

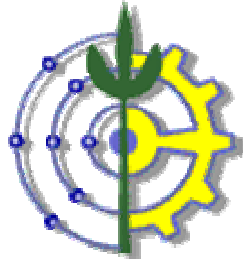
UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
ANIMAL

DISSERTAÇÃO

IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS
NEUROENDÓCRINAS DO TUBO GASTRINTESTINAL
DE *Pimelodus maculatus* (SILURIFORMES,
PIMELODIDAE) DOS RESERVATÓRIOS DE FUNIL E
SANTA BRANCA

THATIANA DA PAZ RIBEIRO

2009



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

**IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS
NEUROENDÓCRINAS DO TUBO GASTRINTESTINAL DE
Pimelodus maculatus (SILURIFORMES, PIMELODIDAE) DOS
RESERVATÓRIOS DE FUNIL E SANTA BRANCA**

THATIANA DA PAZ RIBEIRO

Sob a orientação do professor

Armando Sales

e

Co-orientação da professora

Nadja Lima Pinheiro

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

Seropédica – RJ,
Abril de 2009

597.5204

R484i

T

Ribeiro, Thatiana da Paz, 1982-
Imuno-Histoquímica das células
neuroendócrinas do tubo
gastrintestinais de *Pimelodus
maculatus* (Siluriformes,
pimelodidae) dos reservatórios de
funil e Santa Branca / Thatiana da
Paz Ribeiro - 2009.

46 f. : il.

Orientador: Armando Sales.
Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa de Pós-
Graduação em Biologia animal.

Bibliografia: f. 31-36

1. Peixe - Aparelho digestivo -
Teses. 2. Peixe - Citologia -
Teses. 3. Sistema gastrintestinal -
Teses. 4. Estomago - Teses. I.
Sales, Armando, 1945-. II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Animal. III.
Título.

DEDICATÓRIA

Ao meu amado filho:
Fabianno Jr., meus
queridos pais: Candido da
Luz Ribeiro de Souza e
Maria Valduleide
Francisca da Paz Ribeiro,
assim como todos àqueles
que sempre acreditaram
em mim, especialmente
aos professores Armando
Sales e Aparecida Alves
do Nascimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar por me dar forças e saúde para concretizar meus sonhos; por me dar uma família tão especial e unida; pais zelosos e que me dedicam um amor incondicional, que fazem o que podem e até o que não podem para me ajudar no que for necessário, pela formação do meu caráter; um filho essencial que enche minha vida de alegria, me fortalece e estimula nos momentos de dificuldades; irmãos que acreditam que eu posso e se orgulham com as minhas conquistas; pelos meus padrinhos, avós, tios, primos, afilhada e madrasta que me fazem lembrar que para eles sou importante e querem me ver vencer.

Especialmente ao Professor Dr. Armando Sales pela confiança e orientação durante toda realização deste trabalho, assim como à Professora Dr^a. Aparecida Alves do Nascimento, ambos pelos ensinamentos acadêmicos, incentivo e apoio desde a graduação até os dias de hoje. Sempre estiveram presentes em momentos importantes da minha jornada profissional e minha vida pessoal; além de sempre estarem prontos para dar atenção, conselhos e plena ajuda no que fosse preciso. São exemplos de vida, perseverança e dedicação. Sou eternamente grata a eles e levo-os em meu coração.

Aos amigos de laboratório: Clarice Machado dos Santos e à técnica Ilza Lucas Coelho Meirelles pelos ensinamentos, assistência tanto profissional como emocional em algumas vezes, pela lição de vida que tive com elas, auxílio na microtomia e na preparação do material de imuno-histoquímica.

Ao Professor Dr. Vinícius Rezende Ribeiro pelo convite de estagiar na histologia, fazendo com que eu descobrisse que é uma área maravilhosa e hoje estou me especializando.

Aos demais docentes da área de Histologia e Embriologia pela paciência e solicitude nos momentos necessários: Professora Dr^a. Nadja Lima Pinheiro, Professora Dr^a. Rosa Maria Mendes, Professor Dr. Marco Antônio e Professor Dr. Andre Luiz da Silva Mendes.

Aos amigos que permanecem desde a graduação convivendo comigo, me apoiando e torcendo por mim: Vivian de Assunção Nogueira, Caroline Martins, Tatiane Kawamura, Francis Arthur Seco Prando e Francine Enobi.

Aos amigos que fiz no laboratório pela atenção e carinho dispensados: Sônia, Oséas, Roberto, Andrej e Fabrícia.

Ao Fernando Luiz da Silva Lopes pela ajuda na finalização das tarefas. Ao amigo José Renato pela ajuda com o programa Google Earth.

Meus sinceros agradecimentos ao Professor Dr. Francisco Gerson Araújo, Silvana Duarte, Rafael Jardim Albieri, Iracema David, Wagner Uehara e Paulo que me direcionaram na coleta de todo o material aqui estudado.

Ao Carlos Antonio do Nascimento Santos e Bernardo Oliveira Pascarelli pelo apoio na imuno-histoquímica e histomorfometria.

Aos amigos do curso de Pós-graduação: Igor, Ramon Brum, Emerson Garcia, Ana Paula, Tatiana Pires Teixeira, Leonardo, Bianca e Paulinha pela amizade, solidariedade de compartilhar informações importantes e convivência produtiva.

BIOGRAFIA

Thatiana da Paz Ribeiro, filha de Candido da Luz Ribeiro de Souza e Maria Valduleide Francisca da Paz, mãe de Fabianno Paz Gaspar Júnior, nasceu em 11 de junho de 1982, no município de Cabo Frio – Rio de Janeiro.

Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no curso de Medicina Veterinária no ano de 2001, tendo concluído em 2007. No final do primeiro período da graduação em Medicina Veterinária foi convidada a estagiar na área de Histologia e Embriologia Animal, onde exerceu a função no período de 01 de fevereiro de 2002 a 31 de dezembro de 2003, sob a orientação do professor Vinícius Rezende Ribeiro. Foi monitora na mesma área de 01 de junho de 2005 até 08 de agosto de 2006, sob a orientação do professor Armando Sales. Em agosto de 2006 passou a ser bolsista de Iniciação Científica do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica – (PIBIC/CNPq - UFRuralRJ) até 2007, também sob a orientação do professor Armando Sales.

No decorrer do curso também estagiou em outras áreas: Consultório de Pequenos Animais, sob a orientação da Médica Veterinária Autônoma Selma Coutinho; Parasitologia Animal, sob a orientação da Professora Rita de Cássia Alves Alcântara Menezes (04/11/2002 – 14/11/2003); Doenças Parasitárias, sob a orientação do Professor Argemiro Sanavria (7/2005 - 11/2006) e Hospital de Grandes Animais, sob a orientação do Professor Gilberto (01/2006 – 06/2006), porém sua escolha foi direcionada para área de Histologia e Embriologia.

