(D)** Transição Estômago-Intestino **(E)** Intestino anterior com vilosidades digitiformes **(F)** Intestino anterior com vilosidades em forma de folha **(G)** Transição Intestino anterior-posterior **(H)** Intestino posterior.



Figura 38: Fotomicrografia do **intestino** de *P. geoffroanus* (corte transversal). Porção anterior - Camada muscular de fibras musculares lisas, composta por uma subcamada interna circular (ic) e a externa longitudinal (el). HE. Barra = 100 μ m.

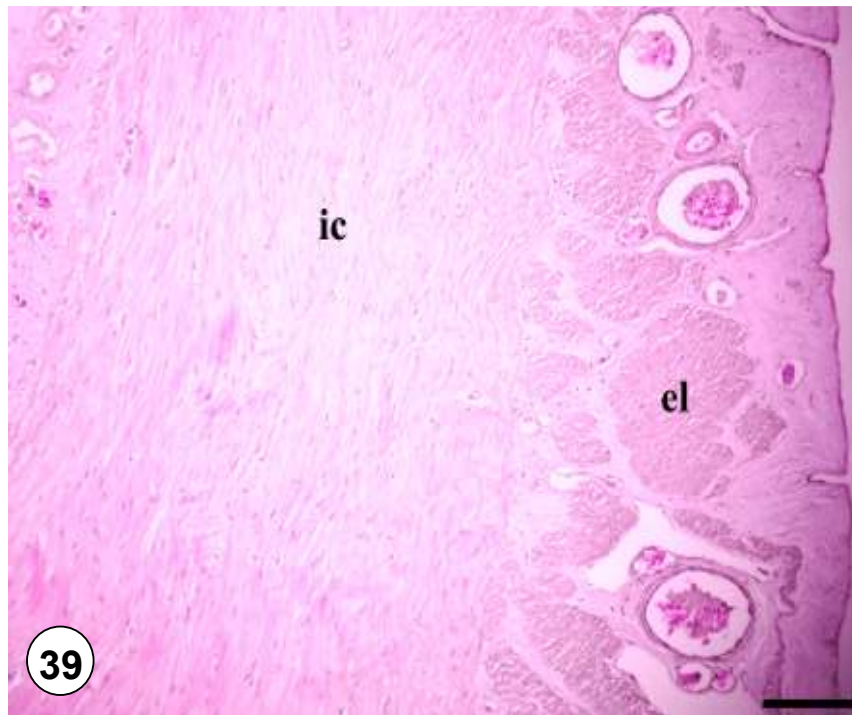


Figura 39: Fotomicrografia do **intestino** de *P. geoffroanus* (corte transversal). Porção posterior - Organização da camada muscular, circular interna (ic) e longitudinal externa (el). HE. Barra = 100 μ m.

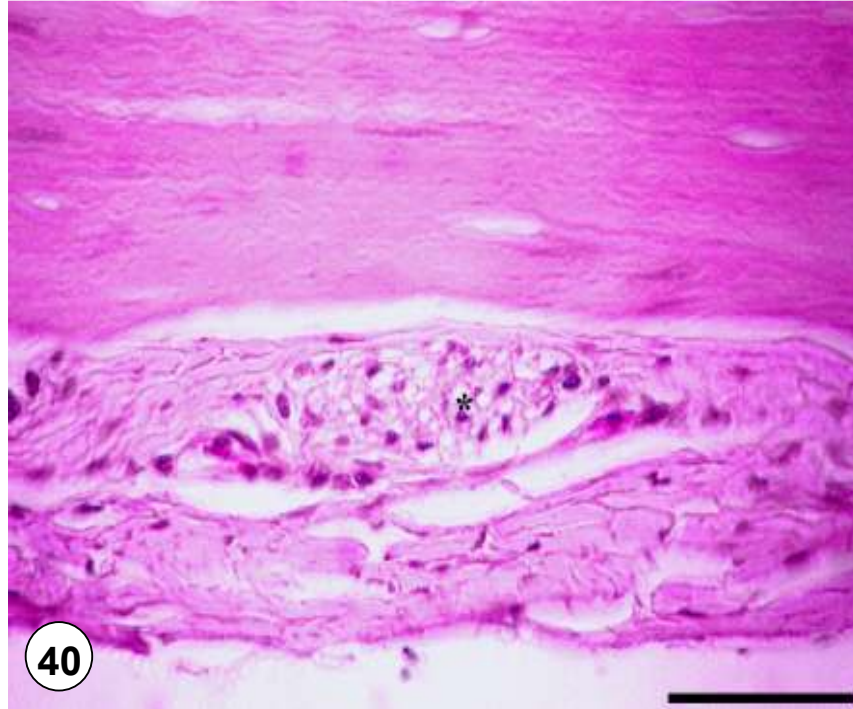


Figura 40: Fotomicrografia do **intestino** de *P. geoffroanus* (corte transversal). Porção posterior - Plexo mioentérico. HE. Barra = 50 μ m.

3.2 Imuno-histoquímica

Observam-se células imunorreativas (IR) a três dos anticorpos utilizados: 5-HT, SOM, e INS, ao longo do intestino de *P. geoffroanus*. A distribuição e a frequência relativa destas células variaram dentro das regiões do órgão (Tabela 4).

3.2.1 Serotonina (5-HT)

Ambas as regiões do intestino apresentam células IR ao anticorpo anti-5-HT (Figuras 41 e 42). Morfologicamente as células observadas são separadas em dois grupos: células do “tipo aberto”, marcada pela presença de um prolongamento citoplasmático comunicante com o lúmen do órgão; e células do “tipo fechado”, ou seja, células arredondadas delimitadas sem comunicação direta com o lúmen do órgão. Ambos os tipos celulares são observados no epitélio intestinal, sendo possível visualizar também algumas marcações entremeadas na lâmina própria, as quais não se pode afirmar que sejam células pertencentes ao SND. A frequência relativa destas células IR é considerada moderada para a porção anterior e baixa para a posterior.

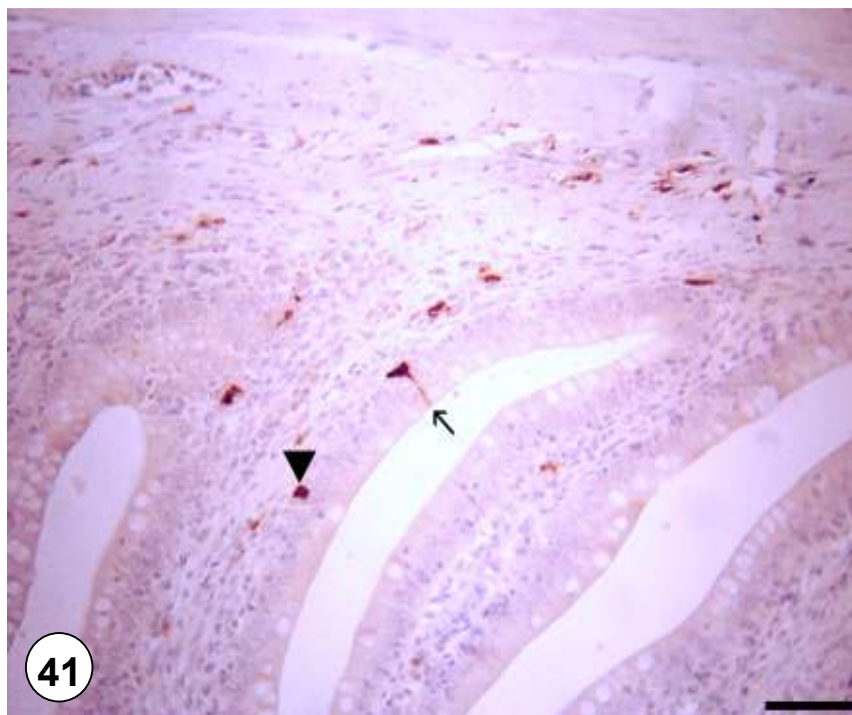


Figura 41: Fotomicrografia de células IR ao anticorpo anti-5-HT na região anterior do intestino de *P. geoffroyanus*. Células IR, dos tipos aberto (seta) e fechado (cabeça de seta), compoendo a camada epitelial do intestino e também entremeada na lâmina própria. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barra 50 μ m.

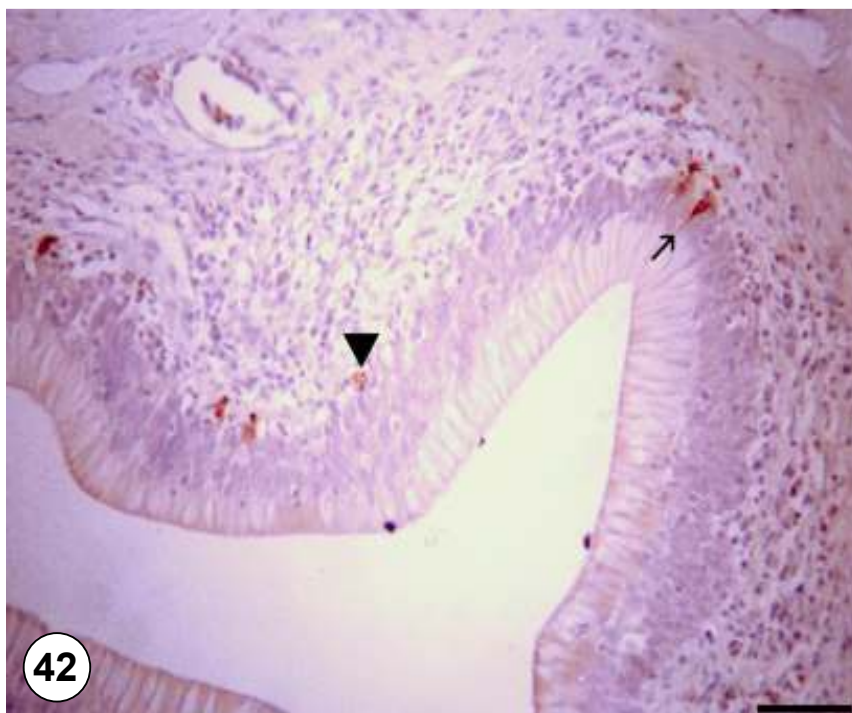


Figura 42: Fotomicrografia de células IR ao anticorpo anti-5-HT na região posterior do intestino de *P. geoffroyanus*. Marcações de ambas as morfologias celulares inseridas no epitélio intestinal: aberto (seta) e fechado (cabeça de seta). Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barra 50 μ m.

3.2.2 Somatostatina (SOM)

Células IR ao anticorpo anti-SOM são visualizadas apenas na porção anterior do intestino da espécie. Semelhante ao observado para a 5-HT, as células produtoras de SOM apresentam dois formatos: células do tipo aberto e do tipo fechado e são observadas entremeadas no epitélio intestinal. A frequência relativa é descrita como baixa.

