

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

DISSERTAÇÃO

**Descrição histológica e detecção imuno-histoquímica
de células do sistema neuroendócrino difuso
no oviduto de *Phrynops geoffroanus*
(Testudines, Chelidae)**

ENELY MARIS DA SILVEIRA FIRMIANO

Seropédica - Rio de Janeiro

2013



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

**DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA E DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA
DE CÉLULAS DO SISTEMA NEUROENDÓCRINO DIFUSO
NO OVIDUTO DE *PHRYNOPS GEOFFROANUS*
(TESTUDINES, CHELIDAE)**

ENELY MARIS DA SILVEIRA FIRMIANO

Sob a orientação da Professora

Dra. Nadja Lima Pinheiro

e co-orientação da Professora

Dra. Aparecida Alves do Nascimento

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

Seropédica, RJ
Fevereiro, 2013

597.924

Firmiano, Enely Maris da Silveira, 1986-

F525d

T

Descrição histológica e detecção imuno-histoquímica de células do sistema neuroendócrino difuso no oviduto de *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae) / Enely Maris da Silveira Firmiano. - 2013.

65 f.: il.

Orientador: Nadja Lima Pinheiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

Bibliografia: f. 36-42.

1. Tartaruga - Teses. 2. Tartaruga - Aparelho genital - Teses. 3. Tartaruga - Aparelho genital - Histologia - Teses. 4. Tartaruga - Morfologia - Teses. I. Pinheiro, Nadja Lima, 1943- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. III. Título.

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

ENELY MARIS DA SILVEIRA FIRMIANO

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18/02/2013

Dra. Nadja Lima Pinheiro
(Orientadora)

Dr. Walker André Chagas (UFF)

Dr. Marcos Antônio José dos Santos (UFRRJ)

Dr. Armando Sales (UFRRJ)

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Dra. Nadja Lima Pinheiro por toda a gentileza, apoio e orientação para a realização deste trabalho.

A Professora Dra. Aparecida Alves do Nascimento, co-orientadora desta dissertação, por toda a amizade, dedicação, auxílio e as valiosas contribuições desde a graduação, durante os tempos mais difíceis.

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

A secretária Agra Mendonça pelas diversas matrículas e declarações providenciadas durante o curso e por toda sua presteza e alegria, com certeza sem as quais não chegaria ao momento atual.

A professora Dra. Bernadete Maria de Sousa, da Universidade Federal de Juiz de Fora, por auxiliar na execução deste trabalho.

Ao Departamento de Zoologia da UFJF por permitir a realização de trabalho concedendo os animais utilizados.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

A amiga Nathália das Neves Cardoso que Deus colocou em minha vida, por sua companhia, carinho, amizade e incentivo desde os tempos da graduação,

Aos amigos que conquistei durante a graduação em Ciências Biológicas e que persistem até os dias atuais, em especial a Danielle Alcântara, Luiz Antonio, Taynara Franco e Vinícius Miranda.

As eternas amigas do alojamento 308, pelos momentos vividos e por toda a amizade que me fizeram amadurecer.

A todos os amigos de Minas Gerais que souberam me incentivar e suportar todo este tempo fora de casa, em especial a amiga, irmã e muitas vezes mãe Andreia Nogueira Feitosa.

Aos meus pais, pelo eterno apoio, que mesmo ausentes, entretanto juntos de Deus, iluminaram meu caminho em busca de mais uma conquista.

Ao meu irmão Edney Geraldo da Silveira Firmiano, pelo intenso incentivo aos meus estudos.

Ao meu noivo José Ricardo dos Reis, há onze anos juntos, por ter aceitado minha ausência, pelo apoio e por todo amor dedicado, principalmente nos dias de angústias.

A minha Tia/Mãe Maria Salete Silveira, por ter se abdicado de seus sonhos para me proporcionar estudo e conhecimento, pelo incentivo e por todo amor e carinho dedicado durante toda minha vida, o que me permitiu chegar até aqui.

E a Deus, que me deu a Vida e muito Amor, pelo auxílio em minhas escolhas, por sua presença constante em todos os momentos e pelo conforto nas horas difíceis!!!

Resumo

FIRMIANO, Enely Maris da Silveira. **Descrição histológica e detecção imuno-histoquímica de células do sistema neuroendócrino difuso no oviduto de *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Phrynops geoffroanus é uma espécie de réptil representante da ordem dos Testudines, popularmente conhecida como cágado-de-barbichas ou cágado-de-barbelas. Como os demais representantes desta ordem, é uma espécie ovípara, ou seja, as fêmeas colocam ovos no ambiente durante a reprodução. Os objetivos deste trabalho foram a descrição histológica do oviduto das fêmeas de *P. geoffroanus* com auxílio da microscopia de luz, após ser submetido às técnicas histológicas e histoquímicas (AB pH 2,5, PAS, Tricrômico de Mallory, Xylidine Ponceau), além de procurar identificar células endócrinas produtoras de motilina, serotonina e somatostatina através da imuno-histoquímica, ao longo dos diversos segmentos do oviduto. O oviduto deste cágado é composto por cinco diferentes regiões: infundíbulo, que recebe o ovócito liberado no momento da ovocitação; a tuba uterina (magno), região espiralada produtora do albúmen; o istmo, uma região de transição; o útero, responsável pela produção da casca do ovo, e a vagina, porção final do oviduto que leva à cloaca. A estrutura do oviduto de *P. geoffroanus* é semelhante à de outras espécies de répteis ovíparos e pode ser utilizada para comparações morfológicas filogenéticas. O estudo imuno-histoquímico revelou ausência de células neuroendócrinas produtoras de motilina, serotonina e somatostatina em todas as regiões do oviduto da espécie estudada. Entretanto, a existência dessas células foi verificada no intestino deste cágado (teste-controle), tornando possível sugerir que provavelmente os peptídeos regulatórios produzidos por tais células, sejam transportados pela corrente sanguínea e atinjam receptores específicos em células-alvo localizadas ao longo do oviduto para atuarem na regulação dos movimentos peristálticos deste órgão.

Palavras-chave: Testudines, oviduto, microscopia de luz, morfologia, imuno-histoquímica.

Abstract

FIRMIANO, Enely Maris da Silveira. Histological description and **immunohistochemical detection of diffuse neuroendocrine system cells in the oviduct of *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae)**. 2013. Dissertation (Master Science in Animal Biology). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Phrynops geoffroanus is a freshwater turtle popularly known as Geoffroy's toadhead **turtle** or Geoffroy's side-necked turtle. Like other species of the Testudines order, it is oviparous, meaning the females lay their eggs in the environment. The objectives of this article are to describe the morphology of the oviduct of *P. geoffroanus* as observed through light microscopy after performing standard histochemical techniques (AB pH 2.5, PAS, Mallory's trichrome, xyloidine Ponceau), besides identifying the endocrine cells in the various regions of the oviduct that produce motilin, serotonin and somatostatin through immunohistochemistry. The oviduct of this turtle is composed of five regions: the infundibulum, which receives the oocyte released at the moment of oocytation; the tube uterine (magnum), the spiraled region that produces the albumen; the isthmus, a transition region; the uterus, responsible for producing the egg shell; and the vagina, the final portion of the oviduct, which leads to the cloaca. The structure of the oviduct of *P. geoffroanus* is similar to that of other oviparous reptile species. Its description can be used for phylogenetic morphological comparisons. The immunohistochemistry study revealed the absence of neuroendocrine cells that produce motilin, serotonin and somatostatin in all regions of the oviduct. However, the existence of these cells in the gut of this turtle was verified, enabling the suggestion that the regulatory peptides produced by these cells are carried by the bloodstream and reach specific receptors on target cells located along the oviduct, to regulate the peristaltic movements of this organ.

Keywords: Testudines, oviduct, light microscopy, morphology, immunohistochemistry.

ÍNDICE

	Pág
1.0 - Introdução.....	01
2.0 - Revisão de Literatura.....	02
2.1 - A classe dos Répteis.....	02
2.2 - A ordem Testudines.....	02
2.3 - A espécie estudada.....	03
2.4 - Sistema Reprodutor Feminino de <i>Phrynops geoffroanus</i>	03
2.5 - Peptídeos reguladores e aminos biogênicas pesquisadas.....	04
3.0 - Capítulo I: Histologia e histoquímica do oviduto do cágado-de-barbelas <i>Phrynops geoffroanus</i> (Testudines, Chelidae).....	05
3.1 - Objetivos.....	06
3.2 - Material e Métodos.....	06
3.2.1 - Preparação dos cortes histológicos.....	07
3.2.2 - Observações e Fotomicrografias.....	07
3.3 - Resultados.....	07
3.3.1 - Infundíbulo.....	08
3.3.2 - Tuba uterina.....	11
3.3.3 - Istmo.....	13
3.3.4 – Útero.....	15
3.3.5 – Vagina.....	18
3.4 - Discussão.....	20
3.5 - Conclusões.....	24
4.0 - Capítulo II: Detecção imuno-histoquímica de células do Sistema Neuroendócrino difuso no oviduto de <i>Phrynops geoffroanus</i> (Testudines, Chelidae).....	25
4.1 - Objetivos.....	26

4.2 - Material e Métodos.....	26
4.2.1 - Estudo Imuno-histoquímico.....	26
4.2.2 - Teste Controle.....	28
4.2.3 - Células endócrinas Argirófilas (GRIMELIUS, 1968).....	28
4.2.4 - Observações e Fotomicrografias.....	28
4.3 - Resultados.....	28
4.4 - Discussão.....	33
5.0 - Conclusões.....	35
6.0 - Referências Bibliográficas.....	36
7.0 - Anexos.....	44
7.1 - Anexo 1: Artigo aceito para publicação.....	43
7.2 - Anexo 2: Data sheet do Kit ABC.....	45
7.3 - Anexo 3: Data sheet do Anti-soro diluente.....	48
7.4 - Anexo 4: Data sheet do DAB.....	49
7.5 - Anexo 5: Data sheet do anti-soro anti-motilina.....	50
7.6 - Anexo 6: Data sheet do anti-soro anti-serotonina.....	51
7.7 - Anexo 7: Data sheet do anti-soro anti-somatostatina.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Exemplar de <i>Phrynops Geoffroanus</i>	06
Figura 2: Oviduto de <i>Phrynops Geoffroanus</i> com tamanho médio de 23 cm subdivido em cinco regiões.....	08
Figura 3: Fotomicrografias do infundíbulo de <i>P. Geoffroanus</i>	09
Figura 4: Fotomicrografias do infundíbulo de <i>P. Geoffroanus</i>	09
Figura 5: Fotomicrografias do infundíbulo de <i>P. Geoffroanus</i>	10
Figura 6: Fotomicrografias da tuba uterina de <i>P. Geoffroanus</i>	11
Figura 7: Fotomicrografias da tuba uterina de <i>P. Geoffroanus</i>	12
Figura 8: Fotomicrografias da tuba uterina de <i>P. Geoffroanus</i>	12
Figura 9: Fotomicrografias da tuba uterina de <i>P. Geoffroanus</i>	13
Figura 10: Fotomicrografias do istmo de <i>P. Geoffroanus</i>	14
Figura 11: Fotomicrografias do istmo de <i>P. Geoffroanus</i>	14
Figura 12: Fotomicrografias do istmo de <i>P. Geoffroanus</i>	15
Figura 13: Fotomicrografias do útero de <i>P. Geoffroanus</i>	16
Figura 14: Fotomicrografias do útero de <i>P. Geoffroanus</i>	16
Figura 15: Fotomicrografias do útero de <i>P. Geoffroanus</i>	17
Figura 16: Fotomicrografia da região de transição útero-vaginal de <i>P. Geoffroanus</i>	17
Figura 17: Fotomicrografias da vagina de <i>P. Geoffroanus</i>	18
Figura 18: Fotomicrografia da vagina de <i>P. Geoffroanus</i>	19
Figura 19: Fotomicrografias da vagina de <i>P. Geoffroanus</i>	19
Figura 20: Fotomicrografias da vagina de <i>P. Geoffroanus</i>	20
Figura 21: Representação do método imunoenzimático ABC - peroxidase (Complexo avidina-biotina-enzima).....	26

Figura 22: Fotomicrografias do oviduto de <i>P. geoffroanus</i>	29
Figura 23: Fotomicrografias do oviduto de <i>P. geoffroanus</i>	29
Figura 24: Fotomicrografias do oviduto de <i>P. geoffroanus</i>	30
Figura 25: Fotomicrografias do oviduto de <i>P. geoffroanus</i>	30
Figura 26: Fotomicrografia do intestino de <i>P. geoffroanus</i> . Células endócrinas argirófilas na camada mucosa (Método de Grimelius).....	31
Figura 27: Fotomicrografias de células endócrinas produtoras de motilina entre as células epiteliais do intestino.....	31
Figura 28: Fotomicrografias de células endócrinas produtoras de serotonina próximo às glândulas intestinais.....	32
Figura 29: Células endócrinas produtoras de somatostatina entre as células epiteliais do intestino.....	32

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Fêmeas de <i>P. geoffroanus</i> utilizadas nesse estudo, pertencentes à Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da UFJF, MG.....	07
Tabela 2: Reações histoquímicas do epitélio e das glândulas das diferentes regiões do oviduto de <i>P. geoffroannus</i>	10
Tabela 3: Anti-soros e reagentes utilizados.....	27

1.0 - INTRODUÇÃO

Os répteis formam um grupo proeminente em quase todas as taxocenoses terrestres, sendo conhecidas atualmente 9.596 espécies (UETZ & HALLERMANN, 2012). Estes vêm sofrendo grandes perdas de espécies no decorrer da história e, das 23 ordens existentes no passado, restaram apenas quatro: Testudines, constituída por jabutis, cágados e tartarugas; Crocodylia com jacarés, crocodilos, aligátors e gaviais; Rhynchocephalia com os tuataras e Squamata formada por serpentes, lagartos e anfisbenas (ORR, 1986; GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994; STORER *et al.*, 2000; GOULART, 2004).

A ordem Testudines está subdividida em duas subordens: Cryptodira (cripto: escondido; dire: pescoço), retraem a cabeça horizontalmente para dentro do casco; dividida em três superfamílias: Testudinoidea, Trionychoidea e Chelonioidea, que incluem tartarugas, cágados e jabutis encontrados, em sua maioria, no Hemisfério Sul, com formas terrestres e aquáticas na América do Sul, terrestres na África e sem representantes na Austrália. Pleurodira (pleuro: lado), retraem a cabeça e o pescoço lateralmente, dividida em duas famílias: Chelidae e Pelomedusidae encontrados apenas no Hemisfério Sul (POUGH *et al.*, 2003; GOULART, 2004).

Entre os Pleurodira a família Chelidae é considerada a mais rica, com 19 espécies ocorrendo no Brasil sendo estas distribuídas em cinco gêneros: *Achantochelys*, *Chelus*, *Hydromedusa*, *Phrynops* e *Platemys*, sendo o gênero *Phrynops* o menos conhecido da família e também o mais complexo e diverso taxonomicamente. (MITTERMEIER *et al.*, 1980; MOLINA, 1998).

De todos os membros da família Chelidae, *Phrynops geoffroanus* apresenta a distribuição geográfica mais ampla. A espécie é amplamente distribuída em regiões neotropicais (Amazônia Colombiana, Venezuela, as Guianas, Uruguai, norte da Argentina, e no Brasil de norte a sul). E, como outros quelônios, são ovíparos com fertilização interna e têm um sistema reprodutor adaptado para essa condição (GUIX *et al.*, 1989; MCCORD *et al.*, 2001.)

No geral, as fêmeas dos répteis possuem um par de ovários e um par de ovidutos que conduzem o ovo desde a ovocitação até a oviposição e/ou parturição; sendo ainda o local para a fertilização e estocagem de espermatozoides (GIRLING, 2002). Nos indivíduos ovíparos, o oviduto participa ativamente da produção da casca que envolve o ovo e nos vivíparos atua na formação da placenta (GIRLING, 2002). O termo oviduto, em répteis, designa as estruturas derivadas dos ductos de Müller no período embrionário (WAKE, 1985). Em geral, o oviduto pode ser dividido anatomicamente em cinco regiões, seguindo a orientação da porção cranial para a caudal: infundíbulo, tuba uterina (magno), istmo, útero e vagina (GIRLING, 2002).

As Células Neuroendócrinas (PEARSE, 1977) ou paraneurônios (FUJITA, 1976, 1980) produzem bio-aminas e/ou peptídeos hormonais e estão distribuídas por todo o organismo das muitas espécies de animais. Estas células, que compõem o Sistema Neuroendócrino Difuso, podem ser detectadas através de técnicas imuno-histoquímicas para a localização de aminas específicas. Mais de 35 tipos diferentes de células do referido sistema estão descritas na mucosa do estômago, nos intestinos delgado e grosso, no pâncreas endócrino, no sistema respiratório, na tireóide, na hipófise e na próstata (GARTNER & HIATT, 1999; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Este é um dos campos da pesquisa que mais rapidamente se desenvolve especialmente no que diz

respeito aos hormônios gastrintestinais (WU *et al.*, 1997; ZHANG & LI, 1997; ZHU *et al.*, 1999).

A estrutura e função do oviduto de répteis são pouco estudadas, principalmente em tartarugas. No Brasil, os trabalhos referentes à biologia reprodutiva de *P. geoffroanus*, são principalmente relacionados à descrição do comportamento reprodutor e nidificação; não existindo estudos relativos à descrição histológica e imunolocalização de células endócrinas ao longo do oviduto.

O estudo tem por objetivos a descrição da anatomia microscópica com auxílio de técnicas histológicas e histoquímicas e a detecção de células endócrinas específicas utilizando método imuno-histoquímico em cada segmento do oviduto de *Phrynops geoffroanus*. Esta pesquisa fornecerá subsídios para comparações morfológicas entre espécies de répteis, embasando estudos filogenéticos.

2.0 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - A classe dos Répteis

Os répteis constituem uma classe de animais vertebrados tetrápodes, ectotérmicos e todos amniotas. Grande parte das espécies dos répteis é carnívora ou onívora. Herbívoros são limitados a algumas espécies de lagartos. A maioria dos répteis é ovípara, alguns são ovovivíparos e poucos são vivíparos (POUGH *et al.*, 2003).

Os répteis e os demais amniotas são classificados em Anapsida, Diapsida e Sinapsida. Os primeiros são representados pelos répteis que não possuem nenhuma fossa temporal, denominados Chelonia ou Testudomorpha. Os Diapsidas possuem duas aberturas temporais no crânio e são representados pelos Lepidosauromorpha (lagartos, serpentes, tuataras e anfisbenias) e pelos Archosauromorpha (crocodilianos e aves). Os Sinapsidas apresentam uma abertura temporal lateral, tendo como representantes os Pelycosaurias e os Therapsidas, ambos extintos, e os mamíferos dos dias atuais (POUGH *et al.*, 2003).

2.2 - A ordem Testudines

A ordem Testudines, constituída por 302 espécies de tartarugas, cágados e jabutis encontra-se dividida em duas subordens. A principal característica dessa ordem é o casco que reveste o corpo do animal, formado pela fusão das costelas, vértebras torácicas, lombares e sacrais e alguns ossos das cinturas pélvica e torácica. A carapaça é a porção convexa - dorsal e o plastrão é a porção ventral plana ou côncava.

Possuem espécies que ocupam diferentes habitats: algumas exclusivamente terrestres, como os jabutis (*Geochelonia sp.*); outras que vivem em ambientes fluviais e lacustres, como os cágados (*Phrynops sp.*); algumas exclusivamente marinhas, como as tartarugas (*Caretta caretta*), e ainda, aquelas que vivem em ambientes terrestres e de água doce como a Apera (*Rhynoclemmys punctularia*) (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994; GOULART, 2004).