Sua atividade científica teve início no ano de 2003, através do estágio na Parasitologia Animal da UFRRJ, depois iniciou atividades desta categoria na Histologia e Embriologia. Desde essa época têm submetido trabalhos e resumos para publicação em revistas científicas, anais de congressos, conferências e semanas acadêmicas de produção científica.

Ingressou no curso de Pós-graduação em Biologia Animal (Nível mestrado) em março de 2007.

RESUMO

RIBEIRO, Thatiana da Paz. **Imuno-histoquímica das células neuroendócrinas do tubo gastrintestinal de *Pimelodus maculatus* (Siluriformes, Pimelodidae) dos reservatórios de Funil e Santa Branca.** 2009. 44p Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Este trabalho teve por objetivo analisar a influência do habitat na distribuição regional e frequência relativa das células neuroendócrinas gastrintestinais secretoras de colecistoquinina (CCK-8), gastrina, serotonina (5-Hidroxitriptofano/5HT) em *Pimelodus maculatus*. Foram utilizados ao todo 18 animais, destes, 12 eram do reservatório da Usina Hidrelétrica de Funil e 6 eram do reservatório de Santa Branca. Após a coleta os peixes foram sacrificados por hipotermia e dissecados em campo. Fragmentos de estômago (região fúndica e pilórica) e intestino foram fixados em líquido de Bouin, processados e emblocados em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram colocados em lâminas previamente tratadas com poly-L-lisina e posteriormente submetidos à técnica de imuno-histoquímica. Três tipos de células imunorreativas (IR) foram identificadas na mucosa gástrica e intestinal de *P. maculatus*. Os anticorpos utilizados foram: anti-CCK-8, anti-gastrina e anti-5-HT. Células IR a CCK-8, gastrina e 5-HT foram encontradas tanto no estômago quanto no intestino nos peixes de ambos os reservatórios. De acordo com o teste estatístico não paramétrico denominado Mann Whitney houve diferença significativa quanto à frequência relativa das células ao se comparar os ambientes aquáticos e as regiões do tubo gastrintestinal. As células IR à CCK-8 foram mais abundantes na região pilórica que na região fúndica do estômago; no intestino elas se apresentaram como sendo do tipo aberto. As células IR à gastrina foram abundantes e fortemente marcadas nas três regiões estudadas, sendo o tipo celular predominante. As células IR à 5-HT foram mais abundantes nos peixes do reservatório de Funil, sua frequência foi maior na região pilórica do estômago.

Palavras chave: *Pimelodus maculatus*, células neuroendócrinas, trato gastrintestinal, imuno-histoquímica.

ABSTRACT

RIBEIRO, Thatiana da Paz. **Immunohistochemistry of neuroendocrine cells of the gastrointestinal tube of *Pimelodus maculatus* (Siluriformes, Pimelodidae) from Funil and Santa Branca reservoirs.** 2009. 70p Masters Dissertation in Animal Biology. Institute of Biology, Department of Animal Biology, Rio de Janeiro Federal Rural University, Seropédica, RJ, Brazil, 2009.

The objective of this work is to analyze the influence of habitat on the regional distribution and relative frequency of gastrointestinal neuroendocrine cells that secrete cholecystinin octapeptide (CCK-8), gastrin and serotonin (5-HT) in *Pimelodus maculatus*. All told, 18 fish were utilized, 12 of them taken from Funil Reservoir in the state of Rio de Janeiro and 6 from Santa Branca Reservoir in the state of São Paulo. The fish were sacrificed by hypothermia and dissected in the field. Fragments of the stomach (fundic and pyloric region) and intestine were fixed in Bouin's fluid, processed and embedded in paraffin. Sections 5 µm thick were placed on slides previously treated with poly-L-lysine and then submitted to immunohistochemical analysis. Three types of immunoreactive (IR) cells were identified in the gastric and intestinal mucosa of *P. maculatus*. The antibodies used were anti-CCK-8, anti-gastrin and anti-5-HT. Cells IR to CCK-8, gastrin and 5-HT were found in the stomach and intestine of the fish from both reservoirs. According to the Mann-Whitney nonparametric test, there was a significant difference in the relative frequency of cells between the two reservoirs and regions of the gastrointestinal tube. The cells IR to CCK-8 were more abundant in the pyloric region than in the fundic region of the stomach. In the intestine they were of the open type. The cells IR to gastrin, the predominant cell type, were abundant and strongly marked in the three regions studied. The cells IR to 5-HT were more abundant in the fish from Funil Reservoir, and their frequency was greatest in the pyloric region of the stomach.

Keywords: *Pimelodus maculatus*, neuroendocrine cells, gastrointestinal tract, immunohistochemistry.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Procedimento laboratorial para a produção de anticorpos monoclonais.....	08
Figura 2	Representação esquemática das etapas do método imunoenzimático ABC- Complexo avidina-biotina-enzima.....	10
Figura 3	Representação esquemática da molécula de 5 – HT.....	11
Figura 4	Representação esquemática da formação da gastrina.....	12
Figura 5	Foto da espécie <i>Pimelodus maculatus</i>	14
Figura 6	Foto tirada do Reservatório de Funil pelo programa Google Earth.	15
Figura 7	Foto tirada do Reservatório de Santa Branca pelo programa Google Earth.....	16
Figura 8	Fotomicrografias de células IR a CCK no estômago, região fúndica.....	20
Figura 9	Fotomicrografias de células IR a CCK no estômago, região pilórica.....	21
Figura 10	Fotomicrografias de células IR a CCK no intestino.....	21
Figura 11	Fotomicrografias de células IR a gastrina no estômago, região fúndica.....	23
Figura 12	Fotomicrografias de células IR a gastrina no estômago, região pilórica.....	24
Figura 13	Fotomicrografias de células IR a gastrina no intestino.....	24
Figura 14	Fotomicrografias de células IR a 5-HT no estômago, região fúndica.....	25
Figura 15	Fotomicrografias de células IR a 5-HT no estômago, região fúndica.....	26
Figura 16	Fotomicrografias de células IR a 5-HT no estômago, região pilórica.....	26.
Figura 17	Fotomicrografias de células IR a 5-HT no intestino.....	27
Figura 18	Fotomicrografias de células IR a 5-HT no intestino.....	27