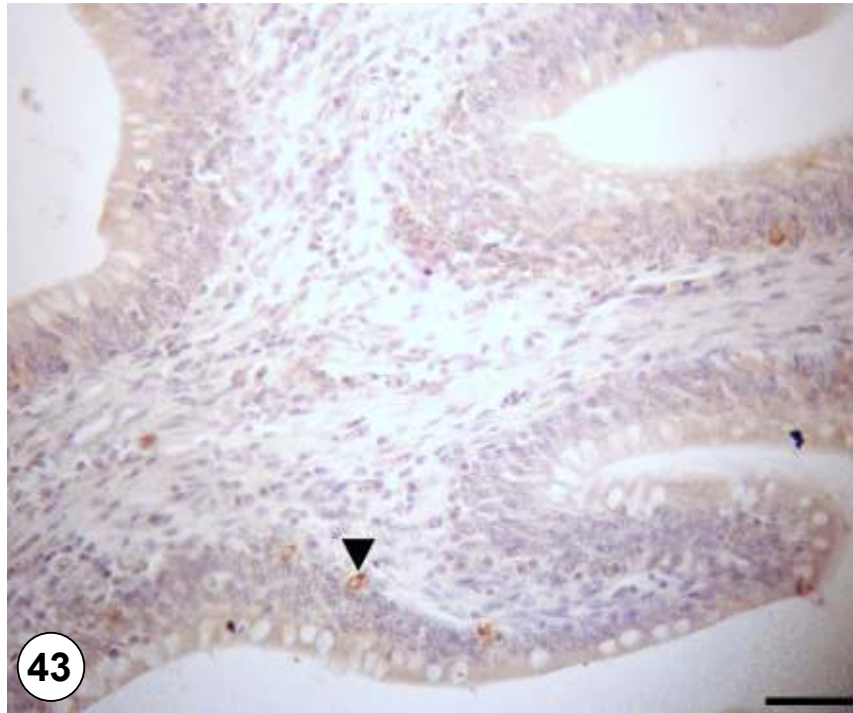
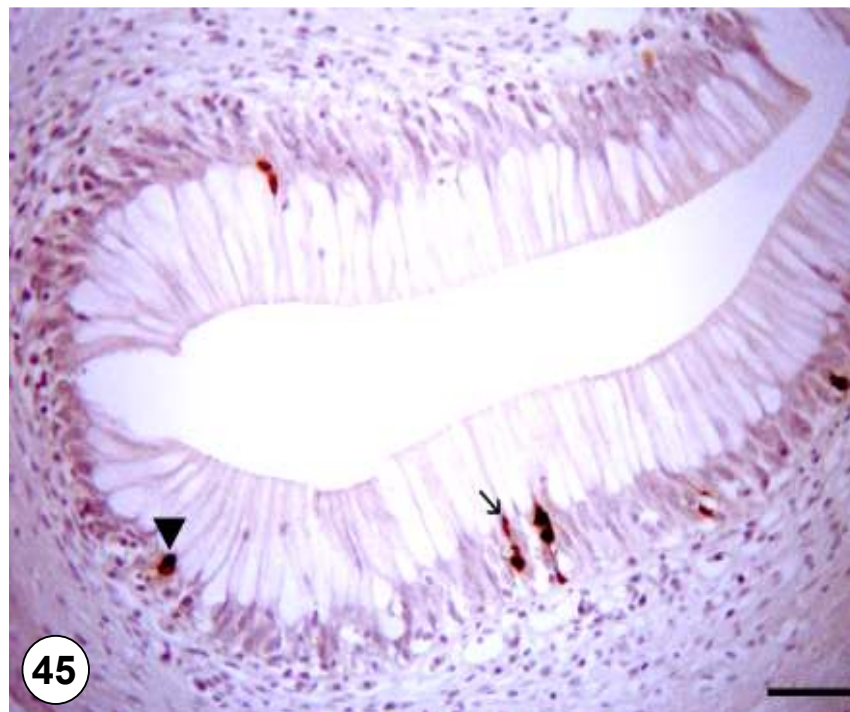
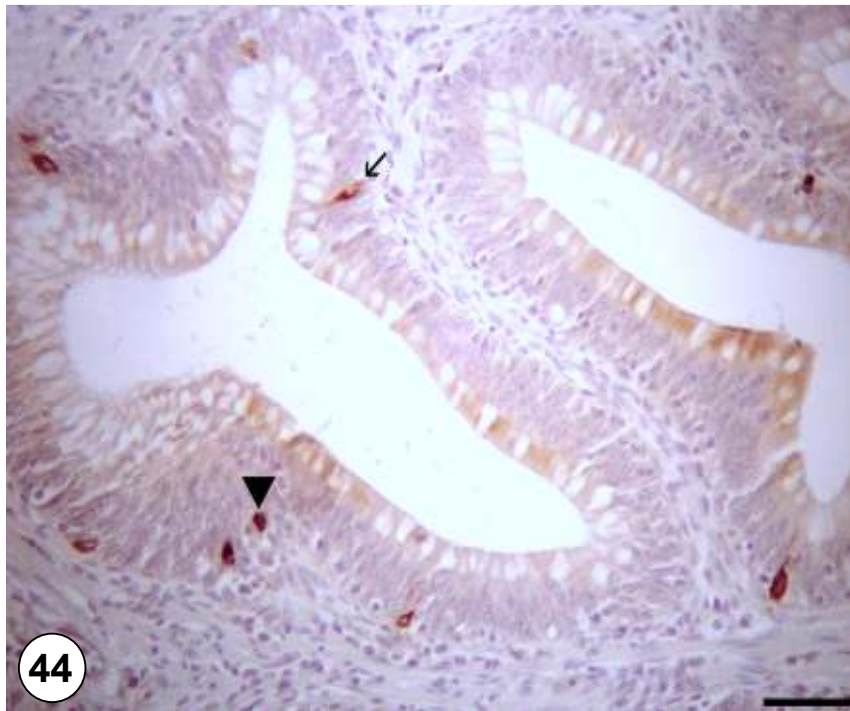


Figura 43: Fotomicrografia de células IR ao anticorpo anti-SOM na região anterior do intestino de *P. geoffroanus*. Células IR compoem a camada epitelial do intestino. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barra 50 μ m.

3.2.3 Insulina (INS)

Ambas as regiões do intestino de *P. geoffroanus* possuem células IR ao anticorpo anti-INS. As células produtoras destes peptídeos possuem os formatos aberto e fechado, e encontram-se inseridas no epitélio de revestimento do órgão. A frequência relativa observada é considerada moderada.



Figuras 44 e 45: Fotomicrografias de células IR ao anticorpo anti-SOM no intestino de *P. geoffroanus*. Intestino anterior – (44) Células IR, dos tipos aberto (seta) e fechado (cabeça de seta), compondo a camada epitelial do intestino. (45) Intestino posterior – células do tipo aberto (seta) e do tipo fechado (cabeça de seta) Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barra 50 µm.

4 DISCUSSÃO

Partindo do lúmen para o exterior, a primeira camada visualizada é a mucosa, composta por um epitélio de revestimento, apoiado em uma lâmina própria, seguida de uma muscular da mucosa. Esta camada apresentou numerosos dobramentos longitudinais no sentido do trânsito da ingesta, variando a forma e a disposição de uma seção para outra, o que permitiu a divisão do intestino desta espécie em duas regiões: um extenso segmento anterior e um curto posterior. Estas dimensões para os intestinos são geralmente encontradas em carnívoros, sendo o intestino posterior mais longo nos herbívoros (STEVENS & HUME, 1998), isso porque os alimentos de origem animal são mais facilmente digeridos do que os de origem vegetal (RICKLEFS, 2003), o que esclarece o hábito alimentar da espécie como sendo um carnívoro oportunista, de acordo com a demanda de alimento (Molina, 1991). Outra característica que corrobora o fato é a ausência de ceco na junção dos intestinos, porção comum em répteis herbívoros e onívoros (ZUG, 2001; PEREIRA, 2000; SMITH *et al.*, 2001).

Na porção anterior do intestino, nota-se um padrão de alternância das vilosidades, ora visualizam-se vilosidades digitiformes altas, que por vezes anastomosam-se; ora observam-se vilosidades foliáceas delgadas, longas, as quais tornam reduzida a luz do órgão. As modificações na morfologia das vilosidades de uma fração para outra é fundamental para controlar a velocidade de percurso do alimento no intestino, uma vez que, aumenta e diminui a luz do órgão, permitindo assim maior aproveitamento de nutrientes importantes, fato que justifica o tempo de trânsito intestinal longo em répteis visualizado por DI BELLO *et al.* (2006). Além disso, denota a ampliação da superfície de absorção (POTER, 1972; ROMER & PARSONS, 1985; LEGLER, 1993; YOUNG & HEATH, 2000; WYNEKEN, 2001), ou seja, regiões com pregueamento complexo possuem maior envolvimento nos processos absorptivos (ANGELESCU & GNERI, 1949). Em quelônios, é função do intestino anterior absorver aminoácidos, carboidratos, açúcares, água, ácidos graxos e sais minerais (WYNEKEN, 2001; LUZ *et al.*, 2003; MACHADO JUNIOR *et al.*, 2005).

A porção posterior do intestino apresenta pregas baixas e espaçadas, característica justificável pela função limitada de reabsorção de água desta fração do órgão (WYNEKEN, 2001; LUZ *et al.*, 2003; MACHADO JUNIOR *et al.*, 2005), não sendo necessário um alto tempo de permanência no mesmo pelo bolo alimentar.

O epitélio de revestimento intestinal visualizado é do tipo simples cilíndrico com borda estriada e células caliciformes, o qual justifica o papel absorptivo dos intestinos. Epitélio similar foi descrito no intestino das cobras *Xenodon merremii* (FERRI, *et al.*, 1976) e *Coluber forulentus* (DEHLAWI & ZAHER, 1989), do lagarto *Varanus niloticus* (AHMED, EL-HAFEZ & ZAYED, 2009), das tartarugas *Podocnemis expansa* (OLIVEIRA *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 1998) e da família Podocnemididae (MAGALHÃES, 2010), do crocodilo-do-Nilo (KOTZÉ *et al.*, 1992) e do *Caiman yacare* (ALEIXO *et al.*, 2011), do avestruz (MONTEIRO *et al.*, 2009), e do roedor *Hydrochoerus hydrochaerise* (FREITAS *et al.*, 2008) e o mesmo é comum a maioria dos vertebrados (JIN *et al.*, 1991; DAVID *et al.*, 1992; BANKS, 1992; GEORGE *et al.*, 1998; PEREIRA, 2000; RODRIGUES, 2005). Em contrapartida, o epitélio intestinal de algumas tartarugas e crocodilos (LUPPA, 1977) demonstraram características de estratificação.

Outra característica divergente entre as regiões refere-se ao número de células caliciformes presentes no epitélio, o qual se apresenta mais abundante na porção posterior se comparada com a porção anterior. Resultado semelhante foi visualizado no anfíbio *Typhlonectis venezuelensis* (MARTÍNEZ-LEONES, 2004) e nos répteis: *P. expansa* (OLIVEIRA *et al.*, 1996) e integrantes da família Podocnemididae (MAGALHÃES, 2010), sendo o inverso encontrado na espécie *Tropidurus peruvianus peruvianus* (PAZ-CASTILLO,

1974). O produto destas células asseguram a lubrificação do tubo e o aprisionamento de partículas a serem eliminadas, viabilizando o deslizamento do bolo alimentar (YOUNGE HEATH, 2000).