2.3 - A espécie estudada

A espécie *Phrynops geoffroanus*, popularmente conhecida como cágado-de-barbelas ou cágado-de-barbicha, foi descrita pela primeira vez no Brasil por Schweigger (1812). Também é conhecida por cangapara, lalá, cágado-do-rio, tartaruga-do-pescoço-de-cobra (português); Geoffroy's Side-Necked Turtle (inglês) e bachala, huele feo (espanhol). São animais de hábitos diurnos, com alimentação basicamente carnívora constituída por pequenos peixes, coleópteros, minhocas, insetos aquáticos e aves aquáticas encontrados em rios, lagos e lagoas com correnteza lenta (PRITCHARD & TREBBAU, 1984).

Taxonomicamente ela é classificada como:

Filo Chordata

Subfilo Vertebrata

Superclasse Tetrapoda

Classe Reptilia

Subclasse Anapsida

Ordem Testudines

Subordem Pleurodira

Família Chelidae

Subfamília Austrochelidinae

Gênero *Phrynops*

No Brasil, a espécie é registrada na Região Norte, nos estados do Pará, Amazonas e Rondônia; na Região Sudeste, em Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro; na Região Centro-Oeste, no Mato Grosso do Sul e Goiás; na Região Nordeste, no Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte; e na Região Sul, Paraná e Rio Grande do Sul (FACHÍN-TERÁN *et al.*, 1994; SOUZA & ABE, 2001; SOUZA *et al.*, 2008; VOGT, 2008; FERRONATO *et al.*, 2009; PINÃ *et al.*, 2009; SCHNEIDER *et al.*, 2009).

A cabeça de *P. geoffroanus* é larga e lisa, com coloração preta, linhas brancas e irregulares e, na parte inferior, branca com linhas e pontos pretos. Os olhos estão deslocados lateralmente e a característica mais proeminente dessa espécie é uma linha preta e larga que se estende longitudinalmente pelo olho, e um par de barbelas na mandíbula com a extremidade preta, que a difere da *Phrynops hilarii*, cujas extremidades são brancas. Os membros são cinza com manchas brancas (PRITCHARD, 1979; PRITCHARD & TREBBAU, 1984; ERNST & BARBOUR, 1989).

Existe dimorfismo sexual em tamanho e massa: machos são menores e menos pesados, possuem caudas mais compridas, grossas e aberturas cloacais mais distais em comparação com as fêmeas. Indivíduos jovens podem apresentar uma quilha mediana na carapaça, que desaparece nos adultos (ERNST & BARBOUR, 1989).

2.4 - Sistema Reprodutor Feminino de *Phrynops geoffroanus*

O sistema reprodutor feminino do cágado-de-barbelas é constituído por um par de ovários, um par de ovidutos, cloaca e clitóris e apresenta as mesmas características anatômicas descritas para a maioria dos répteis (ASHLEY, 1974). Este sistema em *Phrynops geoffroanus* encontra-se posicionado na região posterior da cavidade pleuroperitoneal do animal, juntamente com outros órgãos como o intestino, rins, vesícula urinária e as vesículas urinárias acessórias (ZAGO, 2007).

Os ovários são estruturas saculiformes com folículos ovarianos em vários estágios de desenvolvimento. Dos ovários partem os ovidutos, estruturas tubulares e sinuosas de coloração esbranquiçada (GOULART, 2004; ZAGO, 2007). Na maioria dos répteis, ambos os ovidutos são funcionais e separados em toda sua extensão, juntando-se posteriormente em uma cloaca (FOX, 1977).

2.5 - Peptídeos reguladores e aminas biogênicas pesquisadas

Serotonina

A 5-hidroxitriptamina ou serotonina (5-HT) é um neurotransmissor sintetizado por neurônios serotoninérgicos do sistema nervoso central (SNC) e por células endócrinas no sistema digestório. A serotonina tem uma ação moduladora geral da conduta afetiva associada a ações sobre a cognição e comportamentos homeostáticos. Assim sendo, a 5-HT influi sobre quase todas as funções cerebrais, inibindo-a ou estimulando múltiplos sistemas de neurotransmissão. A serotonina também age aumentando a motilidade intestinal (GARTNER & HIATT, 1999; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

O papel funcional da serotonina em relação ao sistema urogenital é desconhecido, entretanto no sistema gastro-entero-pancreático a serotonina estimula a secreção exócrina dos epitélios, particularmente das células mucosas (FURNESS & COSTA, 1982).

Somatostatina

O termo somatostatina refere-se a uma família de peptídeos: somatostatina-14, somatostatina-28 e somatostatina 28 (FRANKS, 1998; BACHELOT *et al.*, 2002). A somatostatina tem a capacidade de inibir secreções endócrinas e exócrinas no trato gastrointestinal (REICHLIN, 1983a), geralmente é liberada através de processos citoplasmáticos em espaços intersticiais, atuando de forma parácrina nas células vizinhas (REICHLIN, 1983b).

Motilina

A motilina é um peptídeo de 22 aminoácidos, originalmente extraído da mucosa duodeno-jejunal, estando presente nas células argentafins ou enterocromafins (CE) do intestino delgado de vários mamíferos (POITRAS *et al.*, 1994). A motilina é secretada a cada 100 minutos para estimular o complexo motor de migração que ajuda a limpar o estômago e intestino delgado de material não digerido. Participa no controle das contrações do músculo liso no tubo digestivo superior (CHAN-PALAY *et al.*, 1982; FANG *et al.*, 2004).

CAPÍTULO I

Descrição histológica e histoquímica do oviduto de *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae)

3.1 - OBJETIVOS

- Descrever com auxílio do microscópio de luz a morfologia das distintas regiões do oviduto de *P. geoffroanus*.
- Analisar as reações histoquímicas da mucosa nos segmentos do oviduto deste cágado.
- Originar dados morfológicos que possam contribuir para estudos filogenéticos entre os Testudines e os demais répteis.

3.2 - MATERIAL E MÉTODOS

Para realização deste estudo foram coletados o oviduto de quatro espécimes de fêmeas adultas 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 1) e estão acondicionados em meio líquido, solução de formol 10%, e devidamente etiquetados. Os ovidutos coletados foram encaminhados ao Laboratório de Histologia e Embriologia da UFRRJ.



Figura 1: Exemplar de *Phrynops geoffroanus*.

Tabela 1. Fêmeas de *P. geoffroanus* utilizadas nesse estudo, pertencentes à Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da UFJF, MG.

Número tombo	Procedência
564	Museu Mariano Procópio, Juiz de Fora, MG.
566	Museu Mariano Procópio, Juiz de Fora, MG.
568	Museu Mariano Procópio, Juiz de Fora, MG.
___	IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis de Juiz de Fora, MG.

3.2.1 - Preparação dos cortes histológicos

No Laboratório os órgãos foram clivados em seções transversais e submetidos aos processamentos de técnica histológica de rotina que incluíram: desidratação (em uma série crescente de etanol de 70° GL a 100° GL), diafanização em xilol I e II, impregnação e inclusão em Histosec (Merck, Darmstadt, Germany). Posteriormente foram obtidos em micrótomo cortes histológicos de 5 µm espessura. Para o exame da arquitetura do oviduto de *P. geoffroanus* ao microscópio de luz, as seções foram coradas pelas técnicas histológicas de Hematoxilina-Eosina (HE), para descrição histológica do órgão e do Tricrômico de Mallory, para diferenciação de fibras colágenas e musculares e para avaliação do padrão morfológico das fibras musculares (KIERNAN, 1990). Também foram utilizadas as técnicas histoquímicas do Alcian Blue (AB) pH 2.5 e do Ácido Periódico-Reativo de Schiff (PAS) para detecção de glicosaminoglicanas ácidas e neutras, respectivamente e de Xylidine Ponceau para observação de proteínas gerais (KIERNAN, 1990). Após as colorações específicas todas as lâminas foram montadas com lamínula e Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

3.2.2 - Observações e Fotomicrografias

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

3.3 - RESULTADOS

P. geoffroanus apresenta um oviduto esquerdo e um direito, ambos morfológicamente desenvolvidos e fisiologicamente funcionais, que se iniciam junto aos ovários até se inserirem na cloaca, sendo localizados dorsalmente um em cada lado do corpo. A análise microscópica desses ovidutos demonstrou que estes tubos podem

ser subdivididos em cinco regiões histologicamente distintas, partindo do ovário em direção à cloaca: infundíbulo, tuba uterina (magno), istmo (região de transição), útero e vagina (Figura 2).

Histologicamente, o oviduto do cágado-de-barbicha encontra-se organizado em três camadas distintas do lúmen para a cavidade celomática: mucosa, muscular e serosa. A camada mucosa é composta por duas camadas funcionalmente relacionadas; o epitélio e a lâmina própria altamente vascularizada, formada por tecido conjuntivo. A camada muscular é composta por fibras musculares lisas dispostas formando uma ou mais camadas de acordo com a região específica do oviduto e a serosa que consiste de uma fina camada de tecido conjuntivo coberta por uma única camada de epitélio pavimentoso.



Figura 2: Oviduto de *Phrynops geoffroanus* com tamanho médio de 23 cm subdivido em cinco regiões.

3.3.1 - Infundíbulo

O infundíbulo é definido como a região mais cranial do oviduto, que apresenta o óstio na porção próxima ao ovário, responsável por receber o ovócito liberado após a ovocitação.

A histologia do infundíbulo evidenciou uma delgada camada mucosa, formando pequenos sulcos, revestida por um epitélio simples cilíndrico com células ciliadas e não ciliadas (Figura 3A). Logo abaixo das células epiteliais, encontra-se uma lâmina própria aglandular formada por tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado por vênulas, arteríolas e vasos linfáticos (Figura 3B). As células epiteliais desta região não apresentam produção de glicosaminoglicanas ácidas e neutras (Tabela 2), uma vez que reagem negativamente ao AB (pH 2,5) e ao PAS (Figuras 4A e 4B).

A camada muscular, pouco desenvolvida nesta região, apresenta feixes de fibras musculares lisas orientados em um sentido visualmente longitudinal, visto que são histologicamente organizados em espiral (Figura 5A). A camada serosa, que envolve a camada muscular, é formada por um epitélio simples pavimentoso recobrindo uma delicada camada de tecido conjuntivo. Ao serem submetidas à técnica de Xylidine Ponceau todas as estruturas foram fracamente coradas (Figura 5B), demonstrando um baixo teor de proteínas no infundíbulo (Tabela 2).

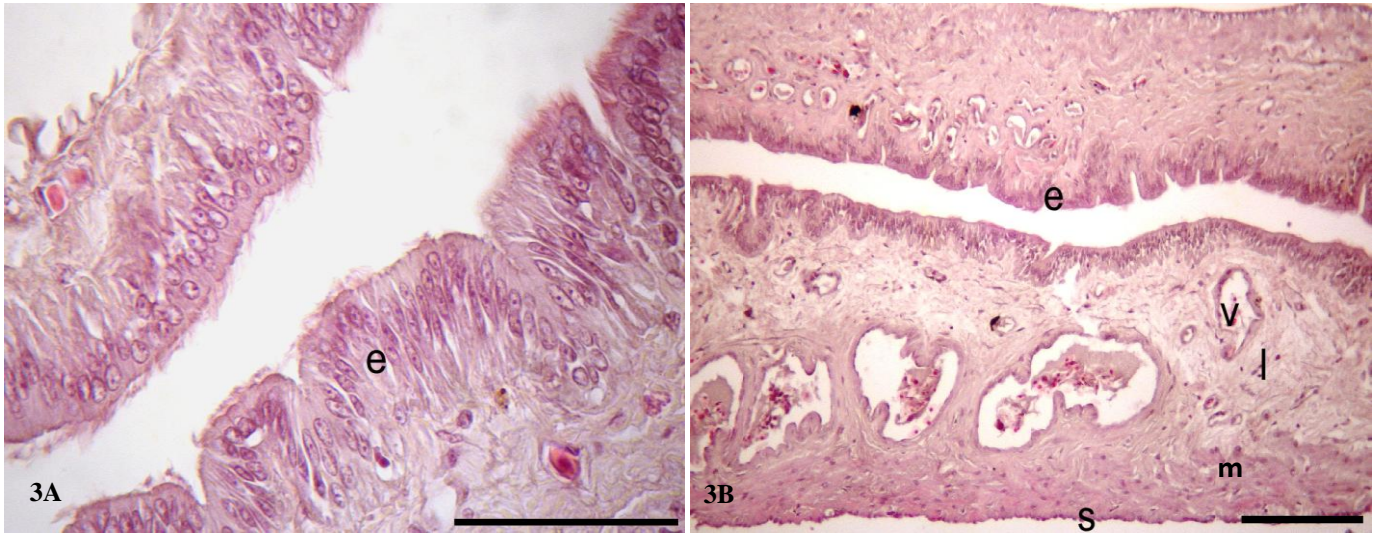


Figura 3: Fotomicrografias do infundíbulo de *P. geoffroanus*. 3A: Camada mucosa com epitélio simples cilíndrico com células ciliadas e não ciliadas (e). HE. 3B: Camada mucosa com epitélio (e) e lâmina própria (l) vascularizada (v), camada muscular pouco desenvolvida (m) e camada serosa (s). HE. Barra de 100 µm.

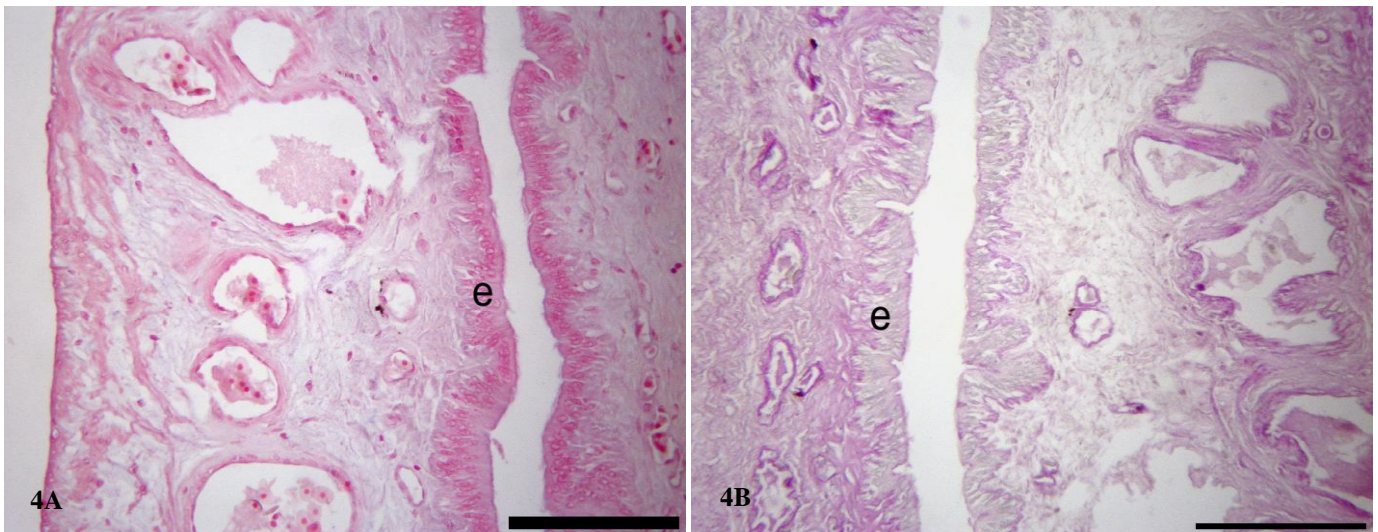


Figura 4: Fotomicrografias do infundíbulo de *P. geoffroanus*. 4A: Camada mucosa com epitélio negativo para glicosaminoglicanas (GCs) ácidas (e). AB. 4B: Camada mucosa com epitélio negativo para glicosaminoglicanas (GCs) neutras (e). PAS. Barra de 100 µm.

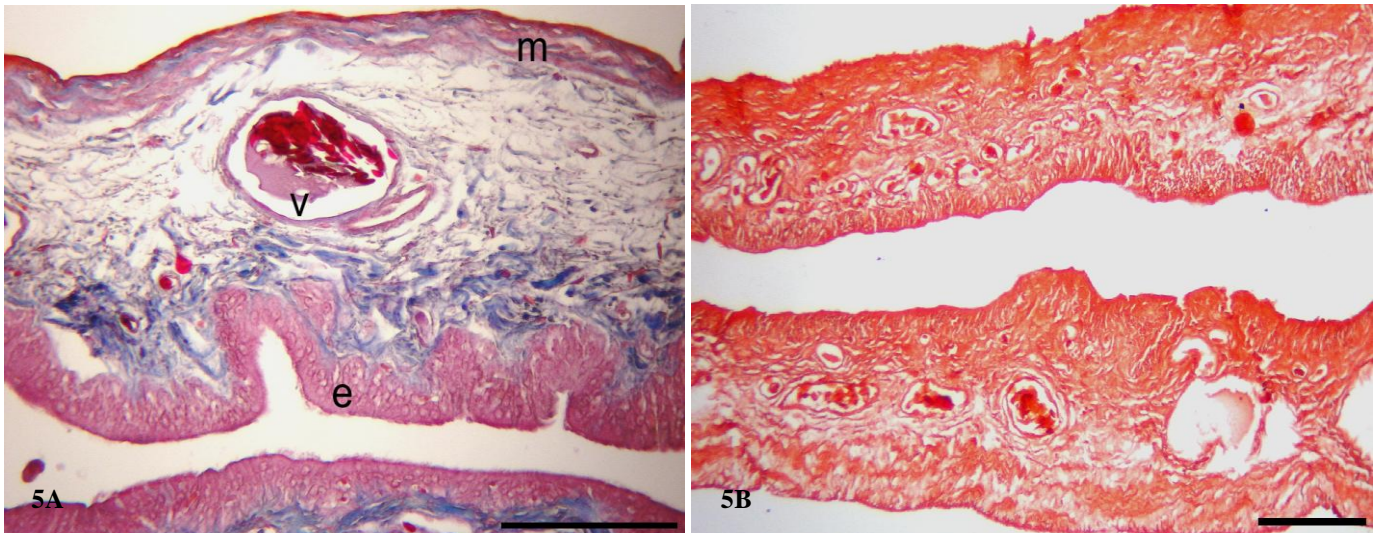


Figura 5: Fotomicrografias do infundíbulo de *P. Geoffroyanus*. 5A: Camada mucosa com epitélio (e) e lâmina própria vascularizada (v) e camada muscular (m). Tricrômico de Mallory. 5B: Região do infundíbulo com todas as camadas coradas fracamente para proteínas gerais. Xylidine Ponceau. Barra de 100 µm.

Tabela 2: Reações histoquímicas do epitélio e das glândulas das diferentes regiões do oviduto de *P. Geoffroyanus*.

Regiões		Colorações Histoquímicas		
		AB	PAS	XYLIDENE PONCEAU
Infundíbulo	Epitélio	-	-	±
Tuba Uterina	Epitélio	+	+	-
	Glândulas	-	±	+
Istmo	Epitélio	+	+	-
	Glândulas	-	-	+
Útero	Epitélio	-	-	±
	Glândulas	±	±	+
Vagina	Epitélio	±	±	±
	Epitélio das glândulas	+	+	±

Reação: -, negativa; ±, fraca a moderada; +, positiva.

3.3.2 - Tuba Uterina (Magno)

Macroscopicamente, a tuba uterina é a maior região do oviduto situada entre o infundíbulo e o istmo, caracterizada por apresentar criptas rasas e algumas profundas (Figura 6A).

A camada mucosa da tuba uterina, mais desenvolvida que a observada no infundíbulo (Figura 6B), encontra-se protegida por um epitélio pseudoestratificado cilíndrico com células mucossecretoras, algumas células ciliadas e células basais (Figura 7A e 7B). O epitélio da tuba demonstrou atuar ativamente na produção de glicosaminoglicanas ácidas e neutras, visto que o mesmo apresentou intensa reação positiva ao AB e PAS, respectivamente (Figuras 8A e 8B) (Tabela 2). A lâmina própria é formada por tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado e uma grande quantidade de glândulas tubulares, que reagem fracamente ao PAS e não apresentam reação ao AB (pH 2,5), indicando que estas glândulas podem atuar na produção de glicosaminoglicanas neutras.