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Quantidade de peixes utilizados no trabalho, com seus respectivos locais de coleta.....	16
Quadro 2	Detalhes dos Anticorpos e principais reagentes utilizados.....	17
Tabela 1	Distribuição e frequência relativa das células endócrinas gastrintestinais de <i>P. maculatus</i> do reservatório de Funil (A) e do reservatório de Santa Branca (B).....	19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Organização do tubo gastrintestinal de <i>P. maculatus</i>	4
3.1.1 Estômago	4
3.1.2 Intestino	5
3.2 Células do sistema neuroendócrino difuso	5
3.3 Estudo imuno-histoquímico	7
3.3.1 Antígenos e anticorpos	7
3.3.2 Solução de anticorpo	7
3.3.3 Método	9
3.3.4 Reações não específicas	9
3.3.5 Reações cruzadas	9
3.4 Os Peptídeos Reguladores e Aminas Biogênicas Investigadas	11
3.4.1 Serotonina	11
3.4.2 Gastrina	12
3.4.3 Colecistoquinina - CCK	13
3.5 Sistemática do mandi-amarelo	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Preparação dos cortes histológicos	16
4.2 Antissoros e reagentes	17
4.3 Etapas do procedimento Imuno-histoquímico	17
4.4 Observações e Fotomicrografias	18
4.5 Contagem de células e análise estatística	18
5 RESULTADOS	19
5.1 Células imunorrativas ao anticorpo anti-CCK-8	20
5.2 Células imunorrativas ao anticorpo anti-gastrina	22
5.3 Células imunorrativas ao anticorpo anti-5-HT	25
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÕES	30
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1 INTRODUÇÃO

A morfologia do trato gastrintestinal tem sido descritas em inúmeras espécies de peixes (Khanna & Mehrotra, 1971; Harder, 1975; Kaapoor *et al.*, 1975; Tibbets, 1997), despertando considerável interesse pelas amplas variações na morfofisiologia, como reflexo da elevada diversidade do grupo, e de posições na cadeia trófica. Apesar das diferenças interespecíficas no trato gastrintestinal, semelhanças estruturais básicas são comuns dentro do grupo (Dias *et al.*, 2003). Em algumas espécies estas diferenças estão proximamente relacionadas com sua natureza alimentar, tamanho do corpo e sexo (Kapoor *et al.*, 1975; Smith, 1989).

A ocorrência de células mucossecretoras é uma característica comum no trato digestório de teleósteos, com as mucossubstâncias secretadas diferindo ao longo do canal alimentar. A presença de glicoproteínas (GPs) é correlacionada a diferentes funções, como lubrificação, degradação proteolítica e inibição de microrganismos (Reid *et al.*, 1988). Alguns trabalhos têm sido realizados sobre morfologia do trato digestório de peixes neotropicais onívoros. Menin & Mimura (1992) descreveram a histologia do trato digestório de *Pimelodus maculatus*, e salientaram a presença de células mucossecretoras na mucosa ao longo do trato.

A quase totalidade dos peptídeos são reconhecidamente hormônios (segundo a clássica definição de Bayliss & Starling, 1902), embora alguns sejam considerados como ‘candidatos a hormônios’ (Grossman, 1977) e outros atuem como reguladores locais. O termo peptídeo regulador é o mais aceito para designá-los.

No trato digestório as células endócrinas constituem um complexo sistema celular disseminado entre os componentes epiteliais das mucosas do estômago e dos intestinos, com capacidade de secretar hormônios polipeptídios e aminas fisiologicamente ativas (Carvalho *et al.*, 1968). Os mensageiros químicos produzidos por estas células são polipeptídios e aminas biogênicas. Estes hormônios desenvolvem importante função na regulação do processo digestivo, através do controle na absorção dos nutrientes, na secreção intestinal e das glândulas associadas, na motilidade intestinal e no fluxo sanguíneo intestinal (Deveney & Wal, 1983).

P. maculatus é um peixe de hábito alimentar onívoro com tendência à ictiofagia e ampla plasticidade na dieta. Esta espécie apresenta grande distribuição geográfica, grandes variações cromáticas e até estruturais, pode ser encontrado na Amazônia, Guianas, Venezuela, Peru, Bolívia, Paraguai, Argentina, Bacia do Paraná, do Prata, Rio Uruguai e Rio Iguaçu. É abundante e importante na pesca comercial (Lolis & Andria, 1996), com ótima aceitação pelo mercado consumidor, conhecido popularmente como mandi-amarelo.

Os peixes utilizados neste trabalho pertencem a dois ambientes com diferentes qualidades de águas. Um destes ambientes foi o reservatório de Funil, considerado eutrófico e de mais baixa qualidade ambiental, quando comparado com o reservatório de Santa Branca, considerado oligotrófico e de melhor qualidade ambiental (Duarte, 2007).

O avanço recente dos métodos imunohistoquímicos, a obtenção de anticorpos específicos aliados às técnicas de radioimunoensaio, radioimunohistoquímica, química de peptídeos sintéticos e ultimamente da engenharia genética, permitiram identificar, localizar e quantificar cerca de 35 “peptídeos reguladores” no sistema endócrino, como também alguns de seus precursores (Polak & Bloom, 1983; Yanaihara *et al.*, 1988).

As investigações das células endócrinas do tubo gastrintestinal são consideradas uma importante parte no estudo filogenético (D’Este *et al.*, 1994).

Além disso, a distribuição regional e a frequência relativa destas células têm variado conforme a espécie animal e seu hábito alimentar (Solcia *et al.*, 1975).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um estudo descritivo (piloto) com o propósito de verificar a presença, a distribuição e a frequência de células neuroendócrinas secretoras de colecistoquinina (CCK), gastrina e serotonina (5-HT) que dê suporte para a realização de um estudo analítico capaz de evidenciar os fatores determinantes do ambiente que influenciam a fisiologia do sistema digestório do peixe mandi-amarelo (*P. maculatus*), de forma a contribuir para o estudo morfológico, assim como para a fisiologia e a patologia do sistema digestório de peixes.

2.2 Objetivos Específicos

Identificar no tubo gastrintestinal de *P. maculatus* células neuroendócrinas secretoras de colecistoquinina, gastrina e serotonina.

Comparar a influência de ambiente eutrofizado e não-eutrofizado na distribuição e frequência daquelas células neuroendócrinas do tubo gastrintestinal de *P. maculatus*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Organização do tubo gastrintestinal de *Pimelodus maculatus*.

3.1.1 Estômago

De modo geral, o estômago armazena temporariamente o alimento, desempenha funções mecânicas que auxiliam na trituração e início da digestão dos alimentos e a superfície interna (mucosa) contém uma variedade de células glandulares endócrinas (que secretam hormônios - função endócrina) e secretoras exócrinas (Rotta, 2003). Estas últimas produzem o muco, o suco gástrico e secretam enzimas (funções exócrinas). Tanto a atividade muscular quanto a química são importantes para transformar o bolo alimentar em quimo. Na maioria dos peixes o pH do estômago é extremamente ácido (entre 2,4 e 4,2) (Rotta, 2003).