Protocolos histoquímicos com PAS e AB (pH 0.4 e pH 2.5) revelaram a produção de glicosaminoglicanas (GAG's) neutras e ácidas, respectivamente, em ambos os intestinos do cágado-de-barbicha. Positividades epiteliais a estes protocolos também foram visualizados no intestino de *V. niloticus* (AHMED *et al.*, 2009), de *Hemidactylus mabouia* (SARTORI, 2009), de *Caiman crocodilus yacare* (JIN, 1991; ALEIXO *et al.*, 2011) e de *Uromastix aegyptiaca* (ZAHER *et al.*, 2012). Estas mucinas são classificadas em neutras e subtipos ácidos: não-sulfatadas (sialomucinas) e sulfatadas (sulfomucinas), de acordo com a composição de seus monossacarídeos. As sulfatadas são consideravelmente mais ácidas que as não-sulfatadas (MYERS *et al.*, 2008). O muco produzido por estas células encarrega-se de resguardar a mucosa contra agressores químicos, físicos e biológicos; facilitar o trânsito dos alimentos; criar um obstáculo que modifica a passagem de solutos pelo epitélio (FILIPE & BRANFOOT, 1976; CARLSTEDT-DUKE, 1987), além de aprisionar partículas (SIBBING & URIBE, 1985).

A lâmina própria e a submucosa mostraram-se aglandulares, condição visualizada na mucosa intestinal de *Vipera aspis* (BEGUIN, 1902), *Mabuya quinquetaeniata* e *Chalcides ocellatus* (ANWAR & MAHMOUD, 1975), *X. merremii* (FERRI, *et al.*, 1976), *Agama Stellio* (AMER & ISMAIL, 1976), *Natrix matrix* e *Vipera berus* (PRZYSTALSKI, 1980), *Acanthodactylus boskianus* (DEHLAWI & ZAHER, 1985a), *Pristurus rupestris* (DEHLAWI & ZAHER, 1985b), *C. forulentus* (DEHLAWI & ZAHER, 1989), Podocnemididae (MAGALHÃES, 2010), *C. yacare* (ALEIXO *et al.*, 2011) e *U. aegyptiaca* (ZAHER *et al.*, 2012). Glândulas intestinais são identificadas pela invaginação do epitélio na lâmina própria (Banks, 1992), padrão nítido no lagarto *Uromastix philipyi* (FARAG, 1982), em crocodilianos (TORO, 1930; KOTZÉ *et al.*, 1992), e na tartaruga verde (MAGALHÃES *et al.*, 2010), comum também em aves (BACHA JR & BACHA 2003, MONTEIRO *et al.*, 2009), no mamífero *H. hydrochaerise* (FREITAS *et al.*, 2008) e em animais domésticos (BANKS, 1992; BACHA JR & BACHA, 2003).

A muscular da mucosa está presente nas duas porções do intestino composta por uma única subcamada em sentido circular. Esta também foi descrita no intestino das espécies *C. forulentus* (DEHLAWI & ZAHER, 1989) e *Chelonia myda*, sendo que nesta as fibras musculares dispõem-se longitudinalmente (MAGALHÃES, 2010). Já o crocodilo *C. crocodilus yacare* (JIN, 1991) e a lagartixa *H. mabouia* (SARTORI, 2009) apresentam mais de uma subcamada compondo a muscular da mucosa em pelo menos uma das porções do intestino. Vale ressaltar que para *P. geoffroanus*, na fração posterior do intestino esta musculatura ajuda na formação das pregas longitudinais, o que garante a mobilidade das pregas, auxiliando no peristaltismo para eliminação dos resíduos alimentares, este mesmo recurso foi visualizado nas vilosidades do duodeno de *C. yacare* (ALEIXO *et al.*, 2011).

A camada muscular própria de *P. geoffroanus* exhibe duas regiões musculares lisas; a circular interna e a longitudinal externa, padrão este já descrito anteriormente por PARSONS & CAMERON (1977). A mesma impressão é encontrada nos répteis *C. forulentus* (DEHLAWI & ZAHER, 1989), *T. peruvianus peruvianus* (PAZ-CASTILLO, 1974), *H. mabouia* (SARTORI, 2009) e *C. myda* (MAGALHÃES, 2010). É função desta camada é dar mobilidade ao órgão, proporcionando a mistura e o transporte dos alimentos com as secreções digestivas (SILVA, 2004). Outro fator intrínseco que também garante a motilidade intestinal são os plexos mientéricos, ou seja, gânglios de tecido nervoso localizados entre as subcamadas de tecido muscular do intestino, presente aleatoriamente ao longo de todo o órgão. Assim como em *P. geoffroanus* este tecido também foi descrito em *H. mabouia* (SARTORI, 2009).

Os resultados imuno-histoquímicos comprovaram a existência de células imunorreativas aos três anticorpos utilizados: serotonina (5-HT) somatostatina (SOM) e gastrina (GAS), no intestino de *P. geoffroanus*. Ocorrendo células ditas do “tipo aberto” e do “tipo fechado”. Acredita-se que as primeiras detectem mudanças no pH ou na composição do conteúdo do lúmen, enquanto que as segundas respondem à distensão ou a fatores neuroendócrinos (FUJITA & KOBAYASHI, 1977).

De acordo com novos estudos, o sistema neuroendócrino gastro-entero-pancreático difuso representa a segunda maior fonte de 5-HT (TRANDABURU & TRANDABURU, 2007). Acredita-se que a existência de células produtoras de 5-HT é um caráter evolutivo, pelo fato de todos os vertebrados possuírem células produtoras deste hormônio ao longo do TD (EL-SALHY *et al.*, 1985). Estas já foram descritas em: peixe (LEE *et al.*, 2004b), anfíbio (PELLI-MARTINS *et al.*, 2011), réptil (PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989; BURRELL *et al.*, 1991; LEE *et al.*, 1999; KU *et al.*, 2001; HUANG & WU, 2005; MACHADO-SANTOS *et al.*, 2011), ave (YAMANAKA *et al.*, 1989; MENDES *et al.*, 2009) e mamífero (AGUNGPRIYONO *et al.*, 2000; KARADAĞ SARI *et al.*, 2007; MACHADO-SANTOS *et al.*, 2009, ADNYANE *et al.*, 2011). Este peptídeo é eliminado mediante a acidificação ou aumento da pressão intraluminal, instilação de glicose hipertônica ou solução de sacarose, estimulação vagal, obstrução mecânica do intestino e isquemia intestinal (LI *et al.*, 2000). A 5-HT atua induzindo a contração muscular do TD e impulsionando a secreção exócrina (CECCARELLI *et al.*, 1995), estimulando os plexos mioentéricos a causar respostas vasodilatadoras na submucosa (VANNER, 2000). Na espécie em estudo, as células endócrinas produtoras de 5-HT são visualizadas em ambos os intestino.

A síntese de SOM, em *P. geoffroanus*, restringiu-se a porção anterior do intestino. Este mesmo peptídeo já foi encontrado no intestino dos répteis *Anolis carolinensis* (SEINO *et al.*, 1979), *Alligator mississippiensis* (BUCHAN *et al.*, 1983), *Caiman latirostris* (YAMADA *et al.*, 1987), *C. tatirostris* (YAMADA *et al.*, 1987), *Egernia kingii* (ARENA *et al.*, 1990), *Podarcis hispânica* (BURRELL *et al.*, 1991), *Alligator sinensis* (WU *et al.*, 1999) *Trachemys scripta elegans* (KU *et al.*, 2001), *Trimeresurus stejnegeri* (ZHANG *et al.*, 2001), *Trionyx sinensis* (LIN *et al.*, 2001), e *Wistor albino* (KARADAĞ SARI *et al.*, 2007), não aparecendo nas espécies *S. indicus* e *E. elegans* (HUANG & WU, 2005). Sendo a porção anterior do intestino destes animais a mais ocupada por células produtoras de SOM. A secreção deste hormônio no TD é motivada pela acidez do estômago, pela permanência de glicose, aminoácidos e gorduras no intestino, por ação do sistema nervoso autônomo, e por outros hormônios: colecistoquinina e glucagon pancreático (ALLEN, 1987; DICKSON, 1996). A função preponderante neste sistema é o de obstruir a excreção de outros hormônios tais como: gastrina, colecistoquinina, glucagon, insulina, secretina, motilina, peptídeo inibidor gástrico (GIP), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), substância P, polipeptídeo pancreático (PP) e enteroglucagon (TWEDT, 1987; KONG *et al.*, 2002). Também bloqueia a liberação de ácido gástrico, a motilidade do estômago e intestino, a função exócrina do pâncreas, a contração da vesícula biliar e a assimilação de nutrientes (GANONG, 1998; BRAZEAU *et al.*, 1973).

O último mensageiro químico investigado é a INS. Entende-se que a produção de insulina nos vertebrados seja responsabilidade do pâncreas endócrino, exceto no caso de algumas espécies de peixes que células positivas à insulina são visualizadas no intestino (FALKMER, 1993). Durante a evolução dos vertebrados, células endócrinas produtoras de insulina deixaram o intestino para darem origem a um órgão separado (FALKMER *et al.*, 1977). Mas esta migração não parece ser perfeita em alguns répteis (PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989). Assim como em *P. geoffroanus*, a presença de células endócrinas produtoras de insulina no epitélio de revestimento do intestino já foi descrita para outras espécies de quelônios: *Chrysemys picta* (GAPP *et al.*, 1985), *T. graeca* (PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989), *Pseudemys scripta scripta*, *P. scripta elegans*, *P. floridana*, *Sternotherus odoratus* e *Trionyx*

spinifer asper (GAPP & POLAK, 1990), *Chrysemys dorbigni* e *Phrynos hilarii* (MUNIZ *et al.*, 1991) e *M. caspica* (PEREZ-TOMAS, *et al.*, 1989; TARAKÇI *et al.*, 2005). *Takydromus wolteri*, uma espécie de lagarto, também apresentou células IR nas porções do duodeno e intestino delgado (LEE & KU, 2004a). A produção de insulina por células epiteliais do intestino de quelônios pode representar um carácter derivado secundário ou a retenção de um carácter plesiomórfico identificado apenas em protochordates (REINECKE, 1981), larvas ciclóstomos (VAN NOORDEN & PEARSE, 1974), e alguns tubarões (EL-SAHLY, 1984). Estudos revelaram que as moléculas de insulina produzidas pelos répteis são as mais parecidas com a insulina das aves que a produzida por mamíferos, o que é compatível com a relação evolutiva entre aves e répteis (EPPLÉ & BRINN, 1987). Mas os efeitos da insulina na fisiologia do intestino ainda não foram determinados. Acredita-se que a insulina intestinal atue como um hormônio trófico (CHOPRA *et al.*, 1987), ou seja, aja sobre outras células endócrinas, regulando a secreção de outros hormônios. Os controles de produção deste hormônio também são obscuros. É possível que as concentrações de glicose e aminoácidos na circulação após a ingestão de alimento desencadeiem a secreção de insulina intestinal, assim como ocorre para a insulina pancreática.

Em conclusão, os estudos histológico e histoquímico do intestino de *P. geoffroanus* revelam uma adaptação para o hábito alimentar carnívoro, ou seja, intestino curto, ausência de ceco, produção de mucossecções ao longo do TD, não possuindo nenhuma especialização para digestão de matéria orgânica vegetal, o que caracteriza a espécie como sendo onívora oportunista. Os dados imuno-histoquímicos mostram que o intestino desta espécie dentre outros hormônios, produz insulina, padrão atípico em vertebrados, mas semelhante a outras espécies de quelônios. Este trabalho visa colaborar com informações sobre a fisiologia digestiva da espécie investigada, podendo servir de base para estudos com outras espécies de cágados, tendo em vista a carência de estudos com esta vertente. Além disso, permitirá análises comparativas dentro do grupo, fornecendo subsídios para estudos evolutivos futuros.