A camada muscular, situada logo abaixo da mucosa, é formada por feixes de fibras musculares lisas orientados visualmente longitudinal (Figura 9A), assim como o observado no infundíbulo. A camada serosa que aparece envolvendo toda essa região é formada por um epitélio simples pavimentoso recobrimo uma delgada camada de tecido conjuntivo, da mesma forma como no infundíbulo.

As glândulas da lâmina própria reagiram positivamente à técnica de Xylidine Ponceau (Figura 9B), o que demonstra presença de proteínas ao longo da tuba uterina e em suas secreções (Tabela 2).



Figura 6: Fotomicrografias da tuba uterina de *P. geoffroanus*. 6A: Camada mucosa com criptas rasas; lâmina própria glandular (g) e vascularizada (v) e camada muscular (m). HE. 6B: Camada mucosa mais espessa com epitélio (e) e glândulas (g) na lâmina própria; camada muscular (m) e camada serosa (s). HE. Barra de 100 μ m.

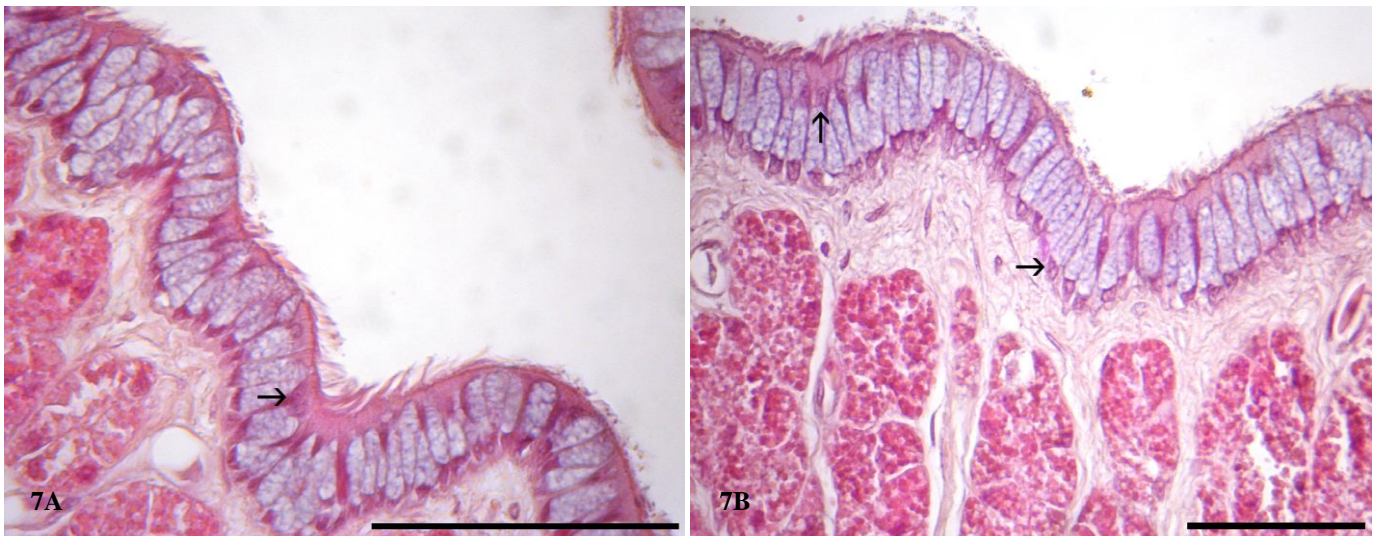


Figura 7: Fotomicrografias da tuba uterina de *P. geoffroanus*. 7A: Camada mucosa recoberta por epitélio pseudoestratificado cilíndrico com células mucossecretoras, células ciliadas e células basais. HE. 7B: Camada mucosa protegida por epitélio com diferentes tipos celulares (setas). HE. Barra de 100 µm.

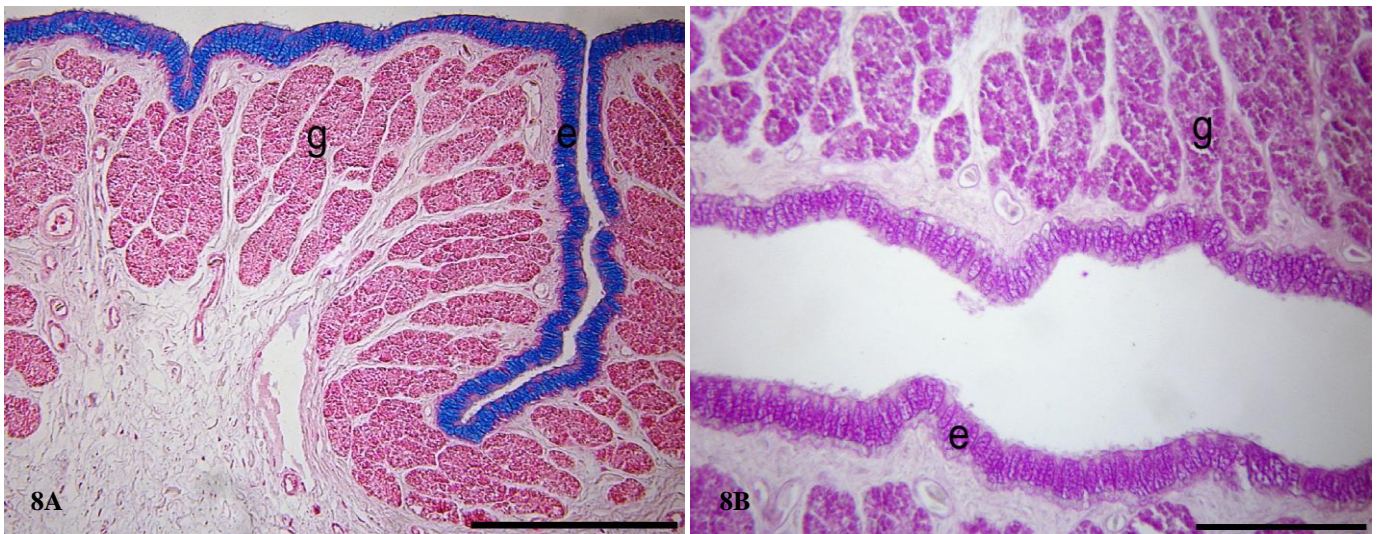


Figura 8: Fotomicrografias da tuba uterina de *P. geoffroanus*. 8A: Camada mucosa com epitélio positivo (e) e glândulas negativas (g) para glicosaminoglicanas ácidas. PAS. HE. 8B: Camada mucosa com epitélio positivo (e) e glândulas fracamente coradas (g) para glicosaminoglicanas neutras. PAS. HE. Barra de 100 µm.

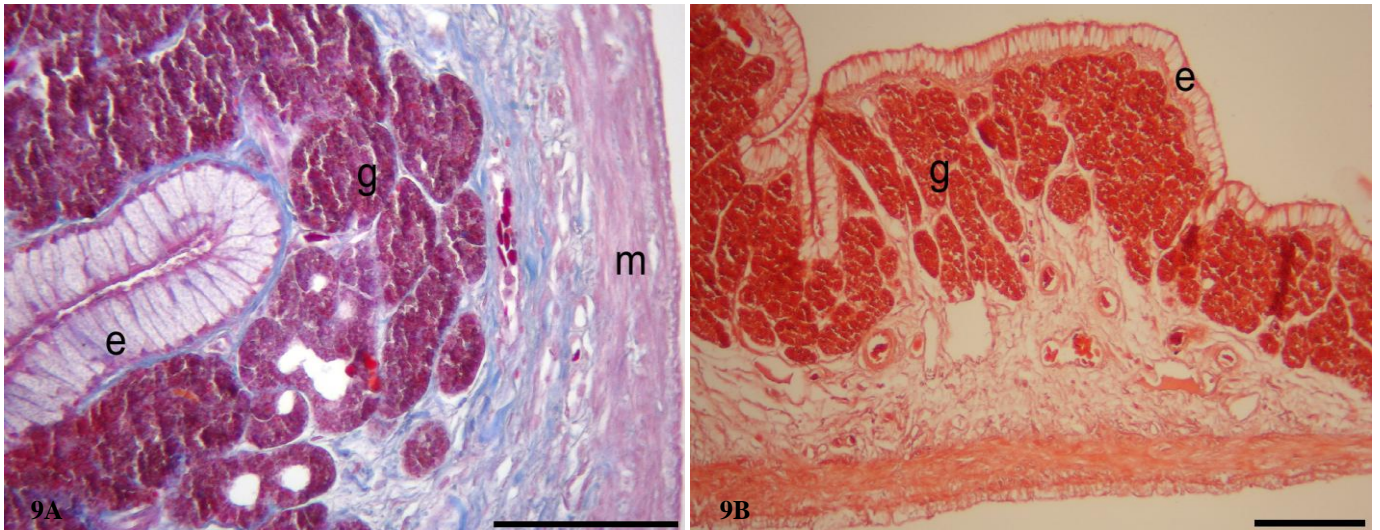


Figura 9: Fotomicrografias da tuba uterina de *P. geoffroanus*. 9A: Região da tuba uterina com camada mucosa formada por epitélio (e) e glândulas (g) e camada muscular (m). Tricrômico de Mallory. 9B: Região da tuba uterina com glândulas coradas intensamente. Xylidine Ponceau. Barra de 100 µm.

3.3.3 - Istmo

A microscopia de *P. geoffroannus* revela o istmo como uma zona de transição do oviduto, ou seja, uma junção entre a tuba uterina e o útero.

A mucosa é caracterizada por apresentar criptas mais profundas que as observadas na tuba uterina (Figura 10A). O epitélio é pseudoestratificado cilíndrico com células mucossecretoras, células ciliadas e células basais (Figura 10B), que reagem positivamente ao AB (pH 2,5) e ao PAS indicando a produção de glicosaminoglicanas ácidas e neutras (Figuras 11A e 11B) (Tabela 2). A lâmina própria do istmo apresenta uma redução em número das glândulas quando comparadas às observadas na tuba uterina, sendo que estas apresentam reação negativa às técnicas histoquímicas do AB (pH 2,5) e PAS (Tabela 2). Esta lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo é marcada por uma intensa vascularização (Figura 12A).

Na camada muscular observam-se fibras de músculo liso visualmente orientadas em dois sentidos, um circular interno e um longitudinal externo. Esta camada é mais espessa que a da tuba, no entanto menos que a dupla camada de músculo observada no útero e vagina. A serosa do istmo é semelhante à descrita para os outros segmentos.

A técnica de Xylidine Ponceau marcou as glândulas da lâmina própria (Figura 12B)(Tabela 2), assim como ocorrido na tuba uterina, indicando um elevado teor de proteínas no istmo e em suas secreções.



Figura 10: Fotomicrografias do istmo de *P. geoffroanus*. 10A: Camada mucosa com criptas profundas formada por epitélio (e) e lâmina própria glandular (g); nota-se um número reduzido de glândulas (*). HE. 10B: Camada mucosa com epitélio pseudoestratificado cilíndrico mucossecretor (e) e lâmina própria da mucosa (l) com glândulas (g). HE. Barra de 100 µm.

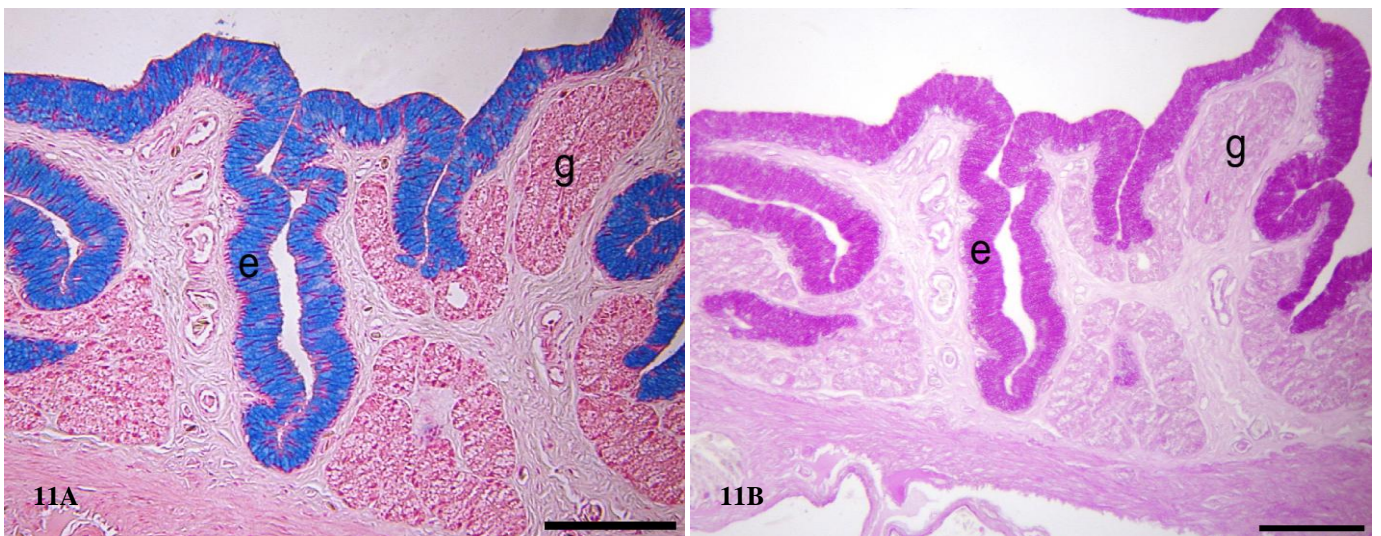


Figura 11: Fotomicrografias do istmo de *P. geoffroanus*. 11A: Camada mucosa com epitélio positivo para glicosaminoglicanas ácidas (e) e glândulas negativas (g). AB. 11B: Camada mucosa com epitélio positivo para glicosaminoglicanas neutras (e) e glândulas negativas (g). PAS. Barra de 100 µm.

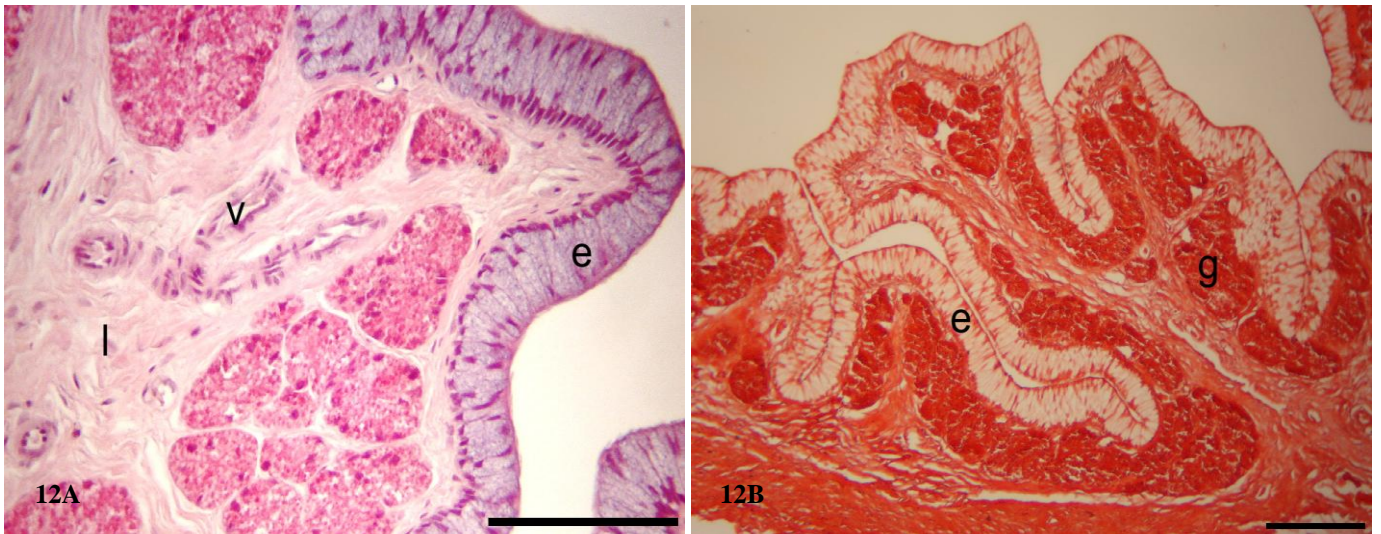


Figura 12: Fotomicrografias do istmo de *P. geoffroanus*. 12A: Camada mucosa com epitélio (e) e lâmina própria da mucosa (l) vascularizada (v). HE. 12B: Região do istmo com epitélio negativo (e) para proteínas gerais e glândulas intensamente coradas (g). Xylidine Ponceau. Barra de 100 μ m.

3.3.4 - Útero

O útero é uma das regiões mais espessas do oviduto, a mucosa é caracterizada por pregas longas que formam recessos profundos (Figura 13A). As células que formam o epitélio desta região, em *P. geoffroannus*, não são tão altas como as da tuba uterina e do istmo, entretanto, também foram evidenciados três tipos celulares, células cilíndricas secretoras com núcleos basais, células cilíndricas ciliadas com núcleos apicais e células basais, assim como observado na tuba uterina e no istmo. As células epiteliais demonstram reação negativa ao AB (pH 2,5) e PAS (Tabela 2), portanto estas não atuam na produção de glicosaminoglicanas ácidas e neutras.

A lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo é intensamente vascularizada. Verificou-se a presença de glândulas tubulares na lâmina própria, aqui denominadas glândulas uterinas ou glândulas da casca (Figura 13B). As glândulas uterinas reagem negativamente às técnicas histoquímicas utilizadas para detecção de gliocosaminoglicanas ácidas e neutras. Contudo, as células cúbicas que revestem o ducto das glândulas apresentam grânulos AB (pH 2,5) e PAS positivos (Figuras 14A e 14B) (Tabela 2).

No útero observa-se uma espessa camada de músculo liso, distinguindo uma circular interna e uma longitudinal externa (Figura 15A), separadas por uma fina camada tecido conjuntivo. A camada serosa que circunda a muscular é semelhante aos demais segmentos anteriores.

Quando submetida á técnica de Xylidine Ponceau, a região uterina apresentou uma reação mais intensa nas glândulas uterinas (glândulas da casca) (Figura 15B) (Tabela 2) e algumas células dispersas entre as células epiteliais demonstraram uma coloração ainda mais forte.

Identifica-se no final do segmento uterino, uma mudança gradativa desta região para a vagina, observando características histológicas similares a ambas (Figura 16).

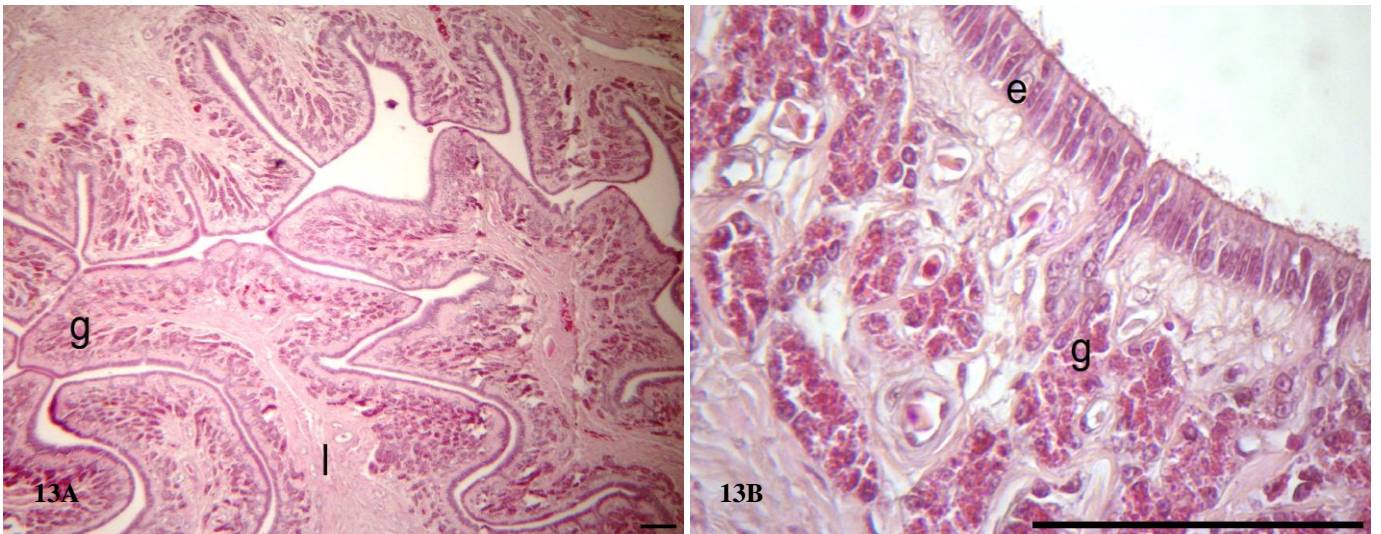


Figura 13: Fotomicrografias do útero de *P. geoffroanus*. 13A: Camada mucosa pregueada com lâmina própria da mucosa (l) com glândulas uterinas (g). HE. 13B: Camada mucosa com epitélio pseudoestratificado cilíndrico com células ciliadas e não ciliadas (e) e glândulas uterinas (g). HE. (e) e glândulas negativas (g). PAS. Barra de 100 μm .