O tamanho do estômago pode ser usualmente relacionado com o intervalo entre as refeições e o tamanho das partículas do alimento ingerido. Os peixes que consomem grandes presas em intervalos esparsos possuem grandes estômagos e aqueles que se alimentam de pequenas partículas (i.e. micrófagos) possuem freqüentemente, pequenos estômagos ou não os possuem (p. ex.: carpa comum). Peixes onívoros e herbívoros realizam muitas refeições diárias, porém, consomem pouco alimento por refeição e, por isso, geralmente apresentam estômago de menor volume (Rotta, 2003).

O estômago de *P. maculatus* é dividido histologicamente em três regiões: cárdica, fúndica e pilórica. O cárdia e o piloro possuem esfíncteres que controlam a passagem dos alimentos pelo estômago, porém, em alguns peixes, o esfíncter cárdico pode estar ausente (Rotta, 2003). A túnica mucosa é continuamente revestida por um epitélio simples cilíndrico. Sua lâmina própria possui glândulas tubulares constituídas por células chamadas de oxintocopépticas, as quais se abrem nas criptas das pregas da mucosa, ocorrendo predominantemente na porção fúndica e tornado-se escassas na região pilórica (Santos *et al.*, 2007). A transição entre a lâmina própria e a túnica submucosa é demarcada pela presença de uma muscular da mucosa. A túnica muscular na região cárdica e fúndica contém duas camadas de músculo liso: uma circular interna e outra longitudinal externa. Na região pilórica observaram-se três camadas, sendo uma oblíqua mais internamente. Externamente, o estômago é recoberto por uma serosa (Santos *et al.*, 2007).

As células epiteliais do estômago secretam um muco alcalino, composto por água (95%), glicoproteínas, lipídeos e também são responsáveis pela secreção de bicarbonato. A parte do muco que está firmemente aderida ao glicocálice das células epiteliais é muito efetiva na proteção da mucosa gástrica, enquanto a parte menos aderida (luminal) é mais solúvel, sendo parcialmente digerida pela pepsina e misturada com o conteúdo luminal. Assim, o muco forma uma espessa camada que protege as células da acidez do estômago. A rede de vasos na lâmina própria e na submucosa permite a nutrição e a remoção de metabólitos tóxicos das células mucosas superficiais, e dessa forma funciona como mais um fator de proteção.

Assim como o ácido clorídrico (HCl), a pepsina e as lipases (gástricas) também devem ser consideradas como fatores endógenos de agressão à mucosa de revestimento do estômago.

3.1.2 Intestino

O intestino dos peixes teleósteos é um tubo relativamente simples, na válvula que se inicia na válvula pilórica, termina no reto e não é separado em delgado e grosso, como nos mamíferos. Possui glândulas digestivas e um suprimento abundante de vasos de sangue e de linfa, onde se completa a digestão iniciada no estômago. No intestino é onde ocorre a maior parte da absorção dos nutrientes, íons e água oriundos da dieta, sendo os produtos da digestão mantidos em solução, o que facilita a absorção. Nos peixes, além da função de digestão e absorção, o intestino pode desempenhar outras funções, como auxiliar na osmorregulação ou na respiração (Rotta, 2003).

Uma característica básica do intestino dos Teleósteos é a presença de pelo menos dois segmentos intestinais, mesmo sem a separação entre intestino delgado e grosso. Na primeira porção ocorre a absorção de nutrientes em suas formas menores (monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos), enquanto a segunda parte é responsável pela entrada de macromoléculas por pinocitose. As porções intestinais que apresentam mucosa mais complexa estão envolvidas, de modo geral, com processos absorptivos (Rotta, 2003).

O intestino de *P. maculatus* pode ser dividido em proximal, médio e distal (Santos *et al.*, 2007). A mucosa apresenta vilosidades, dobras e cristas que auxiliam na digestão, servindo para aumentar a superfície de secreção e absorção. Nos peixes em jejum, essas estruturas diminuem muito, como também o diâmetro e o comprimento do intestino (Rotta, 2003).

O epitélio de revestimento do intestino é simples cilíndrico com planura estriada e células caliciformes, estas, aparecendo mais numerosas no duodeno. Neste abre-se o canal do colédoco cuja mucosa é revestida por um epitélio simples cilíndrico sem células caliciformes, seguido por uma lâmina própria e uma camada muscular bem definida. Em todo o intestino observa-se a presença de uma muscular da mucosa que separa a lâmina própria da submucosa. A camada muscular é composta por uma camada circular interna e outra longitudinal externa de músculo liso. A serosa está presente em todo o intestino, e consiste de uma capa de mesotélio (Santos *et al.*, 2007).

O comprimento do intestino varia conforme o hábito alimentar e as características dos alimentos naturalmente ingeridos pelos peixes (Rotta, 2003).

Deve-se destacar que peixes onívoros e herbívoros apresentam a capacidade de alterar a estrutura e as propriedades absorptivas do seu sistema digestivo em resposta a mudanças na dieta sendo, portanto substrato dependentes. O aumento na quantidade de glicídios na alimentação pode provocar aumento no comprimento do intestino e na absorção de glicose por alguns Teleósteos, fato que não ocorre nos carnívoros. Essas diferenças devem-se, provavelmente, à adaptação das espécies, pois peixes onívoros e herbívoros estão sujeitos a grandes variações na composição bromatológica da dieta, diferente do que ocorre na dieta dos carnívoros (Rotta, 2003).

3.2 Células do sistema neuroendócrino difuso.

As células endócrinas estão localizadas na mucosa e na submucosa do estômago, intestinos, assim como no pâncreas e secretam diversos hormônios (Bell, 1979). Alguns desses hormônios agem sobre as células secretoras localizadas na parede do tubo gastrintestinal, no pâncreas ou no fígado de forma a alterar a velocidade ou a composição de suas secreções, outros agem nas células musculares

lisas em segmentos específicos do tubo gastrintestinal, sobre os esfíncteres ou a musculatura da vesícula biliar (Berne & Levy, 2000). Todos os hormônios sintetizados por células glandulares endócrinas localizadas no tubo gastrintestinal, bem como os hormônios pancreáticos, são produzidos por células que possuem características citoquímicas e ultra-estruturais comuns (Carvalho *et al.*, 1968; Pearse, 1968).

Pearse (1968) desenvolveu o conceito de um sistema celular muito amplo, denominado sistema APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) que inclui todas as células endócrinas do tubo digestório e outras células endócrinas de diferentes órgãos, como as células C e M hipofisárias, as C da tireóide, as células secretoras de adrenalina e noradrenalina da medular da adrenal e as A, B e D das ilhotas pancreáticas. Todas estas células apresentam uma série de características bioquímicas comuns, tais como: captação de precursores aminados (Dopa e 5-hidroxitriptofano); presença de aminas fluorogênicas (5-hidroxitriptamina); presença das enzimas aminoácido-descarboxilase e α -glicerídio-fosfato desidrogenase; metacromasia e riqueza em esterase não específica e/ou colinesterase (Spreafico *et al.*, 1977).