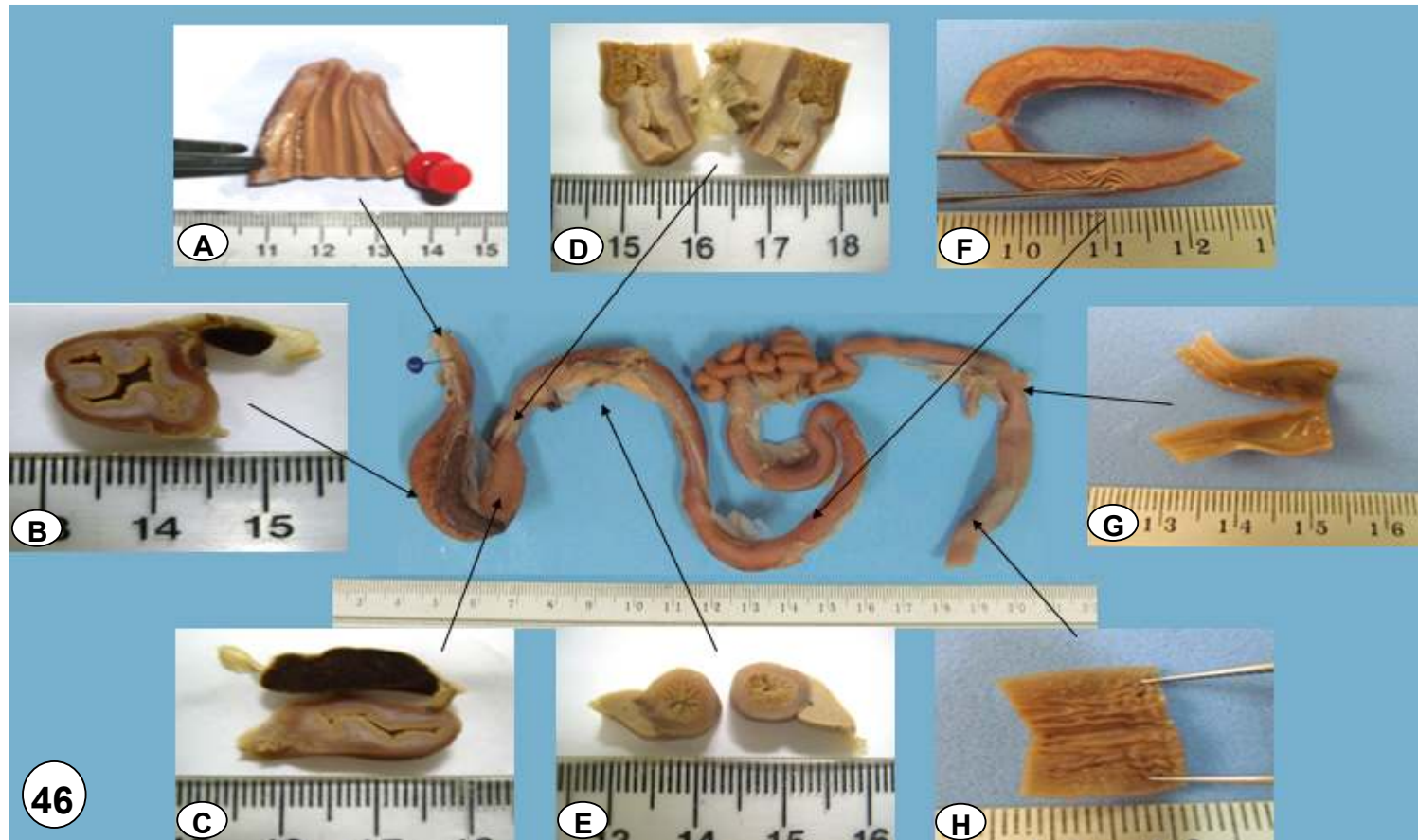


Figura 46: Morfologia geral do tubo digestivo de *P. geoffroanus*. Superfície interna: (A) Esôfago e Estômago anterior (B) Estômago Médio (C) Estômago posterior (D) Transição Estômago-Intestino (E) Intestino anterior com vilosidades digitiformes (F) Intestino anterior com vilosidades em forma de folha (G) Transição Intestino anterior-posterior (H) Intestino posterior.

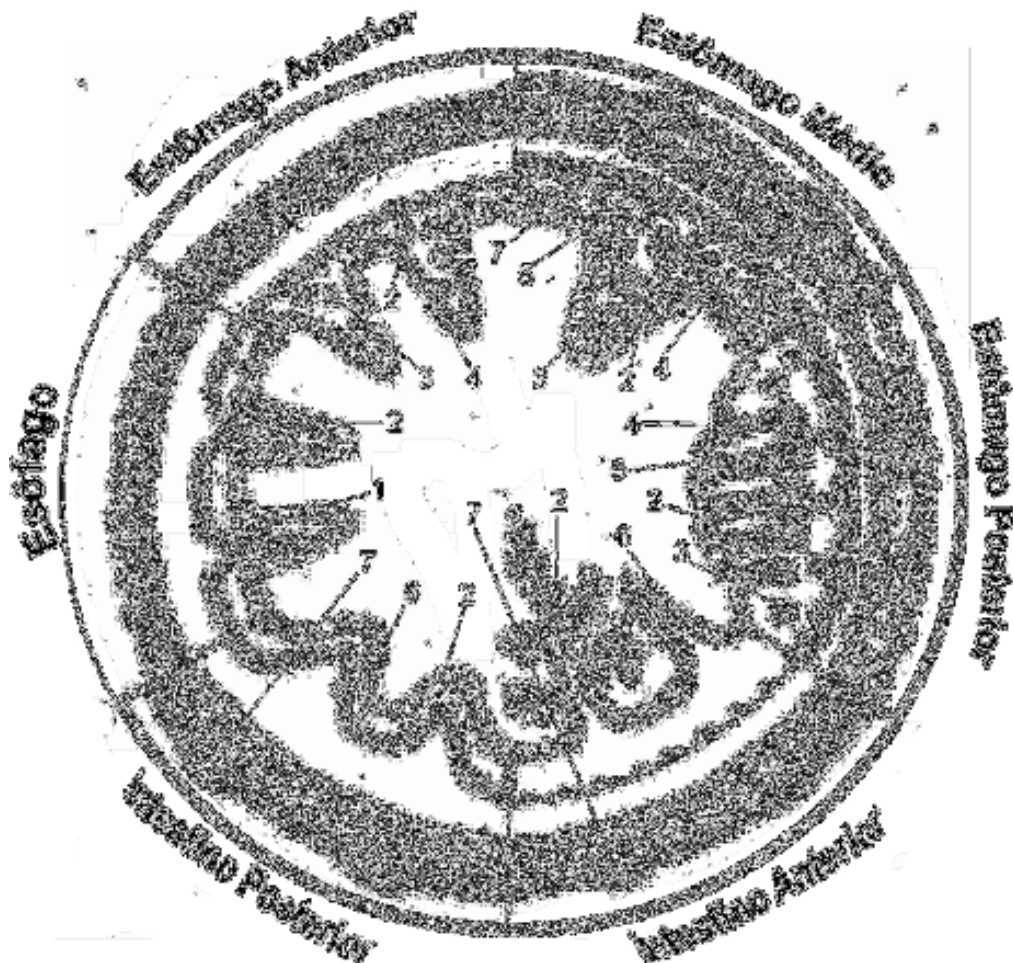


Figura 47: Histologia geral do tubo digestivo de *P. geoffroanus*. (1) Glândulas intraepiteliais do esôfago. (2) Células endócrinas. (3) Glândulas gástricas. (4) Fossetas gástricas. (5) Células oxinticopépticas. (6) Células caliciformes. (7) Plexo mioentérico.

Tabela 4: Frequência relativa e valores médios (\pm DP) de células endócrinas imunorreativas por mm^2 da mucosa dos segmentos TD de *P. Geoffroanus*.

	Esôfago	Estômago anterior	Estômago médio	Estômago posterior	Intestino anterior	Intestino posterior
5-HT	0,27 \pm 0,58 +	1,73 \pm 1,2 ++	3,93 \pm 2,45 +++	4,50 \pm 2,94 +++	2,73 \pm 2,95 ++	1,03 \pm 0,89 +
GAS	-	-	-	-	-	-
SOM	-	-	2,87 \pm 3,28 ++	1,87 \pm 1,81 ++	0,70 \pm 0,91 +	-
GLUC	-	-	-	-	-	-
INS	-	-	0,5 \pm 0,86 +	2,3 \pm 2,6 ++	1,36 \pm 1,27 +	1 \pm 1,11 +
PP	-	-	-	-	-	-

Intensidade de imunorreação: (-) ausente; (+) baixa; (++) moderada; (+++) alta.

CONCLUSÃO GERAL

- A morfologia do TD de *P. geoffroanus* revela padrões de hábito alimentar carnívoro, ou seja, esôfago e estômago tubulares, simples, apresentando glândulas, ambos com mucosa bem pregueada; intestino curto, com alternâncias de vilosidades e pregas que garantem aumento do tempo de trânsito intestinal; ausência de ceco, não possuindo nenhuma câmara fermentativa especializada, dirigida à digestão de matéria orgânica vegetal.
- Os estudos histológico e histoquímico demonstram produção de mucossecções ácidas e básicas ao longo do TD da espécie, corroborando, o que caracteriza a espécie como sendo onívora oportunista, já que seu TD demonstrou-se especializado para digestão de matéria orgânica animal.
- O estudo imuno-histoquímico revelou a presença, a distribuição e a frequência relativa de células endócrinas produtoras de 5-HT, SOM e INS nos segmentos do TD deste cágado. Estes peptídeos são normalmente encontrados no TD de vertebrados, exceto a insulina, que nos vertebrados foi descrita apenas em alguns quelônios.
- Os estudos vão ajudar no entendimento da fisiologia digestiva da espécie investigada e fornecer dados histológicos a serem utilizados como referência à compreensão de alterações histopatológicas que possam afetar o sistema digestório de quelônios, facilitando o manejo das espécies. Além disso, permitirá análises comparativas dentro do grupo, fornecendo subsídios para estudos evolutivos futuros.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADNYANE, I. K. M.; ZUKI, A. B.; NOORDIN, M. M. & AGUNGPRIYONO, S. Immunohistochemical study of endocrine cell in the gastrointestinal tract of the barking deer, *Muntiacus muntjak*. **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine**, v. 40, p. 365-374, 2011.
- AGUNGPRIYONO, S.; MACDONALD A. A.; LEUS K. Y.; KITAMURA, N.; ADNYANE, I. K.; GOODALL, G. P.; HONDO, E. & YAMADA, J. Immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the babirusa, *Babyrousa babyrussa* (Suidae). **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine**, v. 29, p. 173-178, 2000.
- AHMED, Y. A.; EL-HAFEZ, A. A. E. & ZAYED, A. E. Histological and histochemical studies on the oesophagus, stomach and small intestines of *Varanus niloticus*. **Journal of Veterinary Anatomical**, v. 2, n. 1, p. 35-48, 2009.
- ALEIXO, V. M.; PRESSINOTI, L. N.; CAMPOS, D. V. S. & MENEZES-ALEIXO, R. C.; FERRAZ, R. H. S. Histologia, histoquímica e histometria do intestino de jacaré-do-pantanal criado em cativeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1120-1128, 2011.
- ALLEN, T. A. THE ENDOCRINE PANCREAS. IN: DRAZNER, F. H. **Small animal endocrinology**. New York: Churchill Livingstone, 1987. 508 p.
- AMER, F. & ISMAIL, M. H. Histological studies on the alimentary canal of the Agamid lizard *Agama stellio*. **Annales Zoologici**, V. 12, n. 1, p. 12-26, 1976.
- ANDREOZZI, G.; DE GIROLAMO, P.; AFFATATO, C.; RUSSO, P. & GARGIULO, G. VIP-like immunoreactivity in the intestinal tract of fish with different feeding habits. **European Journal of Histochemistry**, v. 41, p. 57-64, 1997.
- 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.
- ANWAR, I. M. & MAHMOUD, A. B. Histological and histochemical studies on the intestine of two Egyptian lizards; *Mabuya quinquetaeniata* and *Chalcides ocellatus*. **Bulletin of the Faculty of Science Assiut University**, v. 24, p. 101-108, 1975.
- ARENA, P. C.; RICHARDSON, K. C. & YAMADA, J. An immunohistochemical study of endocrine cells of the alimentary tract of the King's skink (*Egernia Kingii*). **Journal of Anatomy**, v. 170, p. 73-85, 1990.
- BACHA JR, W. J. & BACHA, L. M. Sistema digestório, In: Ibid. (Eds), **Atlas Colorido de Histologia Veterinária**. 2ª ed., São Paulo: Roca 2003. p.195-273.
- BAECKER, R. Die oxyphilen Panethschen Kornchenzellen im Darmepithel der Wirbeltiere. **EIJ Anatomy**, v. 31, p. 708-755, 1934.

- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.
- BEGUIN, F. Contribution a l'étude histologique du tube digestif des reptiles. **Revue Suisse de Zoologie**, v. 10, p. 185-197, 1902.
- BELL, F. R. The relevance of the new knowledge of gastrointestinal hormones to veterinary science. **Veterinary Science Communications**, v. 2, p. 305- 314, 1979.
- BICCA, D. F.; QUEIROL, E. & BRACCINI, M. C. Aspectos morfológicos e histológicos do estômago de *Acestrorhynchus pantaneiro* (Menezes, 1992) (Teleostei, Acestrorhynchidae) na Bacia do Rio Uruguai médio. **Biodiversidade Pampeana** v. 4, p. 05-10, 2006.
- BRAZEAU, P.; VALE, W.; BURGURS, R.; LING, N.; BUTCHER, M.; RIVIER, J. & GUILLEMIN, R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. **Science**, v. 179, p. 77-79, 1973.
- BUCHAN, A. M.; LANCE, V. & POLAK, J. M. Regulatory peptides in the tract of Alligator mississippiensis. An immunocytochemical study. **Cell Tissue Research**, v. 231, p. 439-449, 1983.
- BURRELL, M. A.; VILLARO, A. C.; RINDI, G.; SOLCIA, E.; POLAK, J. M. & SESMA, P. An histological and immunocytochemical study of the neuroendocrine cells in the intestine of *Podarcis hispanica* Steindachner, 1870 (Lacertidae). **Cell Tissue Research**, v. 263, p. 549-556, 1991.
- CARLSTEDT-DUKE, B. **Intestinal mucin in rat and man. The role of the microflora upon mucin metabolism and its susceptibility to antibiotic treatment**. 1987 Thesis. Karolinska Institutet, 1987.
- 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**, v.16, n. 2, p. 105-130, 2003.
- CECCARELLI, P.; PEDINI, V. & GARGIULO, M. Serotonin containing cells in the horse gastrointestinal tract. **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine**. v. 24, p. 97-99, 1995.
- CHOPRA, D. P.; SIDDIGUI, K. M. & COONEG, R. A. Effects of insulin, transferrin, cholera toxin, and epidermal growth factor on growth and morphology of human fetal normal colon epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 92, p. 891-904, 1987.
- CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 450p.
- DAVID, R. C.; MENIN, E. & MATOS, G. T. Histologia do aparelho digestório de *Coragyps atratus brasiliensis* Bonaparte, 1850 (Falconiformes, Cathartidae). **Revista Ceres.**, v. 39, n. 222, p. 153-176, 1992.

- DEHLAWI, G. Y. & ZAHER, M. M. Histological studies on the alimentary tract of the colubrid snake, *Coluber florudentus* (Family: Colubridae). **Proceedings of the Zoological Society. A. R. Egypt**, v. 1, p. 95-112, 1989.
- DEHLAWI, G. Y. & ZAHER, M. M. Histological studies on the mucosal epithelium of the alimentary canal of the lizard *Acanthodactylus boskianus* (Family Lacertidae). **Proc. Zool. Soc. ARE.**, v. 9, p. 67-90, 1985a.
- DEHLAWI, G. Y. & ZAHER, M. M. Histological studies on the mucosal epithelium of the gecko *Pristurus rupestris* (Family Geckonidae). **Proceedings of the Zoological Society. A. R. Egypt.**, v. 9, p. 91-112, 1985b.
- D'ESTE, L.; WIMALAWANSA, S. J. & RENDA, T. G. Amylin-immunoreactivity is co-stored in a serotonin cell sub-population of the vertebrate sto-mach and duodenum. **Archives of Histology and Cytology**, v. 58, n. 5, p. 537-47, 1995.
- DEZFULI, B. S.; GIARI, L.; ARRIGHI, S.; DOMENEGHINI, C. & BOSI, G. Influence of enteric helminths on the distribution of intestinal endocrine cells belonging to the diffuse endocrine system in brown trout, *Salmo trutta* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, p. 155-166, 2003.
- DI BELLO, A.; VALASTRO, C.; STAFFIERI, F. & CROVACE, A. Contrast Radiograph, of the gastrointestinal tract'n sea turtle. **Veterinary Radiology & Ultrasound** Cleveland, v. 47, p. 351-354, 2006.
- DIAZ, L. C. & SOUZA, F. L. *Prhynops geoffroanus* (Geoffroy's side-necked turtle) DIET. **Herpetological Review**, Salt Lake City, v. 36, n.1, p. 56-57, 2005.
- DICKSON, W. M. Glândulas endócrinas. In: SWENSON, M. J. E REECE, W. O. **Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856 p.
- EL-SALHY, M. & GRIMELIUS, L. The endocrine cells of the gastrointestinal mucosa of a squamate reptile, the grass lizard (*Mabuya quinquetaeniata*). A histological and immunohistochemical study. **Biomedical Research**, v. 2, p. 639-658, 1981.
- EL-SALHY M.; WINDER, E. & LUNDQVIST, M. Comparative studies of serotonin-like immunoreactive cells in the digestive tract of vertebrates. **Biomedical Research**, v. 6, p. 371-375, 1985.
- EL-SAHLY, M. Immunocytochemical investigation of the gastro-entero-pancreatic (GEP) neurohormonal peptides in the pancreas and gastrointestinal tract of the dogfish *Squalus acanthius*. **Histochemistry**, v. 80, p.193-205, 1984.
- EPPLE, A. & BRINN, J. E. The Comparative Physiology of the Pancreatic Islets. *Zoophysiology*, vol. 21. Springer-Verlag, New York: Eng, J., and Yalow, R. S. 1987.
- ERNEST, C. H. & BARBOUR, R. W. **Turtles of the world**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1989. 313p.

- FACHÍN-TERÁN, A.; VOGT, R. C. & GOMEZ, M. F. S. Food habits of an assemblage of five species of turtles in the Rio Guaporé, Rondônia, Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 29, p. 536-547, 1995.
- FALKMER, S. Phylogeny and Ontogeny of the Neuroendocrine Cells of the Gastrointestinal Tract. **Gastrointestinal Hormone in Medicine**, v. 22, n. 4, 1993.
- FALKMER, S.; ELDE, R. P.; HELLERSTROM, C.; PETERSON, B., EFENDIC, S. & FOHLMAN, J. Some phylogenetical aspects on the occurrence of somatostatin in the gastro-entero-pancreatic endocrine system: A histological and immunocytochemical study, combined with quantitative radioimmunological assays of tissue extracts. **Archivum Histologicum Japonicum**, 40, 99- 117, 1977.
- FARAG, A. A. Histological studies on the mucosal epithelium of the agamid lizard, *Uromastix philbyi* Parker. **Annales Zoologici**, v. 19, n. 1, p. 1-23, 1982.
- FERRI, S.; JUNQUEIRA, L. C.; MEDEIROS, L. F. & MEDEIROS, L. O. Gross, microscopic and ultrastructural study of the intestinal tube of *Xenodon merremii* Wagler, 1824 (Ophidia). **Journal of Anatomy**, v. 121, Pt 2, p. 291-301, 1976.
- FILIPE, M. I. & BRANFOOT, A. C. Mucin histochemistry of colon. **Current topics in pathology**, v. 63, p. 143-178, 1976.
- FREITAS, N. L.; PAULA, M. C.; PERRI, S. H. V. & FERRAZ, R. H. S. Morfologia do intestino delgado de capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* (Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 2, p. 122-130, 2008.
- FUJITA, T. & KOBAYASHI, S. Structure and function of gut endocrine cells. **International Review of Cytology**. Supplement. v. 6, p. 187-233, 1977.
- GABE, M. & SAINT-GIRONS, H. Contribution al'histologie de L'estomac des lépidossauriens (Reptilis). **Zool. Ib.**, v. 89, p. 572-599, 1972.
- GANONG, W. F. **Fisiologia Médica**. 17. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 578 p.
- GAPP, D. A.; KENNY, M. P. & POLAK, J. M. The gastro-entero-pancreatic system of the turtle, *Chrysemys picta*. **Peptides**, v. 6, n. 3, p. 347-352, 1985.
- GAPP, D. A. & POLAK, A. M. Localization of Insulin to Gastroenteropancreatic Cells in the Turtle Gastrointestinal Tract. **General and Comparative Endocrinology**, v. 18, p. 48-55, 1990.
- GEORGE, L. L. & CASTRO, R. R. L. **Histologia Comparada**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1998. 286p.
- GONZÁLEZ-JIMÉNEZ, E. Digestive physiology and feeding of capibaras. In: REHCIGE, M. (Ed.). **Handbook Series in Nutrition and Food**. CRC Press, Cleveland, USA, 1977. p. 167-177.