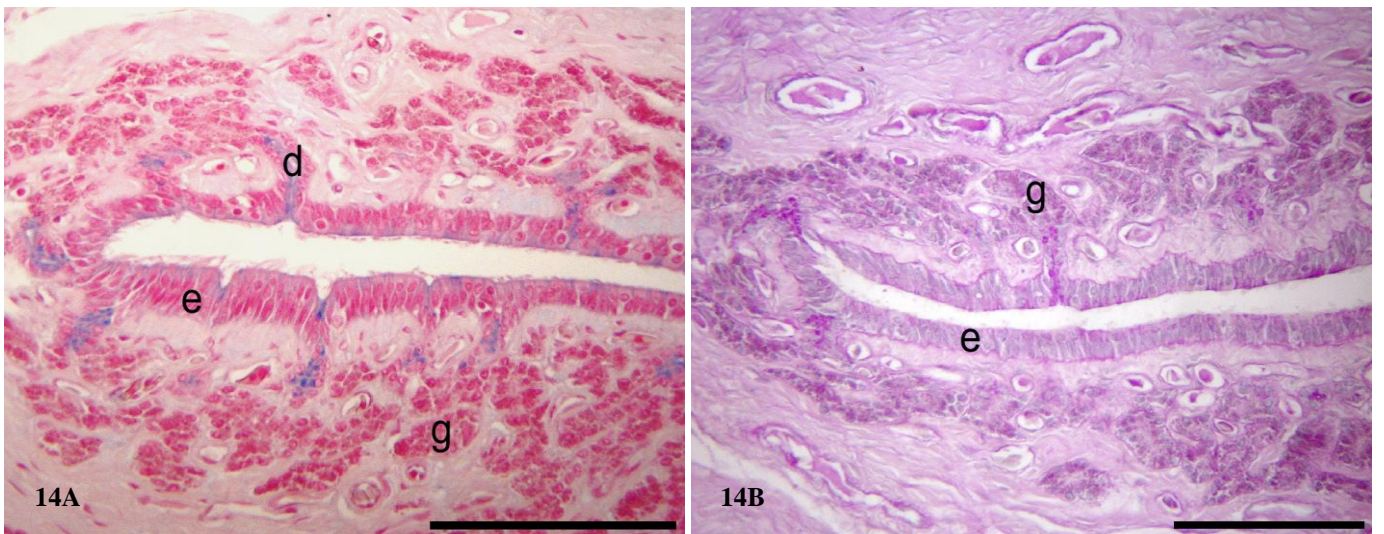


Figura 14: Fotomicrografias do útero de *P. geoffroanus*. 14A: Camada mucosa com epitélio (e) e glândulas uterinas (g) negativas para glicosaminoglicanas ácidas e ductos (d) das glândulas com células positivas. AB. 14B: Camada mucosa com epitélio (e) e glândulas uterinas (g) negativas para glicosaminoglicanas neutras. PAS. Barra de 100 μm .

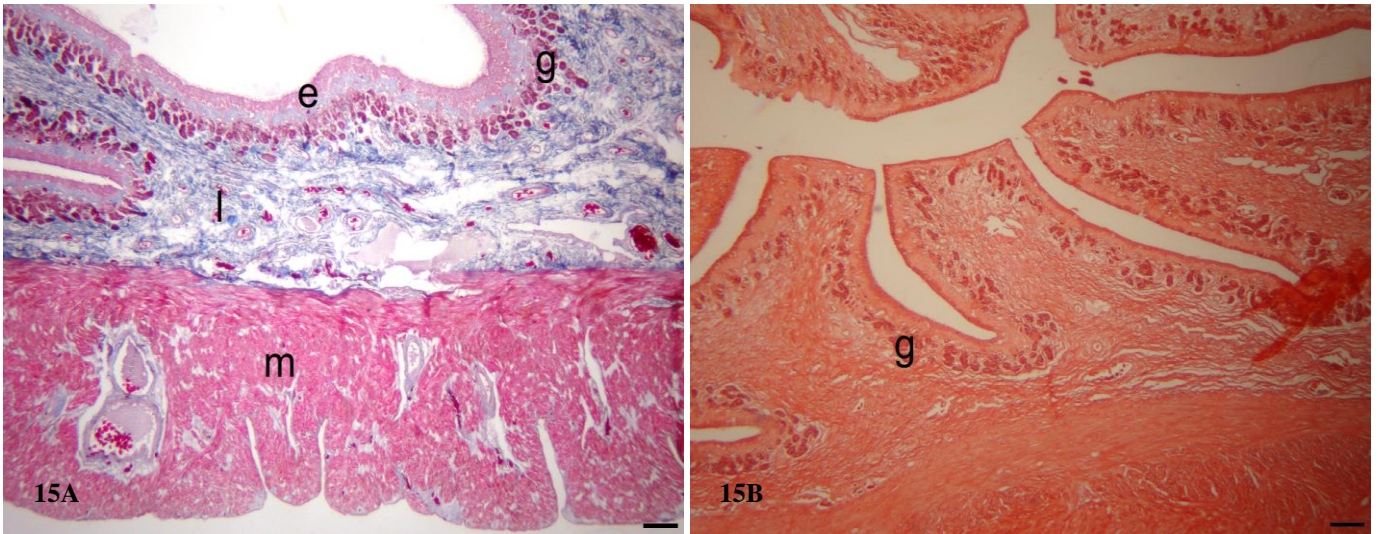


Figura 15: Fotomicrografias do útero de *P. geoffroanus*. 15A: Camada mucosa com epitélio (e), lâmina própria da mucosa (l) com glândulas uterinas (g) e camada muscular (m). Tricrômico de Mallory. 15B: Região do útero com reação para proteínas gerais mais intensa nas glândulas. Xylidine Ponceau. Barra de 100 µm.

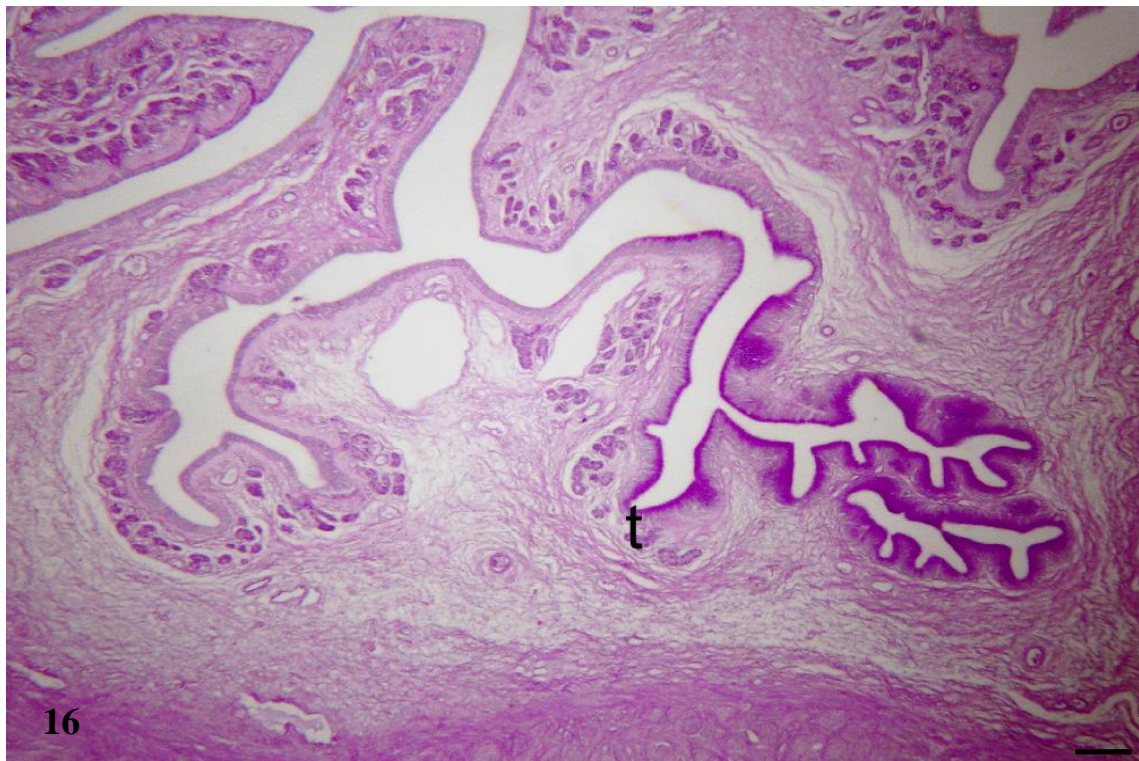


Figura 16: Fotomicrografia da região de transição (t) útero-vaginal de *P. geoffroanus*. PAS. Barra de 100 µm.

3.3.5 - Vagina

A vagina de *P. geoffroannus* é o último e mais espesso segmento do oviduto, responsável por transportar o ovo até a eliminação pela cloaca.

A vagina possui uma mucosa pregueada sustentada por uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo pouco vascularizado. A mucosa vaginal encontra-se revestida por um epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado com células mucossecretoras (Figura 17A) que reage levemente às técnicas para detecção de glicosaminoglicanas ácidas e neutras (Tabela 2). Deve-se ressaltar a quantidade de tecido linfático (células linfocitárias) observado na lâmina própria desta região (Figura 17B).

As pregas desta camada mucosa formam glândulas tubulares compostas revestidas por um epitélio simples cilíndrico ciliado, que desembocam diretamente no lúmen do órgão (Figura 18). O epitélio destas glândulas apresenta intensa positividade à técnica de AB (pH 2,5) e PAS (Figuras 19A e 19B), o que indica a produção de glicosaminoglicanas ácidas e neutras, respectivamente.

A musculatura vaginal é a mais espessa (Figura 20A), quando comparada com os segmentos anteriores, apresenta uma camada circular interna e uma longitudinal externa, recoberta igualmente por uma serosa como nas demais regiões.

A técnica de Xylidine Ponceau apresenta uma fraca reação em todas as camadas que constituem a vagina de *P. geoffroannus* (Figura 20B) (Tabela 2).

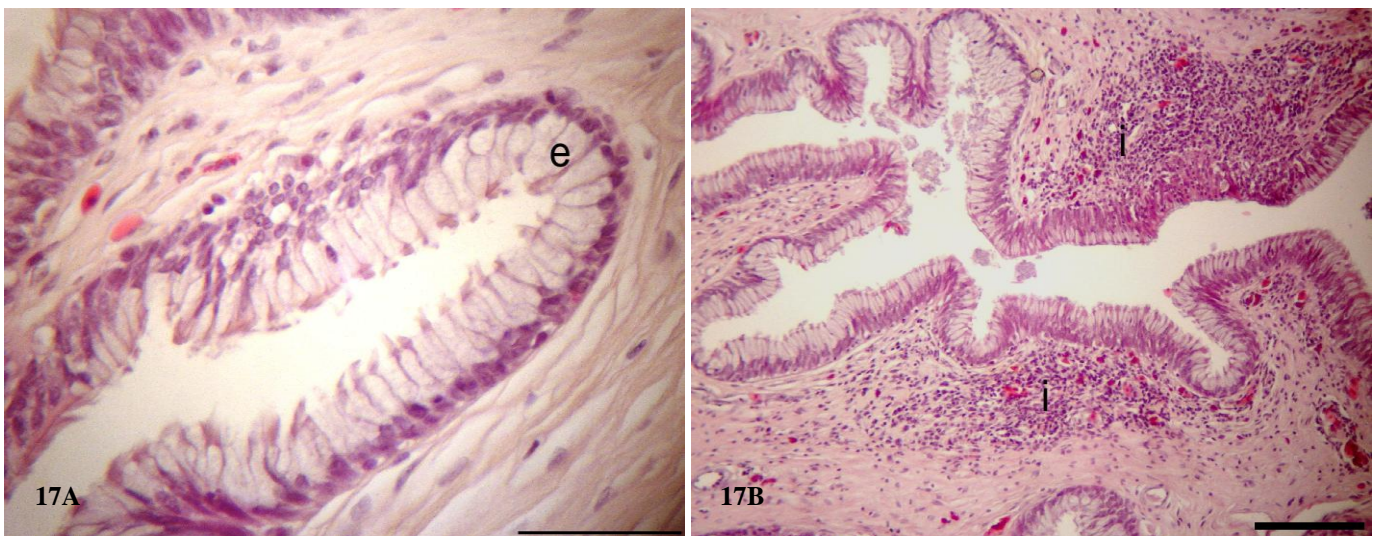


Figura 17: Fotomicrografias da vagina de *P. geoffroannus*. 17A: Camada mucosa recoberta por epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado com células mucossecretoras (e). HE. 17B: Camada mucosa com infiltrados linfocitários (i). HE. Barra de 100 µm.

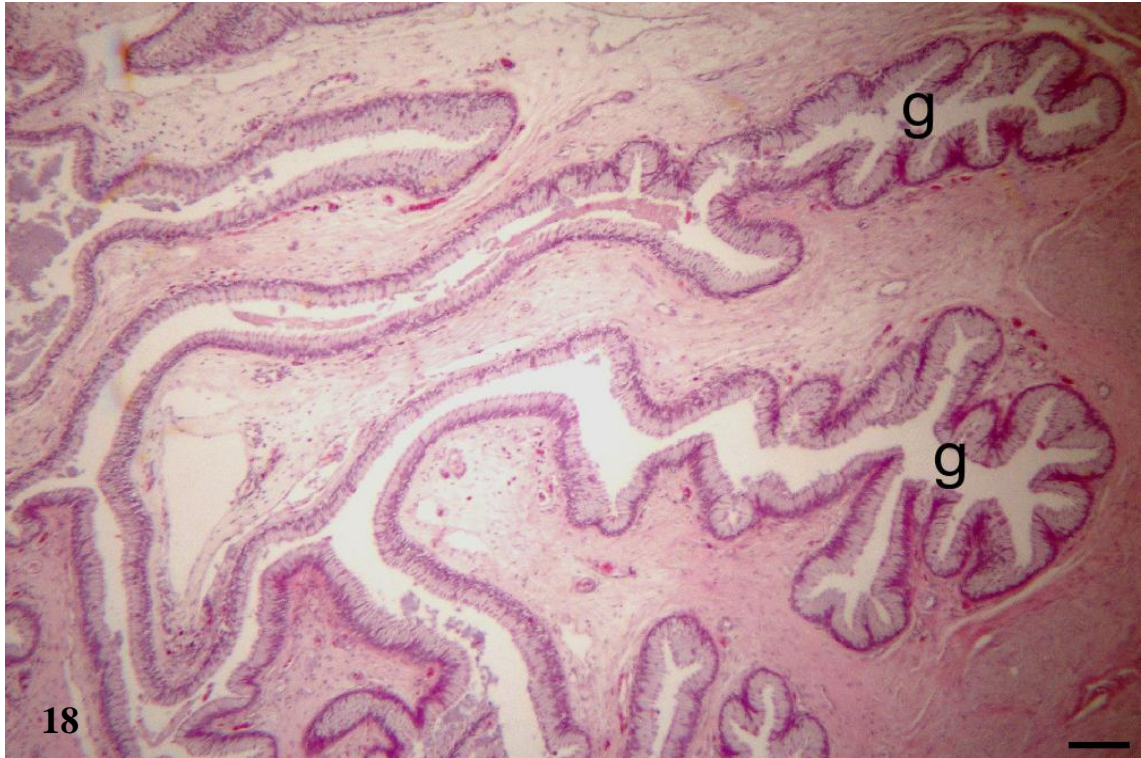


Figura 18: Fotomicrografia da vagina de *P. geoffroanus*. Camada mucosa formando glândulas tubulares recobertas por epitélio simples cilíndrico ciliado (e). HE. Barra de 100 µm.

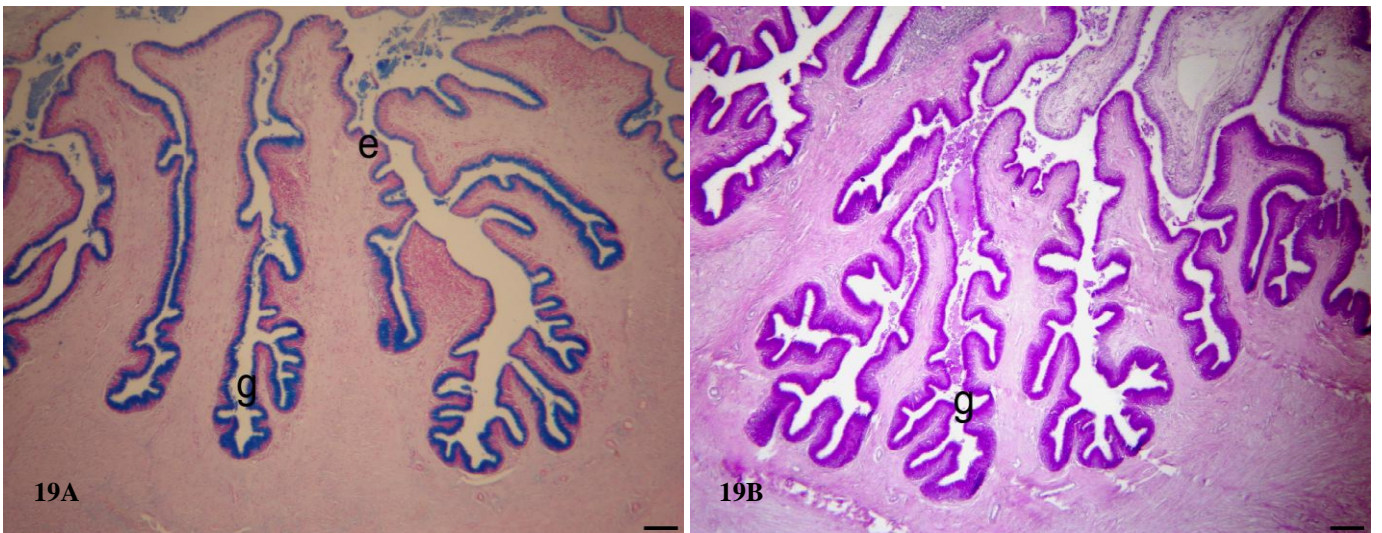


Figura 19: Fotomicrografias da vagina de *P. geoffroanus*. 19A: Camada mucosa com epitélio positivo (e) para glicosaminoglicanas ácidas nas glândulas. 19B: Camada mucosa com glândulas protegidas por epitélio positivo para glicosaminoglicanas neutras. PAS. Barra de 100 µm.