A descoberta posterior de numerosos peptídeos reguladores existentes comumente no Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP) e no Sistema gastroenteropancreático (GEP) possibilitou o estabelecimento do Sistema Neuroendócrino Difuso (DNES) (Polak & Bloom, 1983), conceito este que ainda é empregado atualmente para unificar estes tipos celulares.

Até pouco tempo acreditava-se que as células endócrinas GEP fossem derivadas da crista neural (ectoderma) (Pearse, 1969; Fujita & Kobayashi, 1977; Polak *et al.*, 1993), uma vez que elas possuem características similares às de neurônios e alguns de seus mensageiros estão presentes também no sistema nervoso, a exemplo da substância P, serotonina, CCK, opiáceos, bombesina, somatostatina, dentre outros (Fujita & Kobayashi, 1977). Assim as células GEP, como as demais células APUD, foram consideradas a divisão endócrina do sistema nervoso periférico (Polak *et al.*, 1993), ou seja, eram tidas como neurônios altamente modificados ou paraneurônios (Fujita & Kobayashi, 1977). Porém, como vários tipos dessas células não metabolizam aminas, estudos mais recentes têm negado a origem neuroectodérmica dessas células endócrinas, e fortes evidências indicam que, na mucosa digestiva, as células endócrinas originam-se de células-tronco comuns, cuja diferenciação resulta também as células caliciformes, os enterócitos e as células de Paneth, sendo derivadas, então, do endoderma (Santos & Zucoloto, 1996; Rindi *et al.*, 1999; Mutoh *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001; Hassan & Shafi, 2002; Montuega *et al.*, 2003; Puzyrev *et al.*, 2003; Schonhoff *et al.*, 2004; Rindi *et al.*, 2004).

A regulação endócrina é exercida pelo sistema endócrino difuso do aparelho digestório, que representa uma complexa rede regulatória, cujas funções incluem o controle local da secreção, absorção, motilidade, proliferação das células da mucosa e, possivelmente, o controle da barreira imune (Rindi *et al.*, 2004).

Geralmente, um único tipo de célula endócrina secreta somente um hormônio, embora ocasionalmente alguns tipos celulares possam secretar dois hormônios diferentes. É interessante notar que as células do DNES têm sido localizadas não somente no sistema digestório, mas também no sistema respiratório e no pâncreas endócrino. Além disso, alguns dos hormônios produzidos por estas células endócrinas são idênticos às neurosecreções localizadas no SNC. Não se compreende até o momento, o significado da sua diversidade de localização e produção hormonal (Gartner & Hiatt, 1999).

As células do DNES podem ser localizadas por meio de técnicas imuno-histoquímicas para a localização das aminas. Mais de 35 tipos diferentes de células do DNES, localizadas na mucosa do estômago, no intestino delgado, no intestino grosso, no sistema respiratório, na tireóide, na hipófise e na próstata foram descritas (Junqueira & Carneiro, 1999). Este foi um dos campos da pesquisa que mais rapidamente se desenvolveu, especialmente no que diz respeito aos hormônios gastrintestinais (Wu *et al.*, 1997; Zhang & Li, 1997; Zhu *et al.*, 1999).

As fotomicrografias de células endócrinas revelam que estas células se apóiam na lâmina basal e são de dois tipos: as que alcançam a luz do tubo (o tipo aberto) e as que não o fazem (o tipo fechado). O tipo aberto alcança a superfície através de longos prolongamentos apicais que podem atuar monitorando o conteúdo luminal. Os hormônios que estas células liberam atuam tanto em células-alvo na vizinhança imediata da célula sinalizadora (efeito parácrino), quanto através da circulação e alcançam a distância a sua célula-alvo (efeito endócrino) (Junqueira & Carneiro, 2008).

3.3 Estudo imuno-histoquímico

O estudo imuno-histoquímico compreende a utilização de métodos que associam técnicas de imunodiagnóstico, bioquímica e de histologia para a identificação e a localização de compostos ou radicais químicos, nas células e tecidos, por meio da microscopia ótica ou da eletrônica (Rey, 1999). Existem dois métodos amplamente utilizados: Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) e o Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC) (Mills, 1992).

A imuno-histoquímica é uma técnica que usa anticorpos selecionados para a identificação de antígenos específicos. O método é extremamente sensível e pode comumente detectar quantidades muito pequenas de substâncias (Ex: nanogramas ou moléculas individuais).

3.3.1 Antígenos e anticorpos

Na imuno-histoquímica, o antígeno é representado pela substância que tentamos identificar (Ex: gastrina, CCK, 5-HT).

Os anticorpos são proteínas séricas (imunoglobulinas) produzidas em resposta a substâncias específicas (antígenos). No organismo seu propósito é conter ou neutralizar o efeito do antígeno. Nas empresas especializadas são produzidos anticorpos para estes antígenos pesquisados ligados a marcadores visuais (Mills, 1992).

3.3.2 Solução de anticorpo

Os anticorpos podem ser utilizados para reconhecer moléculas específicas com grande precisão e podem ser produzidos em laboratório através da injeção de antígenos em animais. Após a resposta imunitária efetuada pelos animais em contacto com o imunógeno, recolhem-se os anticorpos do seu plasma sanguíneo. Este processo tem como vantagem a obtenção de uma elevada quantidade de anticorpos. Contudo, nos animais e nos seres humanos, a resposta imunitária é, na maior parte das vezes, policlonal, isto é, desenvolvem-se diferentes populações de linfócitos B perante o mesmo agente patogênico. Este tipo de resposta torna-se menos eficiente porque não é canalizado o esforço para a produção do anticorpo mais apropriado, produzido por um único clone de linfócitos B - monoclonal. Na

produção deste tipo de anticorpos, um animal é injetado com um antígeno e, passado algum tempo, é morto. Os linfócitos B são extraídos do baço do animal, incubados “in vitro” e é feita a fusão com células de mieloma, com o intuito de obter anticorpos monoclonais (figura 1).