- GROSS, J. E.; WANG, Z. & WUNDER, B. A. Effects of food quality and energy needs: changes in gut morphology and capacity of *Microtus ochrogaster*. **Journal of Mammalogy**, v. 66, p. 661-667, 1985.
- HUANG, X. G. & WU, X. B. Immunohistochemical study on gastrointestinal endocrine cells of four reptiles. **World Journal Gastroenterology**, v. 11, n. 35, p. 5498-5505, 2005.
- JACOBESHANGEN, E. Handbuch der vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere. **Urban und Schwarzenbel, Berlin and Wien**, v. 3, p. 563-724, 1937.
- JIN, S.M.; MARUCH S.M.G.; RODRIGUES M.A.M. & PACHECO P. Histologia geral dos intestinos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Crocodylia: Reptilia). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 7, n. 1/2, p. 111-120, 1991.
- KONG, H. S.; LEE, J. H.; PARK, K. D.; KU, S. K. & LEE, H. S. Immunohistochemical study of the endocrine cells in the pancreas of the carp, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae). **Journal of Veterinary Science**, v. 3, p. 303-314, 2002.
- KOTZÉ S. H.; VAN DER MERWE N. J.; VAN ASWEGEN G. & SMITH G.A. A light microscopical study of the intestinal tract of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*, Laurenti 1768). **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 4, p. 249-252, 1992.
- KU, S. K.; LEE, H. S.; LEE, J. H. & PARK, K. D. An immunohistochemical study on the endocrine cells in the alimentary tract of the reared slider (*Trachemys scripta elegans*). **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine**, v. 30, p. 33-39, 2001.
- LEE, H. S. & KU, S. K. An immunohistochemical study of endocrine cells in the alimentary tract of the grass lizard, *Takydromus wolteri* Fischer (Laceridae). **Acta Histochemica**, v. 106, p. 171-178, 2004a.
- LEE, J. H.; KU, S. K.; PARK, K. D. & LEE H. S. Immunohistochemical study of the gastrointestinal endocrine cells in the Korean aucha perch. **Journal of Fish Biology**, v. 65, p. 170-181, 2004b.
- LEE, S. K.; KU, H. S. & LEE, A.M. An immunohistochemical study of endocrine cells in the alimentary tract of the snake, *Rhabdophis tigrinus tigrinus*. **Korean Journal of Veterinary Research**, v. 35, p. 67-73, 1999.
- LEGLER, J. M. Morphology and physiology of the Chelonia. In: GLASBY, C. J.; ROSS, G. J. B. & BEESLEY, P. L. ed. **Fauna of Australia**. Canberra, 1993. p. 108-119.
- LI, Y.; HAO, Y.; ZHU J. & OWYANG, C. Serotonin released from intestinal enterochromaffin cells mediates luminal non-cholecystokinin-stimulated pancreatic secretion in rats. **Gastroenterology**, v. 118, p. 1197-1207, 2000.
- LIN, S. G.; HUANG, Z. J. & WANG, S. K. Localization and identification of endocrine cells in the Gastro-Entero-Pancreatic system of *Trionyx sinensis*. **Shuichan Xuebao**, v. 25, p. 328-333, 2001.

- LUPPA, H. Histology of the digestive tract. In: GANS, C. E PARSONS, T. S. (ed.). **Biology of the Reptilia**. London: Academic Press., 1977. p. 225-302.
- LUZ, V. L. F.; STRINGHINI, J. H.; BATAUS, Y. S. L.; PAULA, W. A.; NOVAIS, M. N. & REIS, I. J. Morfometria do trato digestório da tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) criada em sistema comercial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 10-18, 2003.
- MACHADO JÚNIOR, A. A. N.; SOUSA, A. L.; CARVALHO, M. A. M.; SANTOS, F. C. F. & ALVES, F. R. Anatomia do fígado e vias bilíferas do muçua (Kinosternon scorpioides). **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 125-133, 2005.
- MACHADO-SANTOS, C.; ZECA, S. G.; ABIDU-FIGUEIREDO, M.; RIBEIRO, I. C. A. & SALES, A. The esophagus of the crocodilian *Caiman latirostris* (Reptilia, Crocodylia): histological, histochemical and immunohistochemical study. **Journal of Morphological Science**, v. 28, p. 113-119, 2011.
- MACHADO-SANTOS, C.; NASCIMENTO, A. A.; PERCCHI, A. L.; MIKALOUSKAS, J. S.; ROCHA, P. A. & SALES, A. Distribution of the endocrine cells in the gastrointestinal tract of nectarivorous and sanguivorous bats: A comparative immunocytochemical study. **Tissue and Cell**, 2009. doi:10.1016/j.tice.2008.11.004.
- MAGALHÃES, M. S.; FREITAS, M. L.; SILVA, N. B. & MOURA, C. E. B. Morfologia do tubo digestório da tartaruga verde (*Chelonia mydas*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 8, p. 676-684, 2010.
- MAGALHÃES, M. S. Morfologia do tubo digestório aplicada à compreensão da dieta em quelônios da família Podocnemididae. 2010. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia de água doce e pesca interior) - INPA, Manaus, AM, 2010.
- MAIORKA, A.; SILVA, A. V. F.; SANTIN, E. BORGES, S. A.; BOLELI, I. C. & MACARI, M. Influência a suplementação de glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 5, 2000.
- MARTÍNEZ-LEONES, T.; VILORIA-NARVÁEZ, M.; CAMACHO-BRACHO, J. & GODOY-BRICEÑO, R.; HERRERA-MÁRQUEZ, E.; MUÑOZ-GOTERA, R. Aspectos histológicos Del intestino de *Typhlonectes venezuelensis* (Amphibia: Gymnophiona, Typhlonectidae) **Revista Científica, FCV-LUZ**, v. 14, n. 3, p. 237-243, 2004.
- MEDEN, F. Informe sobre reptiles colombianos. (V) Observaciones sobre la distribución geografica y ecología de la tortuga *Phrynops geoffroana* 1Sp. en Colombia. **Noved. Colombianas**, v. 1, n. 5, p. 291-300, 1960.
- MENDES, R. M. M.; NASCIMENTO, A. A.; SANTOS, C. M.; CARDOSO, T. R. D.; PINHEIRO, N. L. & SALES, A. An immunocytochemical study of the endocrine cells in the stomach and duodenum of *Zonotrichia capensis* subtorquata (Passeriformes,Emberizidae). **Acta histochemica**, v. 111, p. 83-92, 2009.

- MOLINA, F. B. & ROCHA, M. B. **Identificação, caracterização e distribuição dos quelônios da Amazônia brasileira**. Goiânia: CENAQUA, 1996. 26 p.
- MOLINA, F.B. Observações sobre os hábitos e o comportamento alimentar de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em cativeiro (Reptilia, Testudines, Chelidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 7, n. 3, p. 319-326, 1991.
- MONTEIRO, C. M. R.; SOUZA, N. T. M.; CARVALHO, R. G. & SOUZA, W. M. Análise histológica do trato gastrintestinal de avestruzes jovens (*Struthio camelus* Linnaeus, 1758). **Biotemas**, v. 22, n. 3, p.149-155, 2009.
- MORI, K. Die acidophylkornten Becherzellen als eine Art der Panethschen Zellen. **Nagasaki-Illwai - Zassi** (Jap), v. 13, p. 1060-1065, 1935.
- MUNIZ, W. W.; MACHADO, V. L. & MARQUES, M. Immunohistochemical localization of insulin-like materials in antral gastric mucosa and intestinal epithelial cells of the turtles *Chrysemys dorbigni* and *Phrynops hilarii*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 3, p.327-31, 1991.
- MYERS, B. M.; FREDENBURGH, J. L. & GRIZZLE, W. E. Carbohydrates. IN: BANCROFT, J. D. & GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier, 2008.
- NICKEL, R.; SCHUMMER, A. & SEIFERLE, E. **The viscera of the domestic mammals**. Ed. Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin, Alemanha, 1973. 401 p.
- OLIVEIRA, G. M.; SANTOS, E. E. D. & LUZ, V. L. F. **Estudo morfológico do tubo digestivo de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-amazônia)**. In: Congresso Brasileiro de Zoologia, Santa Maria/RS. 1996.
- PARSONS, T. S. & CAMERON, J. E. Internal Relief of the Digestive Tract. In: **Biology of Reptilia**. ed. By Carl Gans. London and New York: Academic Press, 1977. v. 6, p. 159-224.
- PAZ-CASTILLO, J. Aspectos histológicos del tracto digestivo de *Tropidurus peruvianus peruvianus*. **Rev. Per. Biol.**, v. 1, n. 2, p. 159-163, 1974.
- PELLI-MARTINS, A. A.; MACHADO-SANTOS, C.; SALES, A. & BRITO-GITIRANA, L. Histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural observations of the esophagus morphology of *Rhinella icterica* (Anuran, Bufonidae). **Acta Zoologica**. v. 00, p. 1-8, 2011.
- PEREIRA, J. G. **Estudos histológico e histoquímico do tubo digestivo e do pâncreas do *Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766 (Reptilia, Chelonia, Kinosternidae), muçua**. 2000. 148f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2000.
- PEREZ-TOMAS, R.; BALLESTA, J.; PASTOR, L. M.; MADRID, J. F. & POLARK, J. M. Comparative immunohistochemical study of the gastroenteropancreatic endocrine

- system of three reptiles. **General and Comparative Endocrinology**, v. 76, p. 171-191, 1989.
- POLAK, J. M.; BISHOP A. E. & BLOOM S. R. Hormônios gastrointestinais. In: DANI, R. E CASTRO, L. P. **Gastroenterologia clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 1446-1464.
- PORTER, K. R. **Herpetology**. Canadá, W.b. Saunders company, 1972. 524p.
- PRITCHARD, P. C. H. & TREBBAU, P. **The turtles of Venezuela**. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 1984. 403 p.
- PRZYSTALSKI, A. The dimension of the mucosa and the structure of the alimentary canal in some reptiles. **Acta Biologica racoviensia, Serie Zool.**, v. 13, 1980.
- REINECKE, M. Inununohistochemical localization of polypeptide hormones in endocrine cells of the digestive tract of *Branchiostoma lanceolatum*. **Cell Tissue Research**, v. 219, p. 445-456, 1981.
- RICKLEFS, R. E. **A economia da natureza**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 503p.
- RODRIGUES, S. S.; FONSECA, C. C. & NEVES M. T. D. Células endócrinas do sistema gastroenteropancreático: Conceitos, distribuição, secreções, ação e controle. **Arquivos de Ciências Veterinária e Zoolgia UNIPAR**, v. 8, n. 2, p. 171-180, 2005.
- ROMER, A. S. & PARSONS, T. S. **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 1985. 481p.
- SANTOS, A. L. Q.; BELETTI, M. E. & QUEIROZ, R. P. **Estudo morfológico do tubo digestório da tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa***. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 1998, 15p. Relatório.
- KARADAĞ SARI, E.; NAZLI, M.; KOCAMIŞ, H.; GÜLMEZ, N.; ASLAN, S.; DEPREM, T. Immunohistochemical Localization of Serotonin-, Gastrin-, and Somatostatin-immunoreactive Endocrine Cells in the Duodenum of the Rat (Wistar albino). **Kafkas Üniv Vet Fak Derg**, v. 13, n. 2, p. 133-137, 2007.
- SARTORI, S. S. R. **Morfologia do tubo digestivo da lagartixa *Hemidactylus mabouia* Moreau de Jonnés, 1818 (Squamata:Gekkonidae)**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil, 2009.
- SECOR, S. M. & DI-AMOND, J. A vertebrate model of extreme physiological regulation. **Nature**, v. 395, n. 6703, p. 659-62, 1998.
- SEINO, Y.; PORTE, D. JR. & SMITH, P. H. Immunohistochemical localization of somatostatin-containing cells in the intestinal tract: a comparative study. **General and Comparative Endocrinology**, v. 38, p. 229-233, 1979.