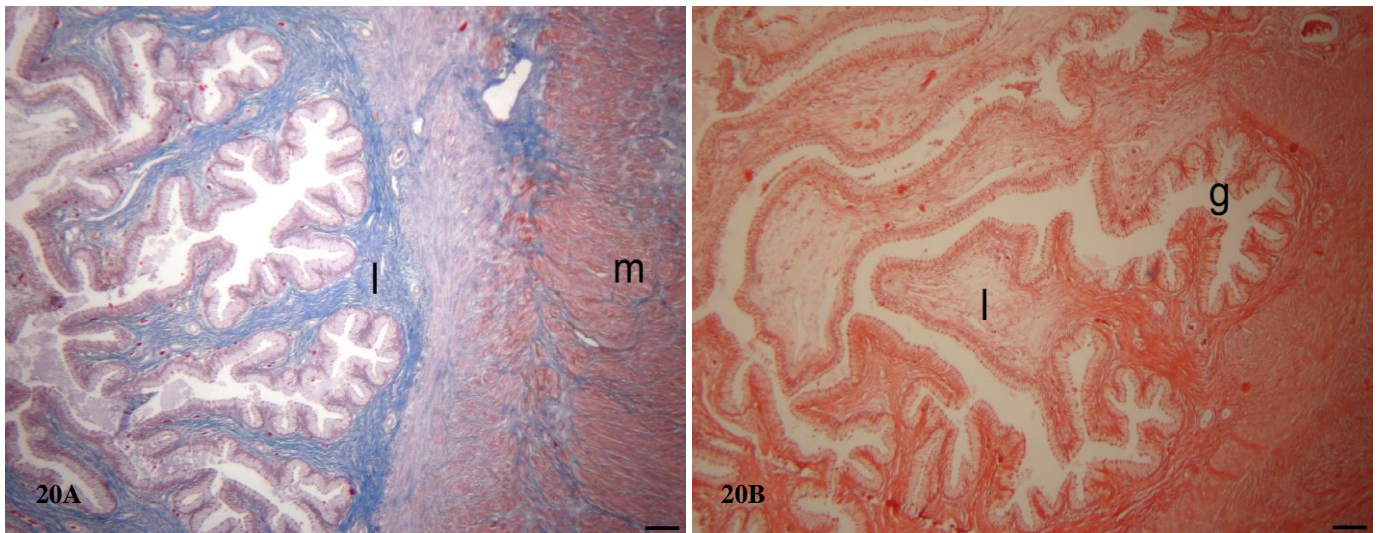


Figura 20: Fotomicrografias da vagina de *P. geoffroanus*. 20A: Lâmina própria da mucosa (l) e camada muscular (m). Tricrômico de Mallory. 20B: Lâmina própria da mucosa (l) e glândulas (g) com reação fraca para proteínas gerais. Xylidine Ponceau. Barra de 100 µm.

3.4 - DISCUSSÃO

Na maioria dos répteis, os ovidutos são estruturas emparelhadas, situadas dorsalmente nos dois lados do corpo, sendo ambos funcionais e separados, juntando-se na entrada da cloaca. Excetuam-se alguns lagartos que podem exibir um oviduto vestigial, normalmente o esquerdo (FOX, 1977). Assim como o referido para os répteis no geral, a espécie cágado-de-barbichas também apresenta dois ovidutos, localizados um em cada lado do corpo e ambos fisiologicamente ativos.

Morfologicamente, o oviduto de tartarugas e cágados é dividido em cinco regiões distintas; o infundíbulo; a tuba uterina; o istmo ou zona de transição; útero e vagina (FOX, 1977; GIST & JONES, 1988; PALMER & GUILLETE, 1988; GIRLING, 2002; ALKINDI *et al.*, 2006). Esta organização também foi observada no oviduto de *P. geoffroannus*, que apresenta as mesmas cinco regiões histologicamente divididas. No entanto, em outros répteis, o oviduto foi subdividido em três ou quatro regiões, como nos lagartos ovíparos *Crotaphytus collaris* e *Eumeces obsoletus* (GUILLETE *et al.*, 1989), na serpente *Diadophis punctatus* (PERKINS & PALMER, 1996), no lagarto vivíparo *Hoplodactylus maculatus* (GIRLING *et al.*, 1997), em outra serpente *Seminatrix pygaea* (SEVER *et al.*, 2000) e na lagartixa *Hemidactylus mabouia* (NOGUEIRA *et al.*, 2011).

A parede do oviduto de *P. geoffroannus* apresenta três camadas histológicas básicas que são da superfície externa para o lúmen: a serosa, a muscular e a mucosa, assim como observado nos ovidutos de alguns répteis, como na serpente *S. pygaea* (SEVER *et al.*, 2000) e na lagartixa *H. mabouia* (NOGUEIRA *et al.*, 2011).

O infundíbulo do cágado-de-barbicha, região responsável por receber o ovócito proveniente do ovário, não se encontra subdividido, diferente do observado na tartaruga *Gopherus polyphemus* (PALMER & GUILLETE, 1988) e nos lagartos ovíparos *C. collaris* e *E. obsoletus* (GUILLETTE *et al.*, 1989) que apresentam duas distintas porções: a anterior e a posterior. A região do infundíbulo é caracterizada por delgadas camadas histológicas, com a muscular pouco desenvolvida e a lamina própria da mucosa desprovida de glândulas, assim como verificado por Giersberg, 1923; Hansen & Riley, 1941; Ashley, 1974; Palmer & Guillette, 1988 E Guillette *et al.*, 1989.

A lâmina própria de *P. geoffroannus* encontra-se subjacente a um epitélio simples cilíndrico formado por células ciliadas e não ciliadas, resultado análogo ao observado na serpente *D. punctatus* (PERKINS & PALMER, 1996), no vivíparo *H. maculatus* (GIRLING *et al.*, 1997) e na lagartixa *H. mabouia* (NOGUEIRA *et al.*, 2011). A camada muscular é delgada, mas visível, entretanto não foi possível delimitar uma camada circular interna e uma longitudinal externa, do mesmo modo como o observado em *H. maculatus* (GIRLING *et al.*, 1997). O infundíbulo demonstra uma fraca reação à técnica de Xylidine Ponceau, o que indica que neste local não ocorre produção de proteínas gerais, do mesmo modo como notado em *H. mabouia* (NOGUEIRA *et al.*, 2011). Girling (2002) ressalta que apesar da literatura disponibilizar uma descrição detalhada do infundíbulo, há pouca discussão sobre as funções desta região do oviduto.

A tuba uterina de *P. geoffroannus* apresenta as mesmas camadas histológicas observadas no infundíbulo, no entanto têm paredes mais espessas. O epitélio pseudoestratificado cilíndrico que protege esta região é constituído por células cilíndricas mucossecretoras, células cilíndricas ciliadas e células basais. Girling *et al.*, (1998) afirmam que as células secretoras não ciliadas da tuba uterina em tartarugas e crocodilianos são responsáveis pela produção de albumina. O epitélio da tuba de *P. geoffroannus* responde positivamente às técnicas para glicosaminoglicanas ácidas e neutras (AB pH 2,5 e PAS), resultado também notado por Perkins & Palmer (1996) em *D. punctatus*, por Girling (1998), em *Hemidactylus turcicus*, *Saltuarius wyberba* e *H. maculatus*, por Sever *et al.* (2000), em *S. pygaea* e também por Nogueira *et al.* (2011) na lagartixa *H. mabouia*. Essas secreções podem estar relacionadas com a proteção e lubrificação das superfícies epiteliais, que facilitam a passagem do ovócito através do oviduto (BOTTE, 1973; GIRLING, 2000; SEVER *et al.*, 2000).

A mucosa da tuba uterina do cágado-de-barbicha é preenchida por numerosas glândulas, semelhantes àquelas encontradas na tuba de outras tartarugas (HATTAN & GIST, 1975; AITKEN & SOLOMON, 1976; PALMER & GUILLETE, 1988). Em répteis estas glândulas podem ser tubulo-alveolares, tubulares ou acinosas (PALMER & GUILLETTE, 1988; ABRAMS MOTZ & CALLARD, 1991; SARKER *et al.*, 1995). As glândulas observadas nesta região secretam apenas glicosaminoglicanas neutras, já que reagiram positivamente apenas ao PAS, resultado análogo ao obtido por Palmer & Guillete (1988), que não visualizou reação à técnica histoquímica para glicosaminoglicanas ácidas (AB).

As glândulas da tuba uterina de *P. geoffroannus* podem atuar na secreção de albumina, visto que reagiram positivamente ao Xylidine Ponceau, indicando a presença de secreção de proteínas gerais neste local. Na tartaruga marinha *Chelydra mydas* (AITKEN & SOLOMON, 1976) e na tartaruga *G. polyphemus* (PALMER & GUILLETTE, 1988) estas glândulas atuam na produção da proteína albumina. Girling (2002) afirma que em tartarugas e crocodilianos a região da tuba uterina é responsável pela produção de albumina, proteína da clara que circunda o ovo antes da oviposição. A camada muscular do cágado-de-barbicha é organizada em apenas um sentido, diferente do observado em *H. maculatus* (GIRLING *et al.*, 1997).

O istmo é uma região glandular que conecta a tuba uterina ao útero. Esta região é secretora de proteínas, função confirmada através da reação positiva à coloração de Xylidine Ponceau. Apesar da função, nota-se um número reduzido dessas glândulas na mucosa, quando comparadas as da tuba uterina. Este achado foi semelhante ao observado por Alkindi *et al.* (2006) em *Chelydra serpentina*, mas contrário ao analisado por Aitken & Solomon (1976), Palmer & Guillete (1988) e Girling *et al.* (1998, 2002), que observaram

um istmo aglandular. A lâmina própria do istmo encontra-se subjacente a um epitélio pseudoestratificado cilíndrico com células secretoras, células ciliadas e células basais, assim como as observadas na tuba uterina desta espécie. Estas células epiteliais de *P. geoffroannus* atuam na secreção de glicosaminoglicanas ácidas e neutras, da mesma forma que as observadas em *Tarentola m. mauritanica* (PICARIELLO *et al.*, 1989).

O útero é a região onde os ovos ficam retidos até a oviposição. O útero de *P. geoffroannus* é formado por uma camada mucosa glandular, uma muscular bem desenvolvida e uma serosa recobrando o órgão, similar ao descrito para alguns répteis (AITKEN & SOLOMON, 1976; PALMER & GUILLETTE, 1988; ABRAMS MOTZ & CALLARD, 1991; SARKER *et al.*, 1995). O epitélio desta região é pseudoestratificado cilíndrico constituído por células ciliadas e não ciliadas semelhante a outros répteis (PALMER & GUILLETTE, 1988; GUILLETTE *et al.*, 1989; PICARIELLO *et al.*, 1989; PALMER *et al.*, 1993; PERKINS & PALMER, 1996; GIRLING *et al.*, 1997, 1998, 2000; GIRLING, 2002; ADAMS *et al.*, 2004). O epitélio uterino reage negativamente às técnicas histoquímicas para detecção de glicosaminoglicanas ácidas e neutras, resultado confirmado em *H. maculatus* por Girling *et al.*, (1997).

A lâmina própria uterina é repleta de glândulas da casca relacionadas à secreção da casca do ovo, sendo estas também observadas em alguns lagartos ovíparos (GUILLETTE *et al.*, 1989; GIRLING *et al.*, 1998; PALMER *et al.*, 1993; NOGUEIRA *et al.*, 2011) e tartarugas (AITKEN & SOLOMON, 1976; PALMER & GUILLETTE, 1988; ALKINDI *et al.*, 2006). Estas glândulas reagem negativamente às técnicas para identificação de glicosaminoglicanas ácidas e neutras, conforme também observado em *H. maculatus*, *H. turcicus* e *H. mabouia* (GIRLING *et al.*, 1997; GIRLING *et al.*, 1998; NOGUEIRA *et al.*, 2011). As glândulas da casca presentes no útero do cágado-de-barbicha comunicam-se com o lúmen através de ductos, similar ao observado em *H. maculatus* (GIRLING *et al.*, 1997). Estes ductos, em *P. geoffroannus*, apresentaram grânulos que produzem glicosaminoglicanas ácidas e neutras. A técnica histoquímica utilizada para detecção de proteínas mostra reação positiva tanto para o epitélio quanto para as glândulas uterinas, diferentemente do visualizado em *H. mabouia* (NOGUEIRA *et al.*, 2011).

O útero desta espécie apresenta, abaixo da mucosa, uma espessa parede muscular, na qual se pode distinguir uma camada circular interna e uma longitudinal externa, que possivelmente atuam na expulsão do ovo embrionado ou não durante oviposição. Resultado também verificado por Palmer & Guillette, 1988; Guillette *et al.*, 1989; Picariello *et al.*, 1989; Palmer *et al.*, 1993; Perkins & Palmer, 1996; Girling *et al.*, 1998; Alkindi *et al.*, 2006; Nogueira *et al.*, 2011.

A vagina de *P. geoffroannus* é altamente muscular e conecta todo o oviduto ao seio urogenital (cloaca). Baseando-se em características morfológicas da parede vaginal esta região não foi subdividida em mais de um segmento, resultado similar ao observado por Adams & Cooper, 1988; Girling *et al.*, 1997; Sánchez-Martinez *et al.*, 2007. No entanto, este resultado difere do visualizado em distintas espécies de répteis (WHITTIER *et al.*, 1994; SEVER & RYAN, 1999; NOGUEIRA *et al.*, 2011), que afirmaram existir diferenças morfológicas consistentes que justifiquem esta subdivisão da vagina.

A camada mucosa da vagina encontra-se revestida por epitélio pseudoestratificado cilíndrico com células mucossecretoras e células ciliadas. Este resultado difere do observado na vagina da tartaruga *C. serpentina* Alkindi *et al.* (2006), a qual possui o epitélio composto apenas por células ciliadas. No entanto,

existem estudos que descrevem o epitélio vaginal com células ciliadas e não-ciliadas em outros répteis (GIRLING *et al.*, 1997, 1998; SEVER *et al.*, 2000; GIRLING, 2002).

A camada muscular visualizada como circular interna e a longitudinal externa da vagina de *P. geoffroannus* são as mais desenvolvidas em todo o oviduto, assim como visto em *H. maculatus* (GIRLING *et al.*, 1997). Fox (1977) relata que em alguns lagartos a função do canal vaginal está relacionada a este espessamento da camada muscular.

3.5 - CONCLUSÕES

- Verificou-se que o oviduto de *P. geoffroanus* é subdividido em cinco regiões: infundíbulo, tuba uterina, istmo, útero e vagina. Sendo, portanto, semelhante ao descrito para tartarugas e cágados.
- Histologicamente, o oviduto deste cágado encontra-se organizado em três camadas distintas do lúmen para a cavidade celomática: mucosa, muscular e serosa.
- A mucosa do oviduto possui diferentes tipos de células, alguns produtores de glicosaminoglicanas ácidas, outros de glicosaminoglicanas neutras, além dos tipos produtores de proteínas gerais.

CAPÍTULO II

Detecção imuno-histoquímica de células do Sistema Neuroendócrino Difuso no oviduto de *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae)

4.1 - OBJETIVOS

- Verificar sobre a ocorrência e possível distribuição de células secretoras de serotonina (5-HT), somatostatina e motilina, ao longo do oviduto do cágado *P. geoffroanus*, através de método imuno-histoquímico específico.
- Fornecer dados sobre células do Sistema Neuroendócrino Difuso desta espécie para estudos comparativos com os demais quelônios e também outros répteis ovíparos.

4.2 - MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo imuno-histoquímico, foram separados cortes de 5 µm de espessura das cinco regiões (infundíbulo, tuba uterina, istmo, útero e vagina) do oviduto e colocados em lâminas previamente tratadas com poly-L-lysina (Sigma Aldrich, Inc), a fim de promover a maior adesão do corte à lâmina.

4.2.1 - Estudo Imuno-histoquímico

O método utilizado para a realização deste trabalho foi o Complexo avidina-biotina-peroxidase, através do Kit ABC (Vector Laboratories). Nesta técnica são usados três reagentes: o anticorpo primário, o anticorpo secundário e o complexo de glicoproteínas (avidina pronta a partir da biotina e peroxidase) (Figura 21).

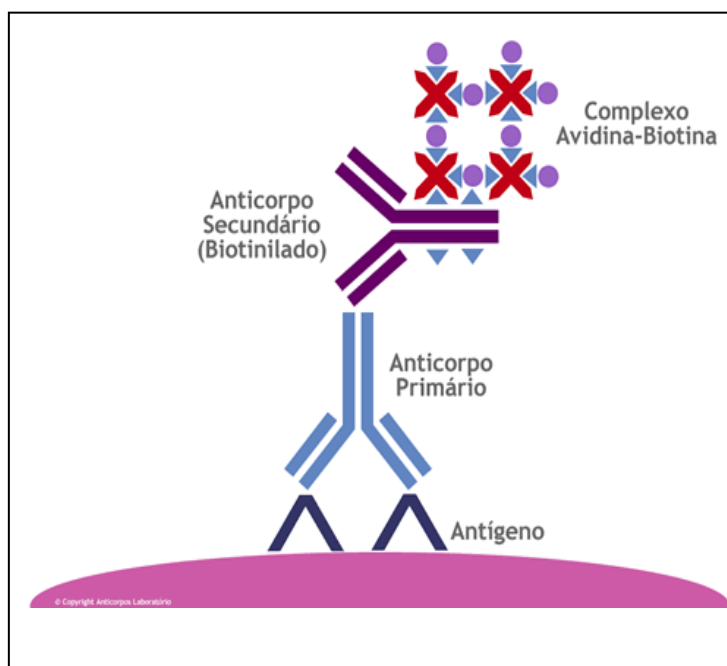


Figura 21. Representação do método imunoenzimático ABC - peroxidase (**Complexo avidina-biotina-enzima**). www.elmhurst.edu/~chmvchemook614hormone.htm

No procedimento imuno-histoquímico, primeiramente os cortes histológicos foram incubados em tampão citrato (pH 6,0 0,01M) e colocados em forno de microondas durante 15 min para recuperação antigênica e em seguida, incubados com uma solução de H₂O₂ a 3% em metanol durante 15 min para bloquear a peroxidase endógena. As secções foram incubadas à temperatura ambiente em câmara úmida com soro não-imune por 30 minutos, com a finalidade de neutralizar sítios inespecíficos. Após esse processo, as lâminas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo primário diluído conforme recomendações dos laboratórios (Tabela 3), formando o complexo antígeno-anticorpo.

Tabela 3: Anticorpos e reagentes utilizados.

Anti-soro	Diluição	Laboratório
Anti-Motilina	1:2000 µl	Yanaihara Institute, Inc.
Anti-Serotonina	1:8000 µl	Sigma Aldrich, Inc.
Anti-Somatostatina	1:300 µl	Dako
Kit ABC	-	Vector
DAB	20 µl:1ml	Diagnostic Biosystems
Diluyente de anti-soro	-	Spring Bioscience
Poli-L-lysina	1:10 ml	Sigma Aldrich, Inc.

Na sequência as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado “universal” na diluição de 1:300 µl por 30 min em temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase, em uma diluição de 1:200 µl, por 30 minutos. Por fim, foi feita a revelação da reação utilizando o substrato cromógeno 3,3-diaminobenzidina-DAB que forma um precipitado castanho visível à microscopia de luz. Após cada etapa, entre uma incubação e outra,

todas as lâminas foram submetidas a lavagens com 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 lamínula e Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

4.2.2 - Teste controle

Para confirmar a especificidade e eficácia das reações imuno-histoquímicas, foram utilizados controles negativos e positivos para cada anti-soro utilizado. Por substituição do anticorpo primário por soro não-imune, os controles negativos foram definidos. Para os controles positivos foram utilizados cortes de intestino de *P. geoffroannus*, submetidos às técnicas imuno-histoquímicas juntamente com as lâminas do oviduto deste animal. A escolha deste material se baseou em testes realizados previamente.

4.2.3 - Células endócrinas Argirófilas (GRIMELIUS, 1968)

Visando confirmar a presença ou ausência de grânulos de neurosecreção em células endócrinas argirófilas dispersas ao longo do oviduto de *P. geoffroanus*, cortes histológicos das cinco regiões do oviduto foram submetidos ao Método de Grimelius, de acordo com o seguinte protocolo: desparafinização dos cortes em xilol, hidratação em série decrescente de alcoóis, hidratação em água corrente e depois em água destilada, incubação dos cortes em solução de AgNO₃ com tampão acetato, revelação em solução de hidroquinona com sulfito de sódio e água destilada e por fim desidratação em série crescente de álcool, diafanização em xilol e montagem das lâminas com Entellan. Para confirmar a veracidade dos resultados obtidos, através do método empregado, foram utilizadas lâminas de intestino de *P. geoffroanus* como controle positivo.