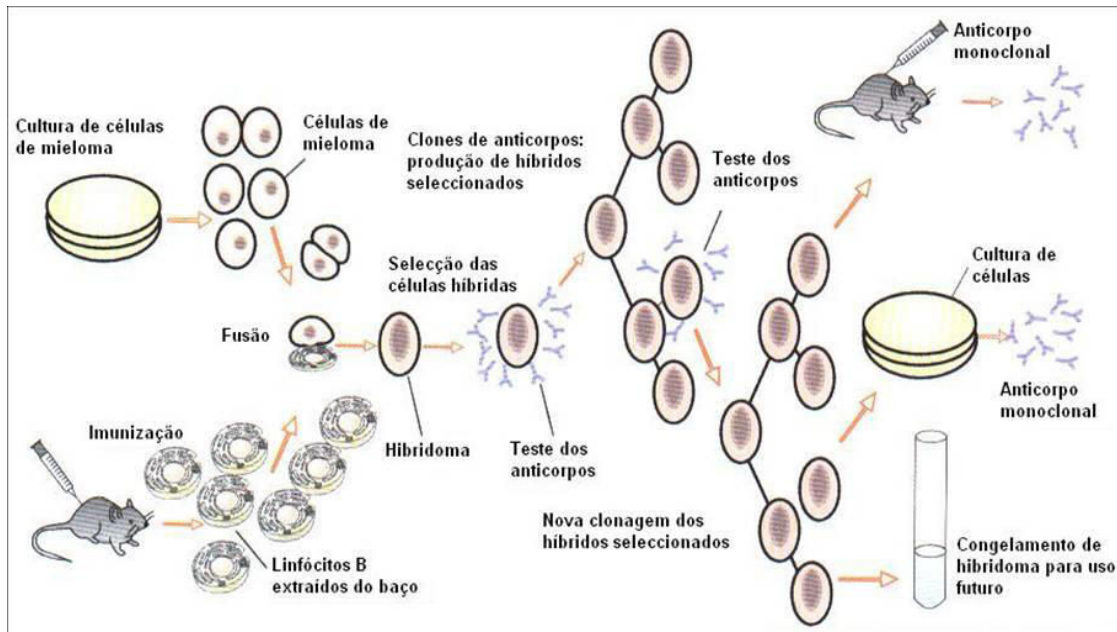


Figura 1 - Procedimento laboratorial para a produção de anticorpos monoclonais (Retirado do site http://pwp.netcabo.pt/sistema.imune/Biotecnologia_no_diagnostico_terapeutica.htm).

Anticorpos policlonais – conjunto de anticorpos com diferentes especificidades, que foram produzidos em contato com um imunógeno. Ainda que o imunógeno que serviu para inocular o animal de laboratório seja bastante puro, o imunossoro obtido é sempre constituído por uma mistura de anticorpos dirigidos contra os diferentes epítomos (locais determinantes). Eles são tanto mais numerosos quanto mais complexo for o antígeno. São uma mistura complexa de anticorpos distintos, produzidos por clones individuais de linfócitos B que se diferenciarão em plasmócitos.

Anticorpos monoclonais – São anticorpos produzidos em laboratório com elevada especificidade para um determinado antígeno. Em 1975, Kohler e Milstein, realizaram trabalhos através dos quais conseguiram obter um clone celular produzindo um só anticorpo com especificidade bem definida, chamado por isso anticorpo monoclonal. Estes anticorpos são de pureza bastante elevada e mais sensíveis às condições de ligação do que os anticorpos policlonais, são soluções produzidas a partir de um único determinante antigénico (epítomo).

As células de mieloma dividem-se indeterminadamente. O mieloma é uma disfunção na resposta imunitária que se caracteriza pela proliferação anormal de plasmócitos que produzem anticorpos defeituosos sem nenhuma atividade na defesa do organismo. Estas células são utilizadas na produção de culturas de células animais, precisamente devido à sua capacidade de divisão infinita.

Hibridomas são células híbridas resultantes da fusão de linfócitos B com células de mieloma. Cada hibridoma tem a capacidade de produzir um único tipo de anticorpo – monoclonal, e é imortal em cultura.

3.3.3 Método Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase

No complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC): são usados três imunorreagentes: o anticorpo primário, o anticorpo secundário que é produzido ligado a uma molécula da vitamina biotina e o complexo de glicoproteínas (Avidina covalentemente ligada à biotina conjugada à peroxidase, utilizado para a localização de constituintes celulares) (figura 2).

3.3.4 Reações não específicas

O anticorpo primário ou secundário pode se unir aos elementos teciduais altamente carregados como os existentes no tecido conjuntivo, o que resulta em uma reação positiva não específica. Para evitar reações inespecíficas estes cortes podem ser “imersos” antes do início da técnica com proteínas de soro não imunológico da mesma espécie animal que o anticorpo secundário foi produzido. Este preenchimento reduz grandemente as reações não específicas.

Um segundo tipo de reação não específica é chamada atividade da peroxidase endógena (EPA). Muitos tecidos contêm peroxidase, uma enzima que pode reagir com o substrato cromógeno. A EPA é geralmente localizada em áreas que contêm um grande número de células sanguíneas. A EPA pode ser inibida irreversivelmente por um tratamento prévio do tecido com 3% de peróxido de hidrogênio em solução de metanol por quinze minutos (Mills, 1992).

3.3.5 Reações cruzadas

Não é possível isolar todos os peptídeos reguladores (antígenos) de todas as espécies, analisá-los, obter os anticorpos e testá-los. Deste modo, a reação cruzada apresenta a vantagem de que anticorpos anti-peptídeos reguladores de mamíferos podem ser utilizados para localização de peptídeos reguladores em vertebrados inferiores assim como em invertebrados (Van Noorden & Falkmer, 1980; Falkmer & Van Noorden, 1983; Van Noorden, 1984). Portanto, a reação cruzada se constitui num valioso instrumento nos estudos comparativos, dos quais resultou a teoria atual de que os peptídeos reguladores são tão antigos filogeneticamente quanto às primeiras formas de vida animal (Roth *et al.*, 1982).