- SIBBING, F. A. & URIBE, R. Regional specialisation in the oro-pharyngeal wall and food processing in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Netherlands Journal of Zoology**, v. 35, p. 377-422, 1985.
- SILVA, N. B. **Estudo morfohistológico do tubo digestório de *Steindachnerina notanota* Ribeiro 1937 (Characiforme, Curimatidae) e *Hoplias malabaricus* Bloch 1794 (Characiformes, Erythrinidae) do rio Ceará-Mirim em Umari, distrito de Taipu-RN.** 2004. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN, Brasil, 2004.
- SMITH, D.; DOBSON, H. & SPENCE, E. Gastrointestinal studies in the green iguana: technique and reference values. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 42, n. 6, p. 515-520, 2001.
- SMITH, E. L. *et al.*, **Bioquímica de mamíferos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 620 p.
- SOLCIA, E.; CAPELLA, C.; VASSALLO, G. & BUFFA, R. Endocrine cells of the gastric mucosa. **International Review of Cytology**, v. 42, p. 223-86, 1975.
- SOLCIA, E.; POLAK, J. M.; LARSSON, L. I.; BUCHAN, A. M. S. & CAPEELA, C. Update on Lausanne classification of endocrine cells. In: BLOOM, S. R. & POLAK, J. M. ed. **Gut Hormones**, 2 ed., Edinburgh: Churchill Livingstone, 1981. p. 96-100.
- STEVENS, C. E. & HUME, I. D. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. **Physiology Review**, v. 78, n. 2, p. 393-427, 1998.
- TARAKÇI, B. G.; KÖPRÜCÜ, S. S. & YAMAN, M. An immunohistochemical study on the endocrine cells in the gastrointestinal tract of the freshwater turtle, *Mauremys caspica caspica*. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 29, p. 581-587, 2005.
- TÖRÖ, E. Zur Frage der Darmresorption auf Grund von Untersuchungen am Krokodildarm. **Z. MiJa.-Anat. Forschi.**, v. 19, p. 537-556, 1930.
- TRANDABURU, T. & TRANDABURU, I. Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) immunoreactive endocrine and neural elements in the chromaffin enteropancreatic system of amphibians and reptiles. **Acta Histochemica**, v. 109, n. 3, p. 237-47, 2007.
- TWEDT, D. C. Gastrointestinal peptide hormones. In: DRAZNER, F. H. **Small animal endocrinology.** New York: Churchill Livingstone, 1987. 508 p.
- VAN NOORDEN, S. & PEARSE, A. G. E. Immunoreactive polypeptide hormones in the pancreas and gut of the lamprey. **General and Comparative Endocrinology**, v. 23, p. 311-324, 1974.
- VANNER, S. Myenteric neurons activate submucosal vasodilator neurons in guinea pig ileum. **American Physiological Society - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, p. 380-387, 2000.

- VIGLIANO, F. A.; MUÑOZ, 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**, v. 78, p. 901-911, 2011.
- WU, X. B.; ZHANG, S. Z.; CHEN, B. H.; DENG, Z. P.; ZHOU, Z. X.; WANG, C. L.; NIE, J. S. & XIE, W. S. Immunohistochemical studies on endocrine cells in the digestive tract of *Alligator sinensis*. **Dongwu Xuebao**, v. 45, p. 155-161, 1999.
- WYNEKEN, J. **The anatomy of sea turtle**. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470, US Department of Commerce, 2001. 172p.
- YAMADA, J.; CAMPOS, V. J.; KITAMURA, N.; PACHECO, A. C.; YAMASHITA, T. & YANAIHARA, N. An immunohistochemical study of the endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the *Caiman latirostris*. **Archivum Histologicum Japonicum**, v. 50, p. 229-241, 1987.
- YAMANAKA, Y.; YAMADA, J.; KITAMURA, N. & YAMASHITA, T. An immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the chicken gastrointestinal tract. **Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung**, v. 103, p. 437-446, 1989.
- YOUNG, B. & HEARTH, J. W. **Histologia functional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000. 415p.
- ZAHER, M.; EL-GHAREEB, A. W.; HAMDI, H.; ESSA, A. & LAHSIK, S. Anatomical, Histological and Histochemical Adaptations of the Reptilian Alimentary Canal to Their Food Habits: I. *Uromastix aegyptiaca*. **Life Science of Journal**, v. 9, n. 3, p.84-104, 2012.
- ZHANG, Z. Q.; ZHANG, S. Z. & WU, X. B. Immunohistochemical localization of the endocrine cells in the digestive tract of *Trimeresurus stejnegeri*. **Dongwu Xuebao**, v. 47, p. 666-671, 2001.
- ZUG, G. R.; VITT, L. J. & CALDWELL, J. P. **Herpetology: An introduction biology of amphibians and reptiles**, 2 ed. Florida: Academic Press. 2001.

ANEXO A

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.
 16. Lavar o anticorpo primário com tampão de lavagem (3 x 3 minutos) na câmara úmida.
 17. Incubar com anticorpo secundário biotilado (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).
 24. Montar as lâminas com lamínula e Entellan.

ANEXO B



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 500µM serotonin or 200µg/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 500µM.

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.^{6,7} 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-HT₃ receptor is a ligand-gated ion channel, whereas the 5-HT₁ subfamily (5-HT_{1A-F}) 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.



**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.

Français

Code A0566

Concentration protéinique g/l : Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.

Utilisation prévue

Pour diagnostic *in vitro*.

Voir les *Instructions générales pour le marquage immunohistochimique* ou les instructions du système de détection des procédures IHC pour : 1) Principe de la procédure, 2) Matériel requis non fourni, 3) Stockage, 4) Préparation de l'échantillon, 5) Procédure d'immunomarquage, 6) Contrôle de qualité, 7) Résolution des problèmes, 8) Interprétation du marquage, 9) Limites générales.

Résumé et explication

Introduction

La somatostatine est l'une des sept hormones polypeptidiques connues produites dans le pancréas. La somatostatine est une hormone inhibitrice du système neuroendocrinien, sécrétée par les cellules D des îlots de Langerhans, le fundus et l'antrum de l'estomac et l'intestin grêle supérieur. La présence de somatostatine a été démontrée dans les nerfs sympathiques, les cellules des muqueuses, les nerfs myentériques du tractus gastro-intestinal, les glandes salivaires et dans certaines cellules parafolliculaires de la thyroïde.¹⁻³

Spécificité

Cet anticorps marque les cellules D du pancréas des mammifères. La somatostatine a montré une réaction croisée avec la somatostatine d'un grand nombre d'espèces de mammifères.

Réactifs fournis

L'anti-somatostatine de lapin est un antiserum de lapin non fractionné dans 0,05 mol/L de Tris-HCl à pH 7,6 et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

L'anti-somatostatine de lapin peut être utilisé à une dilution allant de 1:200 à 1:300 par la méthode LSAB[®], déterminée sur des coupes de tissu fixées au formol et incluses en paraffine. Il ne s'agit là que de recommandations ; les dilutions optimales seront déterminées par chaque laboratoire.

Matériels requis mais non fournis

Voir les *Instructions générales pour le marquage immunohistochimique* et/ou les instructions du système de détection.

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien qu'il ne soit pas classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb et en cuivre pour former des dépôts hautement explosifs d'azides métallisés. Lors de l'élimination du produit, rincer à grande eau pour éviter toute accumulation d'azide métallisé dans la tuyauterie.
3. Comme pour tout dérivé biologique, les procédures de manipulation correctes doivent être respectées.
4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C.

Préparation des échantillons

Coupes en paraffine

L'anti-somatostatine de lapin peut être utilisé pour des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine. Le prétraitement des tissus avec des enzymes protéolytiques n'est pas requis.

Procédure de coloration

Suivre la procédure recommandée avec le système de détection choisi.

Interprétation de la coloration

Le profil de coloration cellulaire de l'anti-somatostatine est cytoplasmique.

Caractéristiques de performance

Tissus normaux

Cet anticorps identifie les cellules contenant de la somatostatine parmi les cellules insulaires provenant des canalicules pancréatiques.⁴

Tissus anormaux

Cet anticorps identifie les cellules contenant de la somatostatine parmi les tumeurs pancréatiques et l'hyperplasie à cellules insulaires. La présence de cellules contenant de la somatostatine a également été observée dans les carcinomes thyroïdiens médullaires, l'hyperplasie des cellules C, les tumeurs thymiques, les tumeurs pulmonaires et les carcinomes pulmonaires à petites cellules.

Deutsch**Code-Nr. A0566**

Protein-Konzentration g/l: Siehe Produktetikett.

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* bzw. den Anweisungen des Detektionssystems entnehmen: (1) Prinzip des Testverfahrens, (2) Zusätzlich benötigte Reagenzien und Zubehör (außerhalb des Lieferumfangs), (3) Lagerung, (4) Probenvorbereitung, (5) Färbeprozedur, (6) Qualitätskontrolle, (7) Störungsbeseitigung, (8) Interpretation des Anfärbens, (9) Generelle Einschränkungen.

Zusammenfassung und Erklärung*Einleitung*

Somatostatin ist eines von sieben bekannten, im Pankreas produzierten Polypeptidhormonen. Somatostatin wirkt als ein inhibitorisches Hormon des neuroendokrinen Systems und wird von den D-Zellen der Langerhans-Inseln, des Fundus und Antrums des Magens und des oberen Dünndarms sezerniert. Somatostatin wurde nachgewiesen in sympathischen Nerven, Schleimhautzellen, myenterischen Nerven des Gastrointestinaltrakts, Speicheldrüsen und in einigen parafollikulären Zellen der Schilddrüse.^{1,5}

Spezifität

Dieser Antikörper markiert D-Zellen des Säugetierpankreas. Es wurde Kreuzreaktivität mit Somatostatin von einer großen Anzahl von Säugetierspezies beobachtet.

Mitgelieferte Reagenzien

Rabbit Anti-Somatostatin liegt vor als unfraktioniertes Kaninchen-Antiserum in 0,05 mol/L Tris-HCl, pH 7,6, und 0,015 mol/L Natriumazid.

Rabbit Anti-Somatostatin kann für die Bestimmung an formalinfixierten paraffineingebetteten Schnitten mit der LSAB-Methode bei einer Verdünnung von 1:200 bis 1:300 eingesetzt werden. Hierbei handelt es sich lediglich um Leitlinien. Die optimalen Verdünnungswerte sind von dem jeweiligen Labor zu bestimmen.

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Siehe *Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* und/oder Anweisungen des Detektionssystems.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (NaN₃), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann NaN₃, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Ansammlungen von Metall-Aziden führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um eine Anreicherung von Metall-Aziden in Abflussleitungen zu vermeiden.^{7,8}
3. Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.
4. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend kommunalen, einzel- und bundesstaatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Aufbewahrung

Bei 2–8°C lagern.

Vorbereitung der Probe*Paraffinschnitte*

Rabbit Anti-Somatostatin kann für formalinfixierte paraffineingebettete Schnitte verwendet werden. Eine Vorbehandlung von Geweben mit proteolytischen Enzymen ist nicht erforderlich.

Färbeverfahren

Das für das ausgewählte Detektionssystem empfohlene Verfahren befolgen.

Auswertung der Färbung*Normalgewebe*

Dieser Antikörper identifiziert Somatostatin enthaltende Zellen in Inselzellen, die ihren Ursprung in den Pankreasgängen haben.⁹

Anomale Gewebe

Der Antikörper markiert Somatostatin enthaltende Zellen in Pankreastumoren und Inselzell-Hyperplasien. Somatostatin enthaltende Zellen können ebenfalls vorliegen in medullären Schilddrüsenkarzinomen, C-Zell-Hyperplasien, Thymustumoren, Lungentumoren und kleinzelligen Bronchialkarzinomen.