4.2.3 - Observações e Fotomicrografias

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

4.3 - RESULTADOS

Através da técnica imuno-histoquímica utilizada verificou-se a ausência de células neuroendócrinas produtoras de motilina (Figuras 22A e 22B), serotonina (Figuras 23A e 23B) e somatostatina (Figuras 24A e 24B) em todas as regiões do oviduto (infundíbulo, tuba uterina, istmo, útero e vagina) do cágado *P. geoffroannus*.

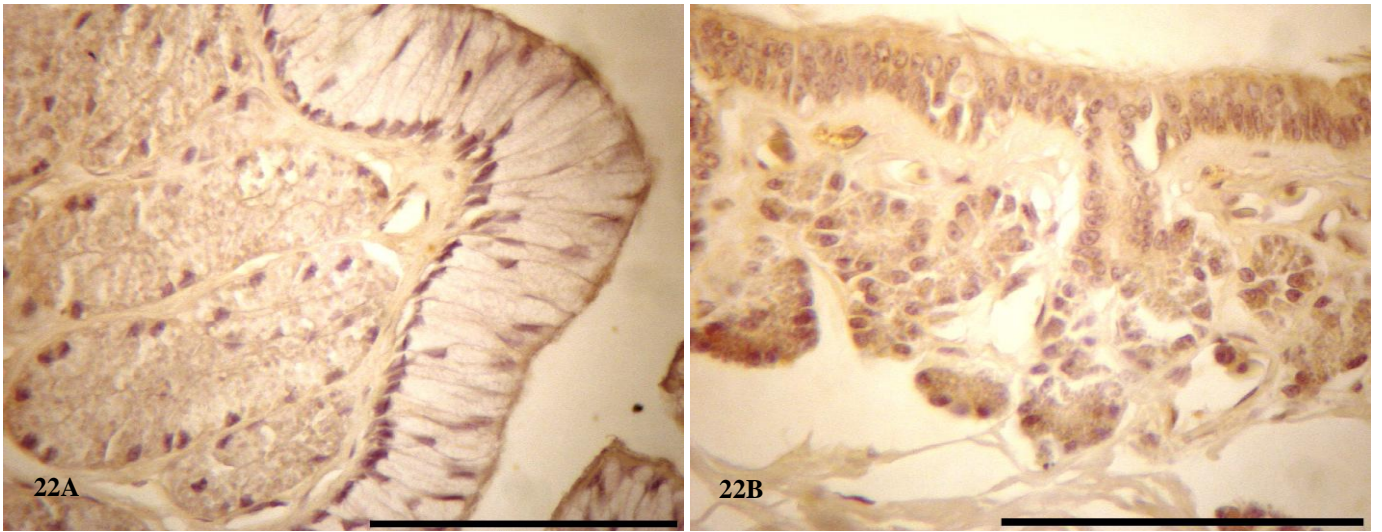


Figura 22: Fotomicrografias do oviduto de *P. Geoffroyanus*. 22A: Região do istmo com reação negativa para células endócrinas produtoras de motilina. 22B: Região do útero com reação negativa para células endócrinas produtoras de motilina. Barra de 100 µm.

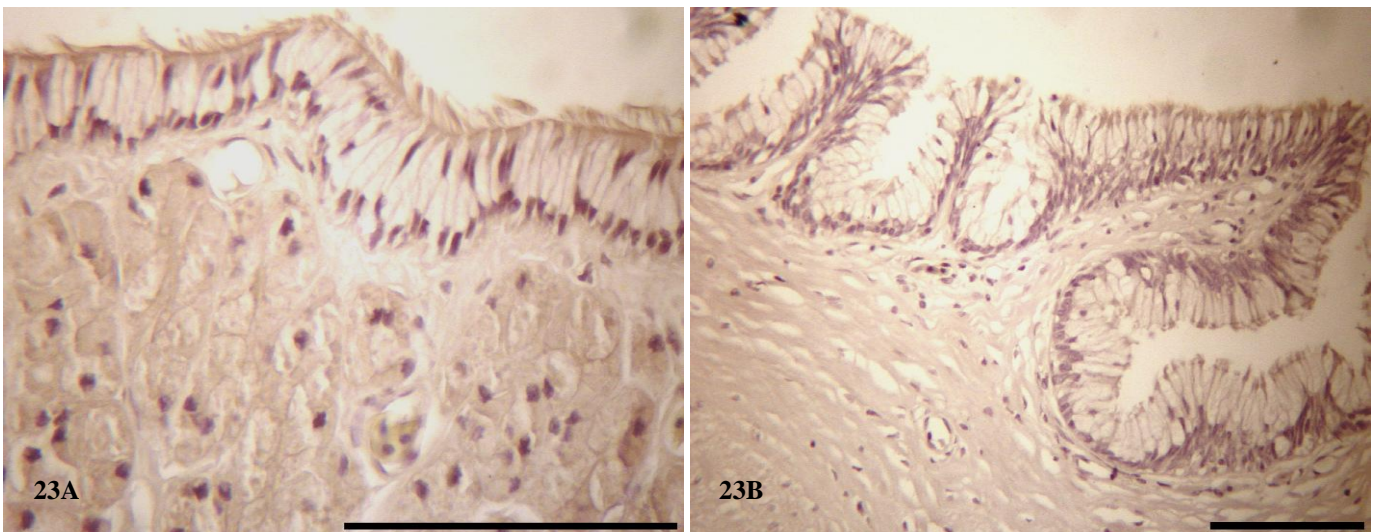


Figura 23: Fotomicrografias do oviduto de *P. Geoffroyanus*. 23A: Região da tuba uterina com reação negativa para células endócrinas produtoras de serotonina. 23B: Região da vagina com reação negativa para células endócrinas produtoras de serotonina. Barra de 100 µm.

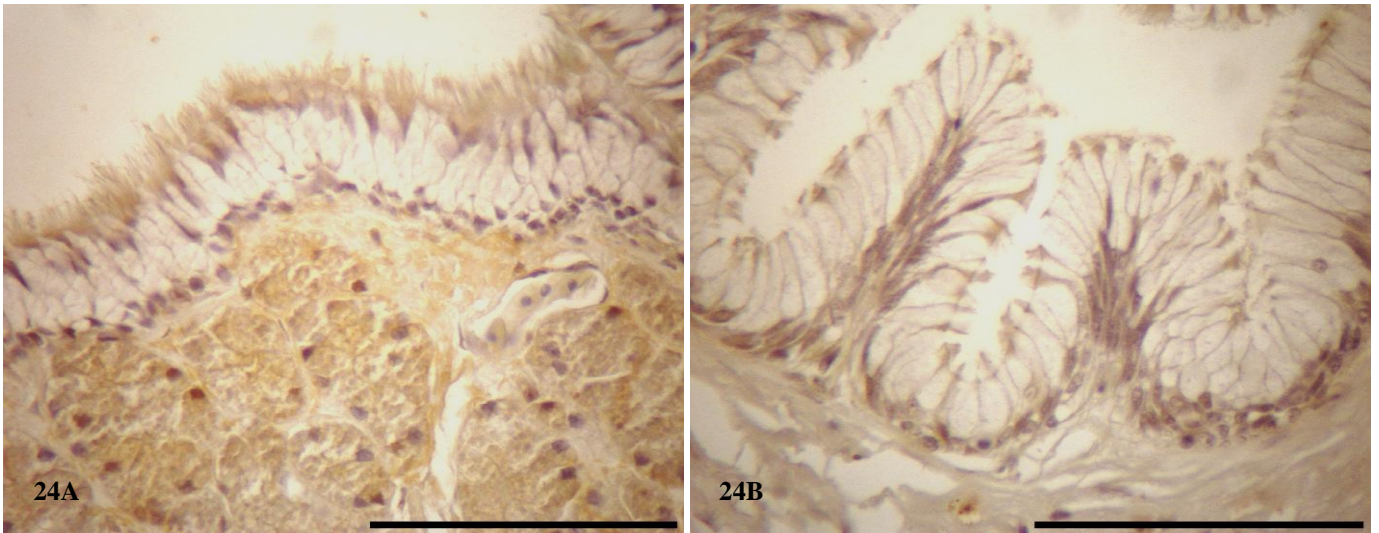


Figura 24: Fotomicrografias do oviduto de *P. geoffroanus*. 24A: Região da tuba uterina com reação negativa para células endócrinas produtoras de somatostatina. 24B: Região da vagina com reação negativa para células endócrinas produtoras de somatostatina. Barra de 100 µm.

As cinco regiões do oviduto também apresentaram reação negativa ao método de Grimelius (Figuras 25A e 25B), confirmando assim a ausência de outras células endócrinas argirófilas ao longo do oviduto deste réptil, o que provavelmente indica que esta região não atua como parte do Sistema Neuroendócrino Difuso. Entretanto, o corte de intestino de *P. geoffroanus* utilizado como controle, apresentou resultado positivo para o método supracitado (Figura 26).

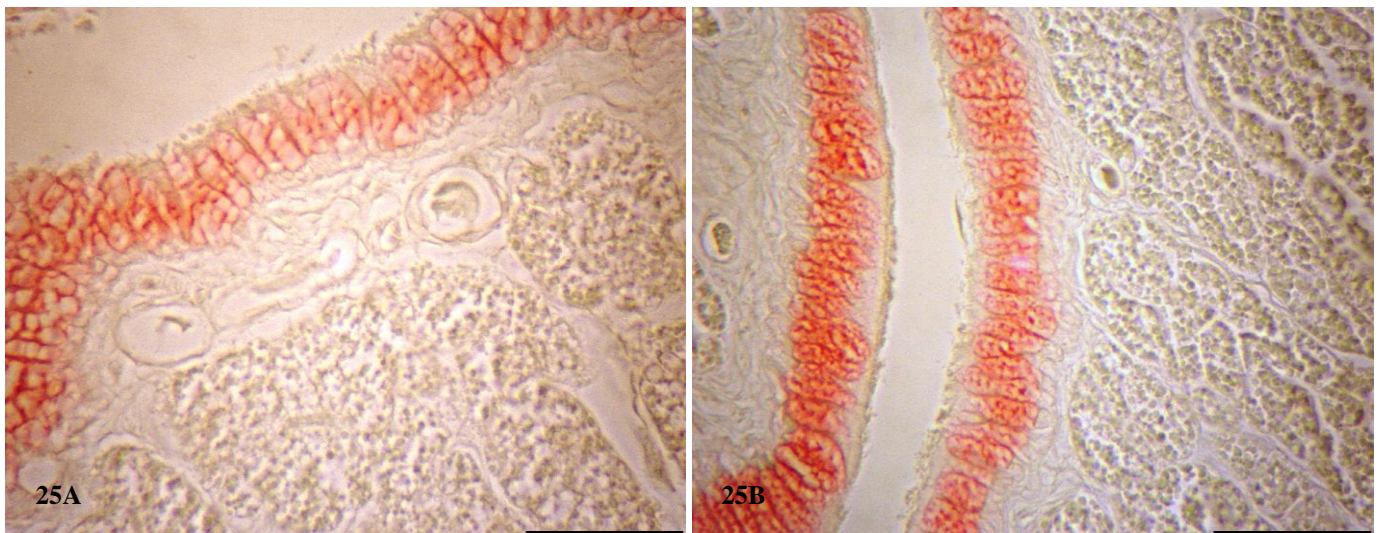


Figura 25: Fotomicrografias do oviduto de *P. geoffroanus*. 25A-B: Tuba uterina de *P. geoffroanus* com resultado negativo para o Método de Grimelius. Barra de 100 µm.

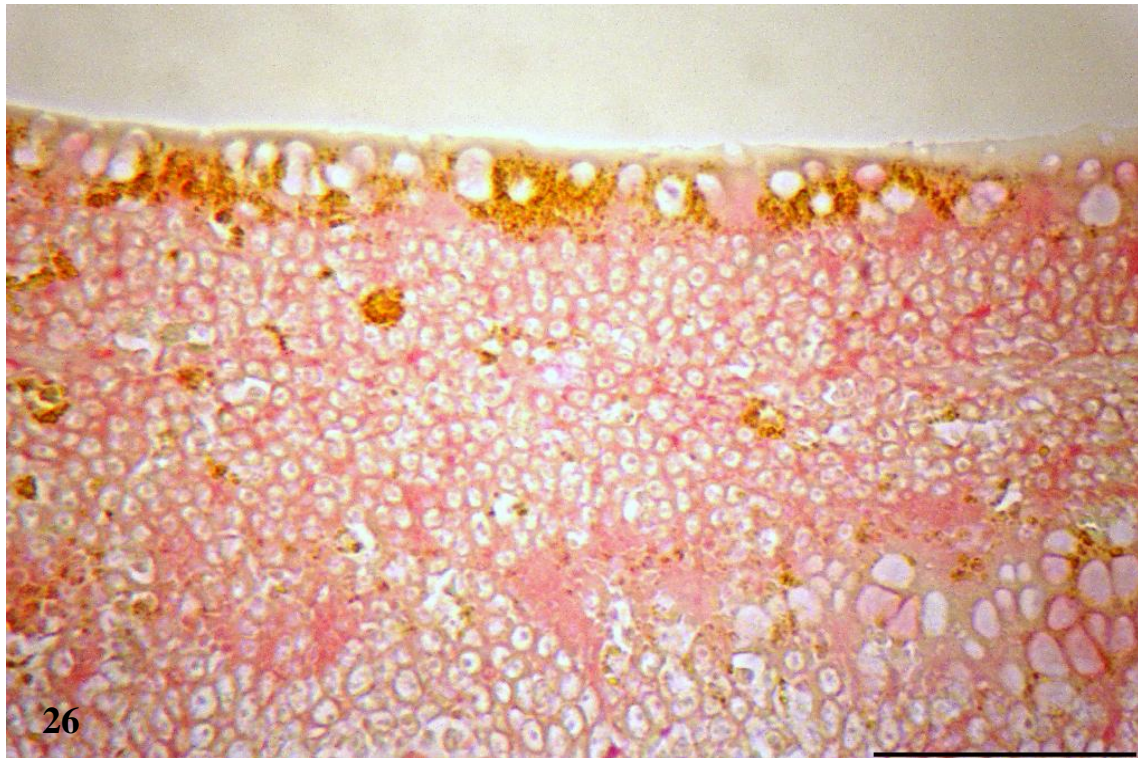


Figura 26: Fotomicrografia do intestino de *P. Geoffroyanus*. Células endócrinas argirófilas na camada mucosa (Método de Grimelius). Barra de 100 μ m.

É importante salientar que a eficácia e especificidade dos anti-soros utilizados no presente estudo foram confirmadas no intestino de *P. Geoffroyanus*, no qual foram observadas células endócrinas produtoras de motilina (Figuras 27A e 27B), serotonina (Figuras 28A e 28B) e somatostatina (Figura 29).

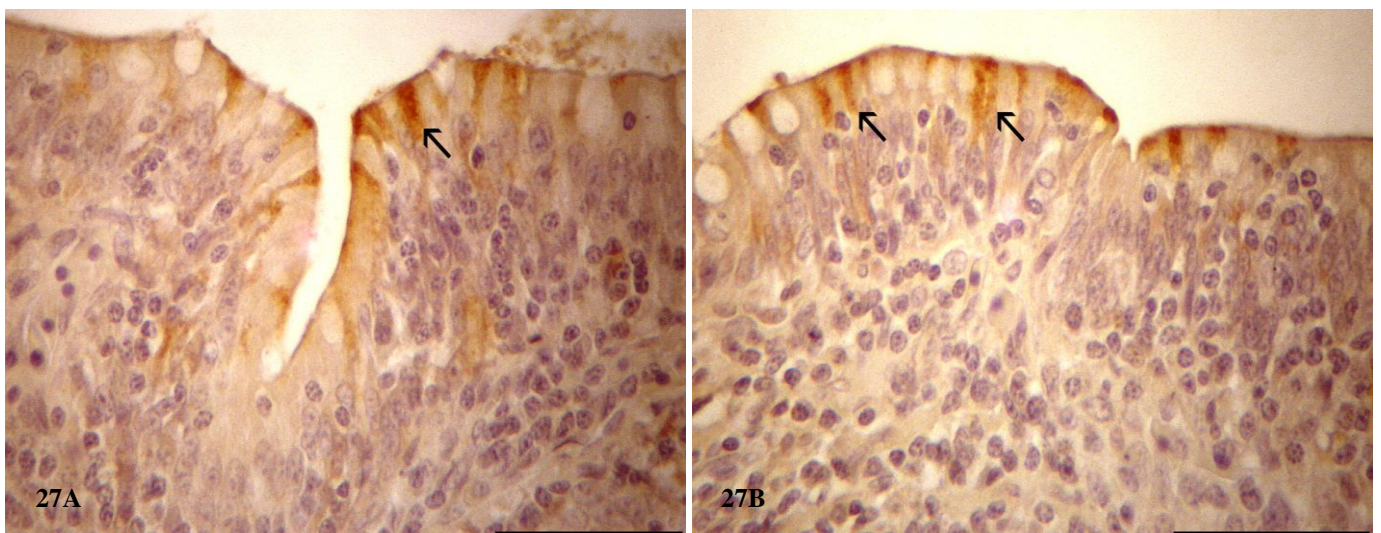


Figura 27A-B: Fotomicrografias de células endócrinas produtoras de motilina entre as células epiteliais do intestino (seta). Barra de 100 μ m.

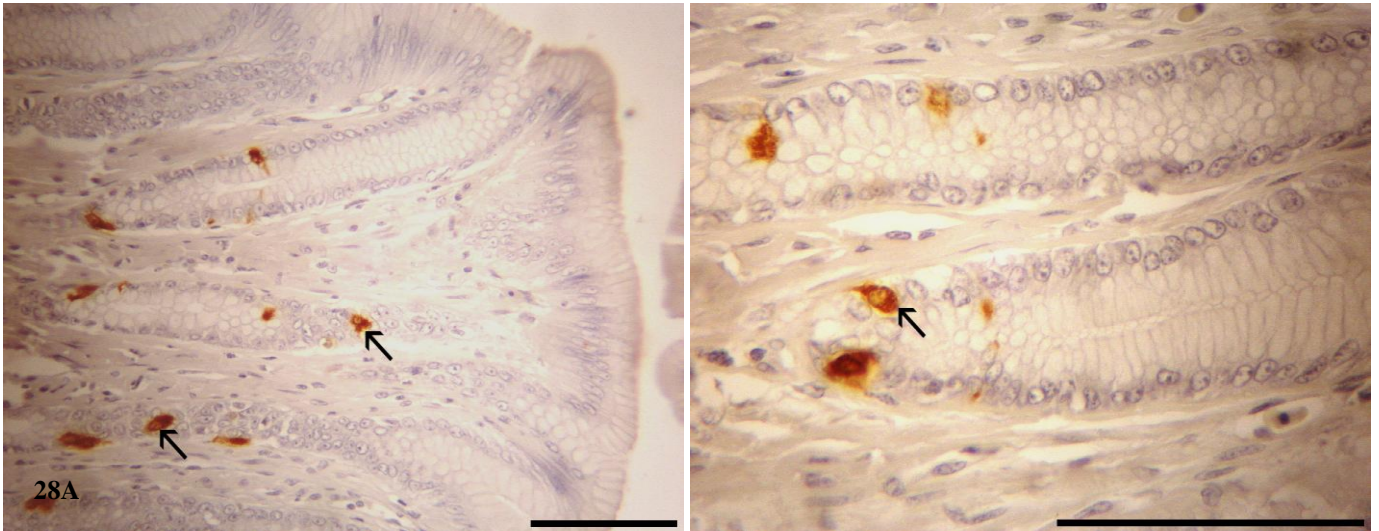


Figura 28A-B: Fotomicrografias de células endócrinas produtoras de serotonina próximo às glândulas intestinais (seta). Barra de 100 μ m.