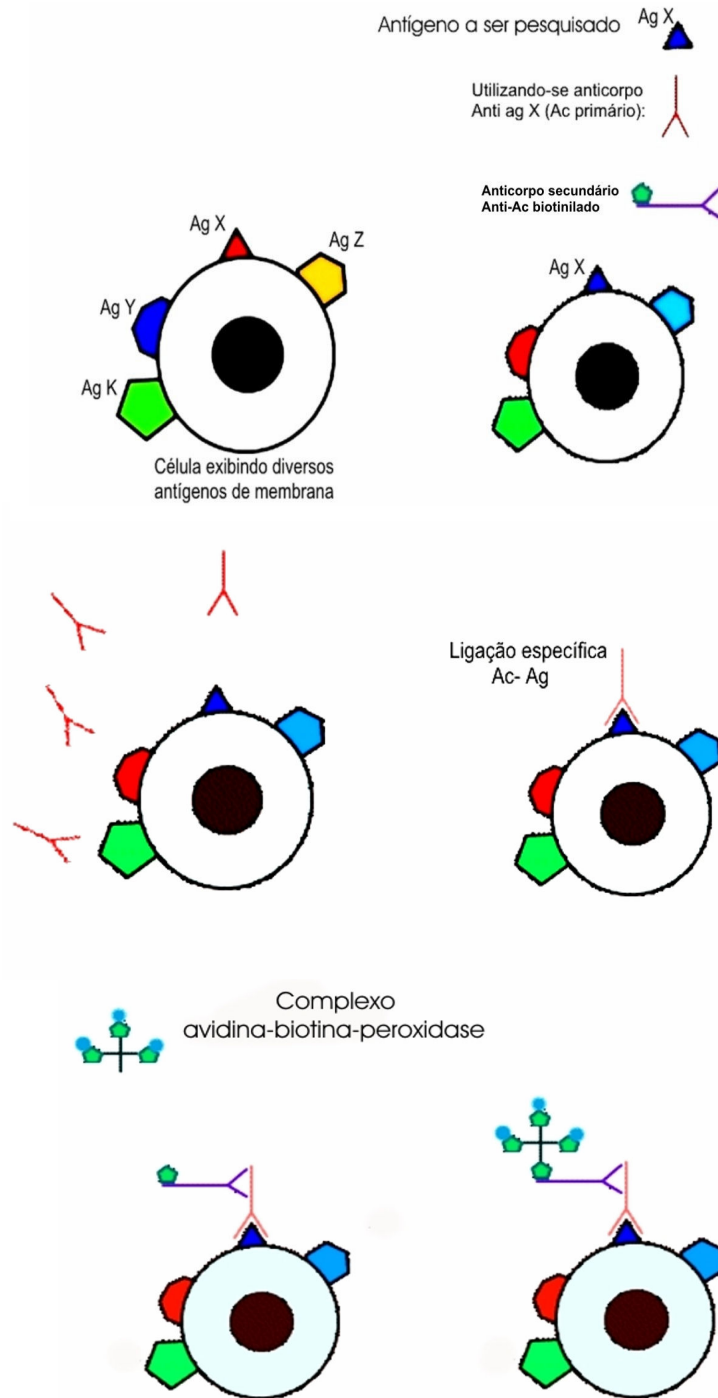


Figura 2 - Representação esquemática das etapas do método imunoenzimático ABC- **Complexo avidina-biotina-enzima** (Hsu *et al.*, 1981). O complexo é formado pela ligação de uma molécula de (strept) avidina com várias de biotina associadas a uma enzima (peroxidase), que tem como função a conversão de um **cromógeno** incolor em um produto final que pode conferir cor aos antígenos teciduais marcados.

3.4 Os Peptídeos Reguladores e Aminas Biogênicas Investigadas

3.4.1 Serotonina – 5HT

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT – figura 3) é um mensageiro químico derivado do triptofano, sendo sintetizado dentro do citosol e armazenado em grânulos secretores pelas células enterocromafins (EC) (Santos & Zucoloto, 1996; Rodrigues, 2005). A serotonina também pode estar presente no sistema nervoso central e nos neurônios serotoninérgicos do gânglio mioentérico intestinal que podem mediar reflexos locais (Li *et al.*, 2000). Racke *et al.* (1996) verificaram que a secreção de serotonina pelas células enterocromafins ocorre, predominantemente, do lado intersticial, sendo controlada por um complexo mecanismo neuroendócrino, mediado por receptores. Estas células constituem uma ampla população de células no tubo gastrointestinal, produzem mais de 90% da serotonina sintetizada no corpo (Ahlman & Nilsson, 2001) e ainda têm a capacidade de reduzir sais de prata – argentafinidade, e sais de cromo – cromafinidade.

Adicionalmente, a serotonina é secretada em resposta a uma ampla variedade de estímulos no lume duodenal, incluindo acidificação, instilação de glicose hipertônica ou solução de sacarose, estimulação vagal, aumento da pressão intraluminal, obstrução mecânica do intestino e isquemia intestinal (Li *et al.*, 2000). As células EC são consideradas os sensores primários da glicose no lume intestinal, sendo que a liberação de serotonina, em resposta à glicose, ativa receptores sobre terminais nervosos aferentes para evocar alterações reflexas na motilidade e esvaziamento gástricos (Raybould *et al.*, 2003).

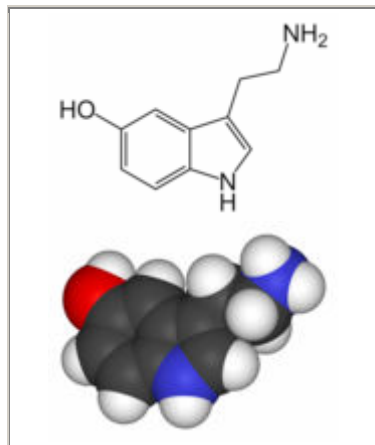


Figura 3: Representação esquemática da molécula de 5 – HT (<http://en.wikipedia.org/wiki/Serotonin>).

Controle e função da Serotonina

A serotonina é conhecida por estimular a contração da musculatura lisa do aparelho gastroentérico e provocar a secreção exócrina (Ceccarelli *et al.*, 1995), além de estimular os neurônios mioentéricos promovendo respostas vasodilatadoras na submucosa (Vanner, 2000). De acordo com Tuo & Isenberg (2003), a serotonina é um potente ativador da secreção de bicarbonato pela mucosa duodenal em camundongos, via um caminho neural colinérgico. A serotonina também está envolvida no mecanismo de êmese: drogas citotóxicas evocam a liberação de 5-HT das células EC na mucosa intestinal, estimulando nervos aferentes vagais adjacentes

que alcançam o centro do vômito no tronco encefálico e, conseqüentemente, induzindo o reflexo do vômito (Minami *et al.*, 2003).

A 5-HT 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. É desta forma que a serotonina regula o humor, o sono, a atividade sexual, o apetite, o ritmo circadiano, as funções neuroendócrinas e autonômicas, a temperatura corporal, a sensibilidade à dor, a atividade motora e as funções cognitivas. Resnick *et al.* (1962) foi o primeiro a demonstrar seu papel inibitório na produção de ácido clorídrico em humanos. A serotonina também age aumentando a motilidade intestinal (Junqueira & Carneiro, 2008).

3.4.2 Gastrina

A gastrina é o maior regulador fisiológico da secreção de ácido gástrico e também possui importante papel na promoção do crescimento da mucosa gástrica. A gastrina é sintetizada pelas células G que estão localizadas principalmente no antro pilórico e duodeno, entretanto, também foi descrita no soro e no lúmen gástrico (Sankey *et al.*, 1990; Odum *et al.*, 1994; Rantala *et al.*, 1996).