References**Bibliographie****Literaturangaben**

1. Alumets J, et al. Distribution, ontogeny and ultrastructure of somatostatin immunoreactive cells in the pancreas and gut. *Cell Tiss Res* 1977; 185:465
2. Dubois MP. Immunoreactive somatostatin is present in discrete cells of the endocrine pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72:1340

(111031-001)

303257EFG_110905 p. 3/4

3. Erlandsen SL, et al. Pancreatic islet cell hormones: Distribution of cell types in the islet and evidence for presence of somatostatin and gastrin in D cell. *J Histochem Cytochem* 1976; 24:863
4. Parsons JA, et al. Central and peripheral localization of somatostatin. *Immunoenzyme and immuno-cytochemical studies. J Histochem Cytochem* 1976; 24:872
5. Civantos F. Gastrointestinal and pancreatic hormones. In: Nadjl M and Morales AR. *Immunoperoxidase Techniques: A practical approach to tumor diagnosis*. Chicago: ASCP Press 1986:56
6. Creutzfeldt W, et al. Pathomorphologic, biochemical and diagnostic aspects of gastrinomas (Zollinger-Ellison Syndrome). *Hum Pathol* 1975; 6:47

REF	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 Dako North America, Inc. 6382 Via Real Carpinteria, California 93013 USA Tel: 805 596 6855 Fax: 805 596 6898 Technical Support 800 434 0021 Customer Service 800 295 5763	EC REP	
	Manufacturer Fabricant Hersteller	LOT	Batch code Code du lot Chargenbezeichnung		 Use by Utiliser jusqu'à Verwendbar bis	EC REP
EC REP	Authorized representative in the European Community Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne Autorisierter Repräsentant in der EU		IVD		In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro Invitro-Diagnostikum	EC REP

PH039Rev3



3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone (800) 325-5832 (314) 771-5765
Fax (314) 286-7828
email: techserv@sial.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).^{9,10}

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 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

1. Walsh, J., *Gastrointestinal Hormones. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Johnson, R. (ed.), Raven Press, New York, p 181 (1987).
2. Gregory, R., *Bioorg. Chem.*, **8**, 497 (1979).
3. Larsson, L., et al., *Scand. J. Gastroenterol.*, **12**, 869 (1977).
4. Wool, P., *Br. J. Cancer*, **63**, 469 (1991).
5. Lamers, C., and Jansen, J., *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **24**, 267 (1988).
6. Bordi, C., et al., *Arch. Pathol.*, **98**, 274 (1974).
7. Lechago, J., and Shah, I., *Gastroenteropancreatic Hormones. In: Atlas of Diagnostic Immunohistopathology*, True, L. (ed.), Lippincott, J.B., New York (1990).
8. Hodges, J., et al., *Gut*, **22**, 237 (1981).
9. Buchan, A., et al., *Nature*, **277**, 138 (1979).
10. 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.



3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone (800) 325-5832 (314) 771-6765
Fax (314) 286-7829
email: techserv@sigma.com
sigma-aldrich.com

Product Information

MONOCLONAL ANTI-GLUCAGON

Clone K79bB10

Mouse Ascites Fluid

Product No. G 2654

Product Description

Monoclonal Anti-Glucagon (mouse IgG1 isotype) is derived from the K79bB10 hybridoma produced by the fusion of mouse myeloma cells and splenocytes from an immunized mouse. Polymerized porcine glucagon was used as the immunogen. The isotype was determined using Sigma ImmunoType™ Kit (Product Code ISO-1) and by a double diffusion immunoassay using Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Product Code ISO-2).

Monoclonal Anti-Glucagon reacts with pancreatic glucagon in RIA and immunocytochemistry.¹ The affinity constant of 6.1×10^7 L/M in RIA. The antibody weakly cross-reacts with gut glucagon (enteroglucagon) in an immunohistological assay. It may be used for the immunocytochemical staining of Bouin-fixed and formalin-fixed, paraffin-embedded pancreatic tissue sections. Cross-reactivity has been observed with glucagon-containing cells in fixed sections of pancreas from human, porcine, dog, rabbit, mouse, rat, guinea pig, and cat. It may also be used in RIA and dot blot technique (native and denatured).

Glucagon is a 29-residue polypeptide hormone (MW 3482), produced in the pancreas.² A related hormone, enteroglucagon (or oxyntomodulin), which is produced in the mucosa of the small and large intestine, consists of the 29 amino acid sequence of pancreatic glucagon extended by 8 additional residues at the C-terminus. The biological activities of pancreatic glucagon include glycogenolysis, lipolysis, gluconeogenesis, and ketogenesis, which are antagonistic effects to those of insulin action, thus leading to increased blood glucose levels. Immunocytochemical studies have revealed the presence of pancreatic glucagon inside the A or α cells, which constitute 15-20% of the islet cell population. These cells are located preferentially at the periphery of the human pancreatic islets. Pathological manifestations of the glucagon-type peptide reside almost exclusively with the existence of tumors or glucagonomas, as no states of glucagon-cell deficiency or hyperplasia have been

identified. Glucagon-specific antibodies would prove useful as an α cell and tumor markers applying immunohistochemical techniques, and as an analytical tool in quantification of the hormone.

Reagents

The product is provided as ascites fluid containing 0.1% sodium azide as a preservative.

Precautions and Disclaimer

Due to the sodium azide content a material safety data 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.

Product Profile

A minimum working dilution of 1:2,000 was determined by indirect immunoperoxidase labeling of formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human or animal pancreas.

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

Storage

For continuous use, store at 2-8 °C for up to one month. For extended storage, solution may be frozen 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 by centrifugation before use.

References

1. Witt, S., et al.; Acta Histochem., **Suppl XXXV**, 217 (1988).
2. Lechago, J., and Shah, I., in: Atlas of Diagnostic Immunohistopathology, True, L. (ed.), Chapter 14, J.B. Lippincott Co., Philadelphia (1986)

PCS 02/02

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.



MONOCLONAL ANTI-INSULIN
Mouse Ascites Fluid

Product No. I 2018

Product Description

Monoclonal Anti-Insulin (mouse IgG1 isotype) is derived from the K36aC10 hybridoma produced by the fusion of mouse myeloma cells and splenocytes from an immunized mouse. Human insulin was used as the immunogen. The isotype was determined using Sigma ImmunoType™ Kit (Product Code ISO-1) and by a double diffusion immunoassay using Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Product Code ISO-2).

Monoclonal Anti-Insulin reacts specifically against insulin in RIA, immunodot and immunocytochemistry.¹⁻³ The antibody reacts with insulin purified from the pancreas of human, bovine, horse and sheep and with human proinsulin.³ It may be used for the immunocytochemical staining of Bouin-fixed and formalin-fixed, paraffin-embedded pancreatic tissue sections. It may also be used in RIA and dot blots (native and denatured). The product binds to insulin with an affinity constant of 8.8×10^9 L/M in RIA.^{1,2} Cross reaction has been observed with insulin-containing cells in fixed sections of pancreas from human, monkey, porcine, dog, rabbit, bovine, sheep, rat, guinea pig, and cat.

Monoclonal Anti-Insulin may be used for the localization of insulin using RIA, dot blot and immunocytochemistry.

Insulin is a 51-amino acid polypeptide composed of A and B chains connected by disulfide bonds.⁴ Its precursor, proinsulin, is a single-chain molecule consisting of A and B chains connected through the C-peptide. Proinsulin, which has little biological activity, is cleaved by proteases within its cell of origin into the insulin molecule and the C-terminal basic residue. The main storage sites for insulin and the C-peptide are the pancreatic islets. Insulin is one of the major regulatory hormones of intermediate metabolism throughout the body. The biological actions of this hormone involve integration of carbohydrate, protein, and lipid metabolism. Insulin enhances membrane transport of glucose, amino acids, and certain ions. It also promotes glycogen storage, formation of triglycerides and synthesis of proteins and nucleic acids. The exact mechanism(s) by which insulin achieves these intracellular effects remains somewhat elusive, but is assumed to involve activation of one or more second messengers. Immunocytochemical investigations have

Product Information

localized insulin in the B or β cells of pancreatic islets of Langerhans. These cells, characterized for many years on the basis of their histochemical and ultrastructural features, comprise 70-80% of the pancreatic islet cells, and are located toward the center of the islets. The hormone is stored inside secretory granules which possess a crystalline core displaying a well-defined periodicity by electron microscopy. Deficiency of insulin results in diabetes mellitus, one of the leading causes of morbidity and mortality in the general population. Insulin is also present in tumors of β -cell origin such as insulinoma. Insulin-specific antibodies prove useful as β -cell and tumor markers using immunohistochemical techniques, and as analytical tools in quantification of the hormone.

Reagents

The product is provided as ascites fluid containing 15 mM sodium azide as a preservative.

Precautions and Disclaimer

Due to the sodium azide content a material safety data 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.

Product Profile

A minimum working dilution of 1:1,000 is determined by indirect immunoperoxidase labeling of formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human or animal pancreas.

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

Storage

For continuous use, store at 2-8 °C for up to one month. For extended storage, solution may be frozen 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 by centrifugation before use.

References

1. Keilacker, H., et al., *Biomed. Biochim. Acta*, **45**, 1093 (1986).
2. Witt, S., et al., *Acta Histochem., Suppl. XXXV*, 217 (1988).
3. Madsen, O., *Diabetes*, **36**, 1203 (1987).
4. Lechago, J., and Shah, I., in: *Atlas of Diagnostic Immunohistopathology*, True, L. (Ed.), Chapter 14, J.B. Lippincott Co., Philadelphia (1990). PCS 01/02

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.

Rabbit Polyclonal Antibody to Human Pancreatic Polypeptide

Catalog No.:	RP 030, RP 030-05
Intended Use:	This product is intended for qualitative immunohistochemistry with normal and neoplastic formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections, to be viewed by light microscopy. Clinical interpretation of staining results should be accompanied by histological studies with proper controls. Patients' clinical histories and other relevant diagnostic tests should be utilized by a qualified person (s) when evaluating and interpreting results.
Immunogen:	Synthetic human pancreatic polypeptide conjugated to keyhole limpet hemocyanin.
Host:	Rabbit
Format:	Purified immunoglobulin fraction against human pancreatic polypeptide containing sodium azide as a preservative.
Titer/Working Dilution:	This antibody may be diluted to a titer of 1:25-1:50 in an ABC method. The final dilution should be determined by the user based upon the staining conditions employed.
Staining Protocol:	We suggest an incubation period of 30 minutes at room temperature. Optimal incubation conditions should be determined by the user based upon the fixation conditions and staining system employed. <u>Suitable for formalin fixed, paraffin embedded tissue sections.</u>
Specificity:	This antibody reacts with pancreatic polypeptide. It stains the periphery of islets, exocrine pancreatic parenchyma, and the epithelium of small and medium sized ducts and acinar cells.
Positive Control:	Pancreas
Cellular Localization:	Cytoplasmic
Storage:	Store at 2-8°C. Do not use beyond the expiration date stated on the label.

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 3360, Fax: 925 484 3390

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

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: <ul style="list-style-type: none"> 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:	<ul style="list-style-type: none"> 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:	<p>Aliquot 1mL of Stable DAB/Plus Buffer in mixing bottle. Add 20µL (one drop) of concentrated Stable DAB/Plus Chromogen. Replace tip and mix.</p> <p><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></p>
Procedure:	<ul style="list-style-type: none"> 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