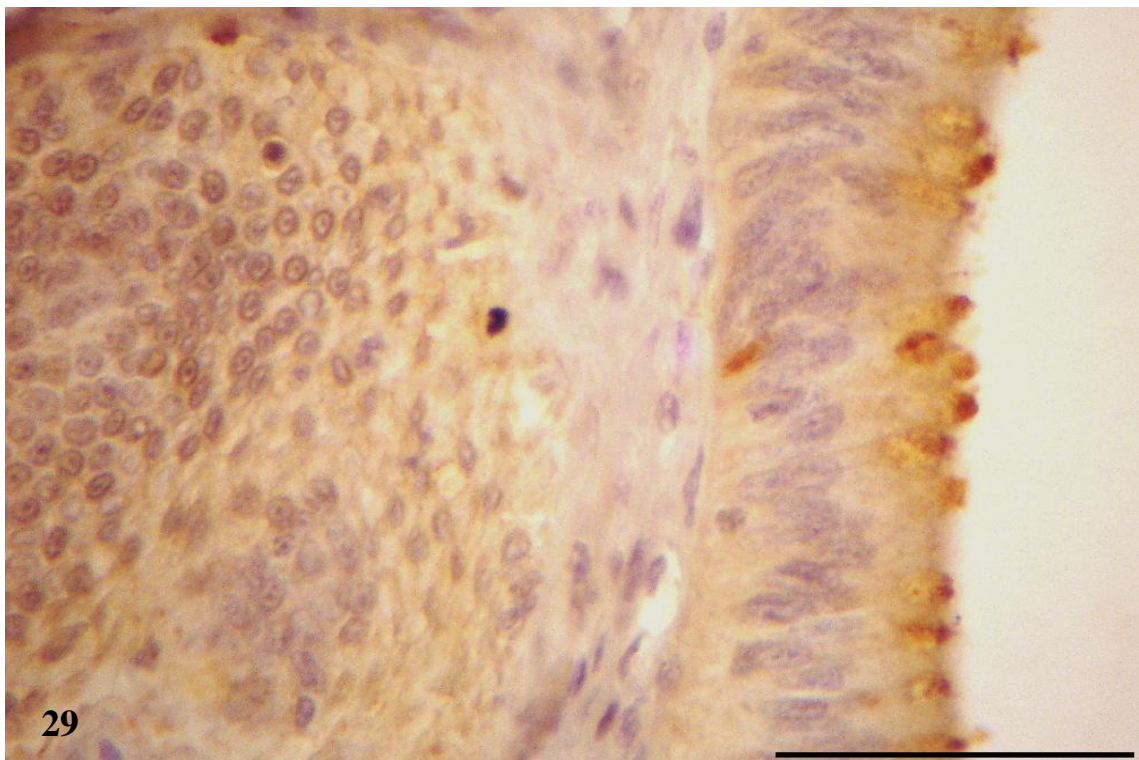


Figura 29: Células endócrinas produtoras de somatostatina entre as células epiteliais do intestino. Barra de 100 μ m.

4.4 - DISCUSSÃO

O sistema neuroendócrino difuso é composto por células secretoras de hormônios polipeptídicos, amins e substâncias afins. A secreção dessas células pode ser transportada pelo sangue (secreção endócrina) atingindo células-alvo em todo o organismo, ou atuar localmente em células vizinhas (secreção parácrina), ou ainda, atuar como mediador químico através de fibras nervosas (secreção neurócrina) (LAI *et al.*, 2006). As células desse sistema não constituem um órgão específico, mas encontram-se dispersas por vários órgãos, dentre eles, órgãos do sistema digestório, respiratório e urinário (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A realização do estudo com oviduto de *P. geoffroanus*, baseou-se na hipótese da existência de células endócrinas produtoras dos hormônios motilina, somatostatina e serotonina na camada mucosa deste órgão. Desta forma, estes hormônios que auxiliam na regulação da motilidade, quando liberados poderiam agir na camada muscular do oviduto e exerceriam influência nos movimentos peristálticos deste órgão. Função essencial para a ocorrência de vários eventos, como por exemplo: a passagem do ovo do útero até a cloaca e a oviposição (ARJAMAA & TALO, 1983). No entanto, em *P. geoffroanus* estas células não foram detectadas em nenhuma região do oviduto.

No estudo, através da utilização de cortes histológicos de intestino de *P. geoffroanus* como controle positivo no teste imuno-histoquímico, foi identificada a presença de células endócrinas produtoras de motilina, somatostatina e serotonina na mucosa deste órgão. Assim sendo, além de ter sido confirmada a especificidade e a eficácia das reações, também foi verificado que este cágado apresenta estas células endócrinas no intestino.

Em diferentes espécies de répteis, vários estudos mostraram a existência de vários tipos de células neuroendócrinas que secretam hormônios no trato gastrointestinal (PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989; ARENA *et al.*, 1990; BURREL *et al.*, 1991; KU *et al.*, 2001; LEE & KU, 2004; TRANDABURU & TRANDABURU, 2007). Entretanto, até o presente momento, não existe relato sobre a presença de células endócrinas no sistema urogenital de répteis e poucos são os trabalhos que descrevem este tipo de achado em outras espécies (CECIO & VITTORIA, 1989; VITTORIA *et al.*, 1989; RZAS *et al.*, 1991; CZAJA *et al.*, 1996; ARRIGHI *et al.*, 2004; RUSSO & VITTORIA, 2006; BAKST & AKUFFO, 2008). Nestes estudos foram detectados no sistema urogenital de algumas espécies de aves e de mamíferos os mesmos tipos de células endócrinas pesquisadas no oviduto do cágado *P. geoffroanus*.

Sobre a detecção de células endócrinas produtoras de somatostatina: Vittoria *et al.*, (1992) descreveram a presença no epitélio da uretra de vacas, ovelhas e porcas; Czaja *et al.*, (1996) relataram a ocorrência nas glândulas vestibulares, nos cornos uterinos, nos ovidutos (tubas uterinas) e uretra de porcas; Russo & Vittoria (2006) verificaram a existência nas glândulas vestibulares de porcas e vacas e Russo *et al.*, (2007) detectaram na uretra de búfala.

Sobre a detecção de células endócrinas produtoras de serotonina: Bakst & Akuffo (2008) relataram células dispersas por todo o epitélio vaginal e na junção útero-vaginal em peruas, no entanto estas células não ocorreram na região de estocagem de espermatozóides; Rzas *et al.*, (1991) através da espectrofluorometria detectaram-nas na região anterior ao útero do oviduto de galinhas adultas; Hanyu *et al.*, (1987) verificaram na uretra e no vestíbulo vaginal de cães e afirmaram que a serotonina pode induzir a contração da musculatura lisa no trato urogenital destes animais e Czaja *et al.*, (1996) detectaram nas glândulas vestibulares e na uretra de porcas. Russo & Vittoria (2006)

observaram estas células nos ácinos e ductos secretores das glândulas vestibulares em porcas e vacas. Cabe ressaltar, que a ação da serotonina no sistema urogenital não é ainda totalmente compreendida, mas é provável que a serotonina desempenhe um papel determinante na contração e relaxamento muscular de várias estruturas urogenitais (CECIO & VITTORIA, 1989).

Não foi encontrado nenhum trabalho que relate a presença de células endócrinas produtoras de motilina no sistema urogenital de répteis como também de outros animais, porém Yamamoto *et al.*, (2008) observaram níveis notáveis de receptores de motilina ao longo do oviduto de galinhas jovens e adultas. No entanto, estes autores afirmaram que a função fisiológica deste hormônio, neste local, é ainda desconhecida, mas sugerem que este possa estar envolvido na regulação do movimento peristáltico para expulsão do ovo.

É importante salientar que todo e qualquer resultado de estudos sobre a verificação da presença de células do sistema neuroendócrino difuso pode ser considerado uma importante parte no estudo filogenético de vertebrados (D'ESTE *et al.*, 1994).

5.0 – Conclusões

Com a não detecção das células endócrinas pesquisadas no oviduto de *P. geoffroanus* e a verificação da existência dessas células no intestino deste cágado, torna-se possível sugerir que provavelmente os peptídeos reguladores produzidos, por essas células, são transportados pela corrente sanguínea e atinjam receptores específicos em células-alvo localizadas ao longo do oviduto para atuarem na regulação dos movimentos peristálticos deste órgão. Entretanto, não se pode afirmar a existência destes receptores, visto que não foram utilizados anti-soros anti-receptores destes peptídeos no presente estudo.

6.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS MOTZ, V.; CALLARD, I. P. Seasonal variations in oviductal morphology of the painted turtle, *Chrysemys picta*. **J Morphol** 207:59-71, 1991.
- ADAMS, C. S.; HOSIE, M. J.; MURPHY, C. R.; THOMPSON, M. B. Changes in oviductal morphology of the skink, *Lampropholis guichenoti*, associated with egg production. **J Morphol** 262:536–544, 2004.
- AITKEN, R. N. C.; SOLOMON, S. E. Observations on the ultrastructure of the oviduct of the Costa Rican green turtle (*Chelonia mydas L.*) **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 22:75-90, 1976.
- ALKINDI, A. Y. A.; MAHMOUD, I. Y.; WOLLER, M. J.; PLUDE, J. L. Oviductal morphology in relation to hormonal levels in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. **Tissue and Cell**, 38:19-33, 2006.
- 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*). **J Anat.** 170:73-85, 1990.
- ARJAMAA, O.; A. TALO. Smooth muscle of the quail oviduct functions as a stretch receptor during ovum transport. **Biol. Reprod.** 29:472–478. 1983.
- ARRIGHI S.; CREMONESI F.; BOSI G.; DOMENEGHINI C. Endocrineparacrine cells of the male urogenital apparatus: a comparative histochemical and immunohistochemical study in some domestic ungulates. **Anat Histol Embryol.** 33:225-232. 2004.
- ASHLEY, L. M. **Laboratory Anatomy of the Turtle**, First Edition - WM. C. Brown Company . Publishers, Dubuque, Iowa, 32-36, 1974.
- BACHELOT, A.; MONGET, P.; IMBERT-BOLLORE, P.; COSHIGANO, K.; KOPCHICK, J. J.; KELLY, P. A.; BINART, N. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. **Endocrinology.** 143:4104–4112. 2002.
- BAKST, M. R.; AKUFFO, V. Serotonin Localization in the Turkey Vaginal but not Sperm Storage Tubule Epithelia. **Poultry Science.** 87:356–361. 2008.
- BOTTE, V. Some aspects of oviduct development in the lizard *Lacerta sicula* in relation to the annual cycle. **B Zool** 40:315–321, 1973.
- 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 and Tissue Research.** 263:3:549-556, 1991.
- CECIO A, VITTORIA A. Urogenital paraneurons in several mammals. **Arch Histol Cytol;** 52:403–413. 1989.

- CHAN-PALAY, V.; ITO, M.; TONGROACH, P.; SAKURAI, M.; PALAY, S. Inhibitory effects of motilin, somatostatin and taurine in enteric neurons. **Neurobiology**. 79: 3355-3359, 1982.
- CZAJA K.; SIENKIEWICZ W.; VITTORIA A.; COSTAGLIOLA A.; CECIO A. Neuroendocrine cells in female urogenital tract of the pig, and their immunohistochemical characterization. **Acta Anat.** 157:11- 19. 1996.
- D'ESTE, L.; BUFFA, R.; PELAGI, M.; SICCARDI, A. G.; RENDA, T. Immunohistochemical localization of chromogranin A and B in the endocrine cells of the alimentary tract of the green frog, *Rana esculenta*. **Cell Tissue Res** 277:341-349. 1994.
- DUELLMAN, W. E. **The South American Herpetofauna: Its Origin, Evolution and Dispersal**. Monograph of the Museum of Natural History, the University of Kansas, n.7, 1979.
- ERNEST, C. H.; BARBOUR, R. W. **Turtles of the World**, Washington D.C.: Smithsonian Institution Press, p. 29-30, 182-183, 209-210, 1989.
- FÁCHIN-TERÁN, A.; VOGT, R. C.; SOARES, M. F. G. S. Alimentación de tres especies de tortugas Chelidae en Costa Marques, Rondonia, Brasil. **Boletín de Lima XVI** (91- 96): 409-416. 1994.
- FANG, P.; DONG, L.; LUO, Y.; LONG WAN, X.; CHAI, N. Effects of motilin and ursodeoxycholic acid on gastrointestinal myoelectric activity of different origins in fasted rats. **World Journal of Gastroenterology**. 10;17: 2509-2513. 2004.
- FERRONATO, B. O.; MARQUES, T. S.; SOUZA, F. L.; VERDADE, L. M.; MATUSHUMA, E. R. Oral bacterial microbiota and traumatic injuries of free ranging *Phrynosoma geoffroanus* (Testudines, Chelidae) in southeastern Brazil. **Phyllomedusa** 8:1:19-25. 2009.
- FOX, H. The urinogenital system of reptiles. In: *Biology of the Mating Reptilia*. C. Gans, ed. **Academic Press**, New York, 6:1-157. 1977.
- FRANKS, S. Growth hormone and ovarian function. **Baillieres Clin Endocrinol Metab.** 12:331-340. 1998.
- FUJITA, T. The gastro-enteric endocrine cell and its paraneuronic nature. In *Chromaffin, Enterochromaffin and Related Cells* (ed. R. E. Coupland & T. Fujita). **Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Co.** 1976.
- FUJITA, T. Paraneuron, its current implications. **Biomedical Research**. 1:3-9.1980.
- FURNESS, J. B.; COSTA, M. Identification of gastrointestinal neurotransmitters. In **Handbook of Experimental Pharmacology**. 59/1. 383-462. 1982.

- GARCIA-NAVARRO, C. E. K; PACHALY, J. R. **Manual de Hematologia Veterinária**, 1.ed. São Paulo: Livraria Varela Ltda., p. 69-71, 123-132, 1994.
- GARTNER, L. P. & HIATT, J. L. Tratado de Histologia. Ed. Guanabara Koogan, 425p. 1999.
- GIERSBERG, H. Untersuchungen über Physiologie und Histologie des Eileiters der Reptilien un Vogel; nebst einem Beitrag zur Fasergenese. **Z. Wiss. Zool.**, 120:1-97,1923.
- GIRLING, J. E.; CREE, A.; GUILLETTE, L. J., Jr. Oviductal structure in a viviparous New Zealand gecko, *Hoplodactylus maculatus*. **J Morphol** 324:51–68, 1997.
- GIRLING, J. E.; CREE, A.; GUILLETTE, L. J. Jr. Oviductal structure in four species of gekkonid lizard differing in parity mode and eggshell structure. **Reprod Fertil Dev** 10:139-154, 1998.
- GIRLING, J. E.; GUILLETTE, L. J. JR; CREE, A. Ultrastructure of the uterus in an ovariectomized gecko (*Hemidactylus turcicus*) after administration of exogenous estradiol. **J Exp Zool** 286:76–89, 2000.
- GIRLING, J. E. The reptilian oviduct: a review of structure and function and directions for future research. **J. Exp. Zool.** 293:141–170. 2002.
- GIST, D. H.; JONES J. M.. Storage of sperm in the reptilian oviduct. **Scanning Microsc.**, 1:1839-1849. 1988.
- GOULART, C. E. S. **Herpetologia, Herpetocultura e Medicina de Répteis**. Ed. L.F. Livros de Veterinária LTDA, 1º ed., 21-56, 99-108, 131-144, 2004.
- GUIX, J. C.; SALVATTI, M.; PERONI, M. A.; LIMA-VERDE, J .S. Aspectos da reprodução de *Phrynops geoffroanus* em cativeiro. [S.1.]: **GGE**. 19p. 1989.
- GUILLETTE, L. J. JR.; FOX, S. L.; PALMER, B. D. Oviductal morphology and egg shelling in the oviparous lizards, *Crotaphytus collaris* and *Eumeces obsoletus*. **J. Morphol.** 1989.
- HANSEN, I. B.; RILEY, A. S. Seasonal changes in the oviduct of the turtle, *Terrapene carolina*. **Anat. Rec. [Suppl.]**, 81:116, 1941.
- HANYU, S.; IWANAGA, T.; KANO, K.; FUJITA, T. Distribution of serotonin-immunoreactive paraneurons in the lower urinary tract of dogs. **Am. J. Anat.** 180:349-356. 1987.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 11. ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KIERNAN, J.A., In: Hill Hall, H., (Ed.), Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice, second ed., Pergamon Press, Oxford. 1990.

- KITAZAWA, T.; TANEIKE, T.; OHGA, A. Functional characterization of neural and smooth muscle motilin receptors in the chicken proventriculus and ileum. **Regul. Pept.** 71, 87–95. 1997.
- KU, S. K. , LEE, H. S. , LEE, J. H. AND PARK, K. D. An Immunohistochemical Study on the Endocrine Cells in the Alimentary Tract of the Red-Eared Slider (*Trachemys scripta elegans*). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, 30:33–39. 2001.
- LAI, M.; LU, B.; XING, X.; XU, E.; REN, G.; HUANG, Q. Secretagogin, a novel neuroendocrine marker, has a distinct expression pattern from chromogranin A. **Virchows Arch** 449:402–409. 2006.
- 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**. 1062:18:171–178. 2004.
- LUIKING, Y. C.; PEETERS, T. L.; STOLK, M. F. Motilin induces gall bladder emptying and antral contractions in the fasted state in humans. **Gut**. 42:830–835. 1998.
- MCCORD, W. P.; JOSEPH-OUNI, M.; LAMAR, W. W. A taxonomic reevaluation of Phrynops (Testudines Chelidae) with the description of two new genera and a new species of *Batrachemys*. **Revista de Biología Tropical**, 49:2:715-764, 2001.
- MITTERMEIER, R. A.; RHODIN, A. G. J.; ROCHA; SILVA, R; ARAUJO DE OLIVEIRA, N. Rare Brazilian sideneck turtle. **Oryx**, 15:473-475, 1980.
- MLYNARSKI, M.; WERMUTH, H.; KAUFMANN, R.; GRZIMEK, B. The turtles. In: Grzimek's Animal Life Encyclopedia. *Reptiles*. New York: Van Nostrand Reinhold, 6: 75-121, 1975.
- MOLINA, F. B. Comportamento e biologia reprodutiva dos cágados *Phrynops geoffroanus*, *Acanthochelis radiolata* e *Acanthochelis spixii* (Testudines, Chelidae) em cativeiro. **Revista Brasileira de Etologia**, 25-40, 1998.
- NOGUEIRA, K. O. P. C.; RODRIGUES, S. S.; ARAÚJO, V. B.; NEVES, C. A. Oviductal Structure and Ultrastructure of the Oviparous Gecko, *Hemidactylus mabouia* (Moreau De Jonne` s, 1818). **The Anatomical Record**. 294:883–892, 2011.
- ORR, R. T. **Biologia dos Vertebrados**. 5. ed., São Paulo: Livraria Rocca Ltda, p. 95, 508, 1986.
- PALMER, B. D.; GUILLETTE, L. J. Jr. Histology and functional morphology of the female reproductive tract of the tortoise *Gopherus polyphemus*. **The Am J Anat** 183:200-211, 1988.

- PALMER, B. D.; DEMARCO, V. C.; GUILLETTE, L. J., Jr. Oviductal morphology and the eggshell formation in the lizard, *Sceloporus woodi*. **J Morphol** 217:205–217, 1993.
- PEARSE, A. G. E. The diffuse neuroendocrine system and the APUD concept: related 'endocrine' peptides in brain, intestine, pituitary, placenta and anuran cutaneous glands. **Medical Biology**. 55:115-125. 1977.
- PEREZ-TOMAS, R.; BALLESTA, J.; PASTOR, L. M.; MADRID, J. F.; POLAK, J. M. Comparative immunohistochemical study of the gastroenteropancreatic endocrine system of three reptiles. **General and Comparative Endocrinology**. 76:2:171–191, 1989.
- PERKINS, M. J.; PALMER, B. D. Histology and Functional Morphology of the Oviduct of an Oviparous Snake, *Diadophis punctatus*. **Journal of Morphology** 227:67-79, 1996.
- PICARIELLO, O.; CIARCIA, G.; ANGELINI, F. The annual cycle of oviduct in *Tarentola m. mauritanica* L. (Reptilia, Gekkonidae). **Amphib-Reptilia** 10:371-386, 1989.
- PINÃ, C. I.; LANCE, V. A.; FERRONATO, B. O.; GUARDIA, I.; MARQUES, T. S.; VERDADE, L. M. Heavy metal contamination in *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) in a River Basin, São Paulo, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 83: 771-775. 2009.
- POITRAS, P.; MILLER, P.; GAGNON, D.; ST-PIERRE, S. Motilin synthetic analogues and motilin receptor antagonists. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 205: 449–454. 1994.
- POUGH, F. H.; JANIS, M. C.; HEISER, B. J. **A Vida dos Vertebrados**. 3ª ed. Atheneu SP. p 270-290, 2003.
- PRITCHARD, P. C. H. **Encyclopedia of Turtle**, ed. T. F. H. Publication Ltda., p. 179-183, 752-755, 1979.
- PRITCHARD, P. C. H.; TREBBAU, P. **The Turtles of Venezuela**, Fundación de Internados Rurales (Venezuela), Society for the study of Amphibians and Reptiles, p.111-117, 1984.
- REICHLIN, S. Somatostatin: I. *New England Journal of Medicine* 309, 1495-1501. 1983a.
- REICHLIN, S. Somatostatin: II. *New England Journal of Medicine* 309, 1556-1563. 1983b.
- RUEDA-ALMONACID, J. V.; CARR, J. L.; MITTERMEIER, R. A.; RODRIGUEZ-MAHECHA, J. V.; MAST, R. B.; VOGT, R. C.; RHODIN, A. G. J.; OSSAVELASQUEZ, J.; RUEDA, J. N.; MITTERMEIER, C. G. Las tortugas e

los crocodilianos de los países andinos del Trópico. Bogotá, Conservación Internacional. 537p. 2007.

- RUSSO, F.; VITTORIA, A. Neuroendocrine cells in the vestibular glands of the genital tract of cows and pigs. **Acta Histochem.** 108:351-355. 2006.
- RUSSO, F.; MICALETTI, R.; PETROSINO, G.; VITTORIA, A. Neuroendocrine cells in the urogenital tract of the buffalo. **Ital. J. Anim. Sci.** 6:2:792-793. 2007.
- RZAS, J.; PACZOSKA-EKIASIEWICZ, H.; KIERES, K. Serotonin concentration in the chicken oviduct (*Gallus domesticus*). **Acta Agraria Silvestria – Zootechnica** 29:113–120. 1991.
- SANCHEZ-MARTINEZ, P. M.; RAMIREZ-PINILLA, M. P.; MIRANDA-ESQUIVEL, D. R. Comparative histology of the vaginal-cloacal region in Squamata and its phylogenetic implications. **Acta Zool** (Stockholm) 88:289–307, 2007.
- SARKER, S.; SARKER, N. K.; MAITI, B. R. Histological and functional changes of oviducal endometrium during seasonal reproductive cycle of the soft-shelled turtle, *Lissemys punctata punctata*. **J Morphol** 224:1-14, 1995.
- SCHNEIDER, L.; FERRARA, C. R. & VOGT, R. C. *Phrynops geoffroanus* (Geoffroy's side necked turtle): nest predation. **Herpetological Review** 40(4):436. 2009.
- SCHWEIGGER, A. F. Prodrömus monographie Cheloniü. Koenigsberg. **Arch. Naturw. Math.** 1:271-368;406-458. 1812.
- SEVER, D. M. AND RYAN, T. J. Ultrastructure of the reproductive system on the black swamp snake (*Seminatrix pygea*): Part I. Evidence for oviductal sperm storage. **Journal of Morphology** 241: 1–18, 1999.
- SEVER, D. M.; RYAN, T. J.; MORRIS, T.; PATTON, D.; SWAFFORD, S. Ultrastructure of the Reproductive System of the Black Swamp Snake (*Seminatrix pygea*). II. Annual Oviducal Cycle. **Journal of Morphology** 245:146–160, 2000.
- SOLCIA, E.; USELLINI, L.; BUFFA, R.; RINDI, G.; VILLANI, L.; AGUZZI, A.; SILINI, E. Endocrine cells producing regulatory peptides. In: Polak JM, editor. Regulatory peptides. **Switzerland, Basel: Birkh.auser.** 220–46. 1989.
- SOUZA, F. L. & ABE, A. Feeding ecology, density and biomass of the freshwater turtle *Phrynops geoffroanus* inhabiting a polluted urban river in southeastern Brazil. **Journal of Zoology** 252:437-446. 2000.
- SOUZA, F. L.; RAIZER, J.; COSTA, H. T. M.; MARTINEZ, F. I. Dispersal of *Phrynops geoffroanus* (Chelidae) in an urban river in Central Brazil. **Chelonian Conservation and Biology** 7:2:257-261. 2008.

- STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. **Zoologia Geral**. 6 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 1986.
- 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**. 109:3:237–247, 2007.
- UETZ, P.; HALLERMANN, J. **The JCVI/TIGR Reptile Database**. Artigo disponível <http://www.reptiledatabase.org> 2012.
- VITTORIA, A.; PAINO, G.; LA MURA, E.; BUDETTA, G.; CECIO, A. Chromogranin- and somatostatin-containing neuroendocrine cells in the porcine uterus. An immunocytochemical study. **Anat Histol Embryol** 18:136–142. 1989.
- VITTORIA, A.; COCCA, T.; LA MURA, E.; CECIO, A. Immunocytochemistry of paraneurons in the female urethra of the horse, cattle, sheep, and pig. **Anat Rec**. 233:1:18-24. 1992.
- VOGT, R. C. Tartarugas da Amazônia. Lima, Gráfica Biblos. 2008. 104p.
- WAKE, M. H. Oviduct structure and function in non-mammalian vertebrates. **Fortschr Zool** 30:427- 435, 1985.
- WHITTIER, J. M.; STEWART, D.; TOLLEY, L. Ovarian and oviductal morphology of sexual and parthenogenetic Geckos of the *Heterodontia bionei*. **Copeia**. 484–492, 1994.
- WU, Z. J., XU, C. F. & HUANG, Y. X. An immunohistochemical study on morphology and distribution of somatostatin-like immunoreactive cells in mamalian gastrointestinal tract. **Zhonghua xin xue guan bing za zhi**. 5:654-655, 1997.
- YAMAMOTO, I., KAIYA, H., TSUTSUI, C., SAKAI, T., TSUKADA, A., MIYAZATO, M., TANAKA, M. Primary structure, tissue distribution, and biological activity of chicken motilin receptor. **General and Comparative Endocrinology** 156:509–514. 2008.
- ZAGO, C. E. S. **Anatomia do aparelho reprodutor e hematologia de Phrynops geoffroanus (Testudines:Chelidae)**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2007, 92p.
- ZHANG, C. & LI, D. G. 5-HT and the regulation of gastrointestinal tract motility. **Zhonghua xin xue guan bing za zhi**. 5:730-731, 1997.
- ZHU, J. Z., CHEN, D. F. & LENG, E. R. The action of a gastrointestinal hormones on regulation of gastrointestinal motion. **Shi Jie Hua Ren Xiao Hua Za Zhi**. 7: 687-688, 1999.

7.0 - ANEXOS

7.1 - Anexo 1: Artigo aceito para publicação

1 **Histology and histochemistry of the oviduct of the neotropical tortoise**
2 *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812)

3

4 Enely M. S. Firmiano^{1*}, Nathália N. Cardoso¹, Marcos A. J. Santos², Bernadete M.
5 Sousa³, Aparecida A. Nascimento^{2*}, Nadja L. Pinheiro².

6

7

8

9

10

11

12 ¹Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal
13 Rural do Rio de Janeiro-UFRJ, Seropédica, RJ, CEP 23890-000, Brasil.

14 *e-mail: enelydv@hotmail.com cidanasci@globo.com

15 ²Laboratório de Histologia e Embriologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de
16 Janeiro-UFRJ, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, BR 465, Km 7,
17 Seropédica, RJ, CEP 23890-000, Brasil.

18 ³Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas,
19 Universidade Federal de Juiz de Fora-UFJF, Campus Universitário s/n, Martelos, Juiz de Fora,
20 MG, CEP 36036-900, Brasil.

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

Ms. No. JCH-12-1278

Journal Title: Cytology & Histology

Dear Dr. Enely Maris da Silveira Firmiano

We are pleased to inform you that your MS have received excellent comments and has been accepted without changes. Thus as per the review comments we are taking the original submission as revised version.

In case you want to amend any changes, please email within 24 hours.

With Regards,

Manging Editor


Cytology & Histology

JCH

- > Home
- > Aims and Scope
- > Editorial Board
- > Editor-in-Chief
- > Instructions for Authors
- > Submit Manuscript
- > Current Issue
- > Previous Issue
- > Special Issues
- > Articles in Press
- > Archive
- > Most viewed articles
- > Contact Editorial Office
- > Indexing and Archiving

Search : Advanced Search [Home](#) | [Join](#) | [Contact](#) [YouTube](#) [RSS](#) [in](#) [t](#) [f](#) [wi](#)

Highly Accessed Articles-2012[Q2]
Research Highlights

 **False negatives in thyroid cytology**
Sensitivity of FNA for detection of FVPTC is reduced compared to conventional papillary carcinoma impact of nodule size is not significant

Current Issue Articles

Carbaryl, A Pesticide Causes "Toxic Hepatitis" in Albino Rats

Cytology & Histology
"Argentina Diagnostic Imaging Market
SBWire (press release) - 14 Jan 2013
The report provides value (USD million) data for each segment and sub-segment within seven market categories - Clinical Chemistry, Genetic Testing, Haematology, Histology And Cytology,

Special Issues

- **Upcoming Special Issues**
- **Previous Special Issues**


Impact Factor: 1.067 *
Index Copernicus Value: 4.43

Database of Medicines

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH
NIH-Funded Articles

OMICS Group Conferences
Assisting Scientific Discovery

Pharmaceutica-2013
3rd International Exhibition and Conference on **Pharmaceutics & Novel Drug Delivery Systems**

Site consultant **OFFLINE** 
Leave your message

Email Alerts
E-mail

7.3 - Anexo 2: Data sheet do Kit ABC



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

Elite
ABC KIT
Cat. No. PK-6200

INSTRUCTIONS FOR IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING

INTRODUCTION

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

Avidin is a 68,000 molecular weight glycoprotein with an extraordinarily high affinity ($10^{15}M^{-1}$) for the small molecular weight vitamin, biotin. Because this affinity is over one million times higher than that of antibody for most antigens, the binding of avidin to biotin (unless antibody-antigen interactions) is essentially irreversible. In addition to this high affinity, the Biotin/Avidin System can be effectively exploited because avidin has four binding sites for biotin and most proteins (including antibodies and enzymes) can be conjugated with several molecules of biotin. These aspects provide the potential for the macromolecular complexes to be formed between avidin and biotinylated enzymes.

An immunoperoxidase procedure based on these properties was devised for localizing a variety of histologically significant antigens and other markers. (Hsu SM, Raine L, Fanger H: *Am. J. Clin. Pathol.* 73, 734-738, 1981; Hsu SM, Raine L, Fanger H: *J. Histochem. Cytochem.* 29, 577-580, 1981.) This technique employs unlabeled primary antibody, followed by biotinylated secondary antibody and then a preformed Avidin and Biotinylated horseradish peroxidase macromolecular Complex. This has been termed the ABC technique.

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

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

PREPARATION OF VECTASTAIN® WORKING SOLUTIONS

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

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

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

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

ENZYME SUBSTRATES

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

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

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

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

STAINING PROCEDURE FOR PARAFFIN SECTIONS

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

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

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

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

STAINING PROCEDURE FOR FROZEN SECTIONS

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

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

MULTIPLE ANTIGEN LABELING ON SAME TISSUE SECTION

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

RAPID STAINING PROCEDURE

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

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

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

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

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

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

NOTES:

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

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

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

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

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

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

The following biotinylated antibodies can be used in conjunction with any VECTASTAIN[®] ABC Kit:

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

^a - Suitable for use with bovine IgG primary antibodies.

^b - Designed for use in rat tissues.

^c - Designed for use in mouse tissues.

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

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

2 ml water and diluted 1:50 for use.

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

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

† Chain specific antibodies are also available.

Other related reagents also available are:

Antigen Unmasking Solution (dilutes to 25 liters)		
Citrate-based	250 ml	H-3300
High pH	250 ml	H-3301
Avidin/Biotin Blocking Kit	1 Kit	SP-2001
ImmEdge [®] Pen	2-pen set	H-4000
ImmPrint [®] Pen	5-pen set	H-6100
VECTABOND [®] Reagent (dilutes to 350 ml)	7 ml	SP-1800
VectaMount [®] Mounting Medium	60 ml	H-5000
VectaMount [®] AQ Mounting Medium	60 ml	H-5501
Vector [®] Hematoxylin	500 ml	H-3401
Vector [®] Hematoxylin QS	100 ml	H-3404
Vector [®] Methyl Green	500 ml	H-3402
Vector [®] Nuclear Fast Red	500 ml	H-3403

Heat-treated, ultrafiltered normal serum from

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

Peroxidase Substrates

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

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

® is a registered trademark of Vector Laboratories, Inc.

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

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

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

7.3 - Anexo 3: Data sheet do Anti-soro diluente

ADS-XXXRUO
Rev B
Page 1 of 1



Antibody Diluent

	Catalog #
	ADS-125
Size	125 ml

INTENDED USE:	For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.
DESCRIPTION:	Antibody diluent is prepared for use in immunochemical procedures. Antibodies can be diluted directly in this reagent.
APPLICATIONS:	Immunohistochemistry (IHC)
CONTENTS:	Tris buffer, pH 7.6 with 1% BSA and less than 0.1% sodium azide
STORAGE & STABILITY	Store at 2-8°C. Do not freeze. The user must validate any other storage conditions. This reagent must be returned to the storage conditions identified above immediately after use. When properly stored, the reagent is stable to the date indicated on the label. Do not use the reagent beyond the expiration date. If unexpected results are observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the reagent is suspected, contact Technical Support at tech@springbio.com .
WARNINGS & PRECAUTIONS:	<ol style="list-style-type: none">1. Take reasonable precautions when handling reagents. Wear appropriate Personal Protective Equipment.2. Avoid contact of reagents with eyes, mucous membranes and skin. If reagents come into contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.3. Consult local or state authorities with regard to recommended method of disposal.4. Avoid microbial contamination of reagents.

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

Tel: 1-925-474-8440
Toll Free: 1-800-787-8896
Fax: 1-925-474-8400

7.4 - Anexo 4: Data sheet do DAB

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

Stable DAB/Plus Liquid Format

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

IVD: For In Vitro Diagnostic Use

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

DBS

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

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

7.5 - Anexo 5: Data sheet do anti-soro anti-motilina

Anti Motilin (Human, Porcine) Serum

Cat. No. Y121 Lot No. 110571127

Description: This antiserum was raised in a rabbit by immunization with a carrier free synthetic motilin (human, porcine) peptide. The product vial contains 50 μ L of the titled antiserum obtained by lyophilizing its 0.001 M phosphate buffer (pH 7.0, 0.5mL) solution. It can be used for immunoassay, immunohistochemistry or any other immunoreaction with motilin (human, porcine).

Immunogen: Synthetic motilin (human, porcine), carrier free **Host:** Rabbit

Amino Acid Sequence of Motilin (human, porcine)¹⁾: FVPIFTYGEL QRMQEKERNK GQ

Product Form: Lyophilized unpurified serum **Size:** 50 μ L

Reconstitution: Reconstitute the product with 0.5mL of 0.01M PBS (pH 7.0) to make a 10 fold diluted stock solution. If it is stored in a refrigerator, add moderate antiseptic to the solution (e.g. NaN₃ 0.1%).

Storage: The product will be stable for over one year if it be stored at -20°C to -80°C until opened. Upon reconstitution, the antiserum solution must be stored at 2°C to 8°C and used within one month. Repeated freezing-thawing should be avoided.

Suggested Working Dilution Range: 1:1,000 (final dilution~1:7,000) for radioimmunoassay; 1: 1,000- 4,000 for immunohistochemistry (frozen or paraffin sections). Optimal dilution should be determined by each laboratory for each application.

Specificity (based on radioimmunoassay): Motilin (human, porcine) 100%, motilin (human, porcine) (7-22) 69.2%, motilin (human, porcine) (12-22) 115%, motilin (human, porcine) (1-6) Me 0.09%, [15-glutamine]-motilin (human, porcine) 96.7%²⁾

Positive Control (immunohistochemistry): Porcine duodenum

Species Tested: Porcine, human, dog, emu, chicken, quail^{3,4)}

REFERENCES:

- 1) J.C. Brown, M.A. Cook and J.R. Dryburgh, Motilin, a gastric motor activity stimulating polypeptide: the complete amino acid sequence. Canadian Journal of Biochemistry 51:533-537, 1973
- 2) N. Yanaihara, C. Yanaihara et al., Motilin-like immunoreactivity in porcine, canine, human and rat tissues, Biomedical Research 1: 76-83, 1980
- 3) T. Shimosegawa, S. Kobayashi et al., Motilin-like immunoreactivity in the canine pituitary and pineal glands-a histochemical study. Folia Endocrinologia 60: 54-62, 1984
- 4) J. Yamada, M. Arita et al., Heterogeneity of motilin-immunoreactive cells in the duodenum and pyloric region of avian species, Archives of Histology and Cytology 56: 261-267, 1993

FOR RESEARCH LABORATORY USE ONLY
DO NOT USE ORGANIC SOLVENTS FOR DISSOLVING ANTISERUM



Yanaihara Institute Inc.

2480-1 Awakura, Fujinomiya, Shizuoka, 418-0011 Japan
TEL: +81-544-22-2771 FAX: +81-544-22-2770

For more information, please visit our internet website: <http://www.yanaihara.co.jp> or contact us to: ask@yanaihara.co.jp

Copyright: Yanaihara Institute Inc. 2004. All Rights Reserved

7.6 - Anexo 6: Data sheet do anti-soro anti-serotonina



Anti-Serotonin (5-Hydroxytryptamine, 5-HT)

Developed in Rabbit
Delipidized, Whole Antiserum

Product No. S5545

Lot No. 127H4813

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

Specificity

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

Protein Concentration: 63 mg/ml by Biuret.

Working Dilutions

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

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

Description

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a widely distributed neurotransmitter and hormone in the mammalian central nervous system (CNS) and periphery.^{1,2} In the CNS, 5-HT is considered an inhibitory neurotransmitter regulating a wide range of sensory, motor and cortical functions. In the periphery, 5-HT is present in neural and non-neural structures, e.g. platelets, gastrointestinal tract (myenteric plexus, enterochromaffin cells), lungs (neuroepithelial cells), thyroid gland, spleen and in mast cells of certain species such as rat and mouse.^{2,3,4} 5-HT is involved in the regulation of diverse functions including blood pressure, gastrointestinal motility, pain perception, platelet aggregation, lymphocyte cytotoxicity and phagocytosis, appetite and sleep^{2,5} and is implicated in several pathological states including carcinoid tumors, migraine, and hypertension.^{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.^{5,10} 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-HT_{1A/2} subfamily (5-HT_{1A/2}) 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.

7.7 - Anexo 7: Data sheet do anti-soro anti-somatostatina



Polyclonal Rabbit Anti-Somatostatin

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

English

Code A0566

Protein concentration g/L: See label on vial.

Intended use

For In Vitro Diagnostic Use.

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

Summary and explanation

Introduction

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

Specificity

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

Reagent provided

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

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

Materials required, but not supplied

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

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains Sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, NaN_3 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.