A gastrina e a CCK são peptídeos altamente similares. A gastrina é um peptídeo linear sintetizado a partir de um pré-hormônio, que sofre uma clivagem proteolítica fazendo parte da família dos peptídeos que possuem uma carboxila terminal idêntica. A forma circulante predominante é a gastrina-34 (“grande gastrina”), mas a completa atividade biológica está presente em um peptídeo menor - a gastrina-14 ou minigastrina (figura 4). O receptor para gastrina conhecido como CCKb é um membro da família dos receptores acoplados a proteína G. A ligação da proteína G com a gastrina estimula o aumento de cálcio intracelular, ativando a proteína quinase C e produzindo o inositol tri-fosfato (Bundgaard *et al.*, 2004).

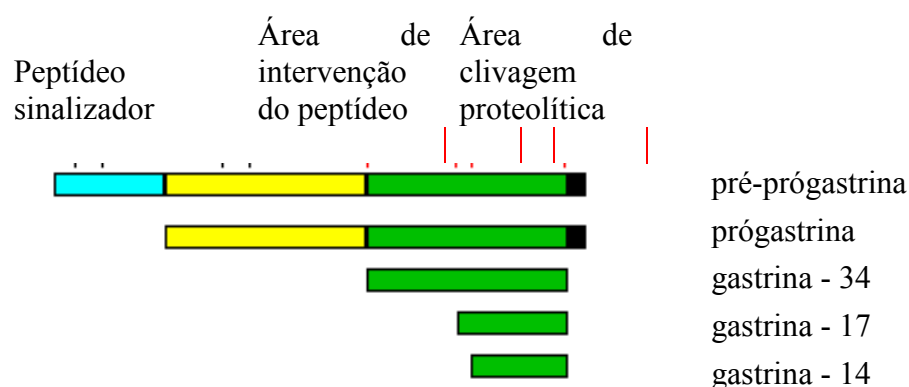


Figura 4: Representação esquemática da formação da gastrina (<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/gi/gastrin.html>).

Controle e efeitos fisiológicos da gastrina

As principais funções da gastrina são: estimular a secreção de ácido gástrico pelas células parietais, aumentar a circulação sanguínea, estimular o crescimento da mucosa gástrica e intestinal, a secreção de pepsinogênio, a motilidade gástrica, a contração muscular da junção esôfago-estômago, a secreção de água e eletrólitos

pelo estômago, pâncreas, fígado e intestino delgado e a secreção de insulina (Ganong, 1998; Polak *et al.*, 1993), além de inibir o esvaziamento gástrico (Smith *et al.*, 1988). A liberação da gastrina é estimulada pela presença de peptídeos e aminoácidos no antro pilórico, pelo estiramento físico do estômago, assim como pela ação do nervo vago (Twedt, 1987; Polak *et al.*, 1993). A secreção da gastrina é inibida por baixo valor de pH (acidez gástrica, $\pm 3,0$) e pelos peptídeos gastrointestinais GIP, CCK, somatostatina, secretina e VIP (Smith *et al.*, 1988). A somatostatina, além de inibir diretamente a secreção de gastrina pelas células G, também inibe a inervação vagal, responsável pela estimulação das células G e inibição das células D produtoras de somatostatina (Swenson & Reece, 1996). Os receptores que medeiam as respostas da gastrina causadas por alterações no conteúdo gástrico se localizam, provavelmente, nas microvilosidades que a célula G apresenta em seu pólo apical, em contato com a luz estomacal (Ganong, 1998). Além da gastrina, outros mensageiros químicos estimulam diretamente a secreção das glândulas gástricas, como a acetilcolina e a histamina. A acetilcolina estimula a secreção de todos os tipos celulares secretores nas glândulas gástricas, incluindo a secreção de pepsinogênio pelas células pépticas, de ácido clorídrico pelas células parietais e de muco pelas células mucosas (Swenson & Reece, 1996). Já a histamina, secretada pelas células semelhantes às enterocromafins do estômago, estimula acentuadamente a secreção de ácido pelas células parietais, porém exerce pouco efeito na estimulação das outras células (Guyton & Hall, 1996).

3.4.3 Colecistoquinina – CCK

A colecistocinina (CCK) é secretada pelas células I presentes especialmente no duodeno e no jejuno, atua, principalmente, por mecanismo telócrino (endócrino) (Polak *et al.*, 1993) e é liberada após uma refeição. A CCK é também produzida por neurônios do sistema nervoso entérico (SNE), sendo um neurotransmissor largamente distribuído no cérebro (Moran & Schwartz, 1994).

Como mencionado previamente, a CCK e a gastrina são peptídeos altamente similares. Como a gastrina, a CCK é um peptídeo linear sintetizado a partir de um pré-hormônio. A completa atividade biológica da CCK está retida no CCK-8 (oito aminoácidos), mas peptídeos com 33, 38 e 59 aminoácidos também são produzidos. Dois receptores de ligação para CCK já foram identificados. O receptor para CCKa é encontrado abundantemente nas células acinares pancreáticas. O receptor para CCKb, que também funciona como receptor de gastrina, é a forma predominante do cérebro e do estômago (Santos, C. M., 2007).

Controle e efeitos fisiológicos da CCK

Sabe-se que a CCK estimula a contração da vesícula biliar, a secreção pancreática de amilase, a atividade motora intestinal, a secreção de pepsina gástrica e a secreção das glândulas de Brunner, além de inibir a secreção ácida das células parietais, a atividade motora e o esvaziamento gástrico (o esvaziamento é retardado pela presença de produtos da ingestão de gordura no duodeno e jejuno e pela presença de aminoácidos e peptídeos no duodeno), a contração do esfíncter inferior esofágico, a contração do esfíncter de Oddi e a absorção de fluidos e eletrólitos no jejuno e no íleo (Granner, 1988; Polak *et al.*, 1993). A colecistocinina também inibe a ingestão de alimentos, atuando por mecanismo neurócrino no centro da fome e da saciedade no SNC. A liberação de CCK pelas células I é estimulada pela presença de nutrientes no duodeno, como peptídeos, gorduras e carboidratos. A CCK é o

principal estímulo para a liberação das enzimas pancreáticas (tripsina, amilase e lipase) e da bile na luz duodenal (Berne & Levy, 2000). As enzimas pancreáticas, por sua vez, inibem a liberação da CCK pelas células I, exercendo um “feedback” negativo, completando, assim, o ciclo de ação desse hormônio (Swenson & Reece, 1996).

3.5 Sistemática do mandi-amarelo:

Reino: Animalia
Filo: Chordata
Classe: Actinopterygii
Ordem: Siluriformes
Família: Pimelodidae
Gênero: Pimelodus (La Cepède, 1803)
Espécie: *Pimelodus maculatus*



Figura 5 – Retirada do site: <http://www.postimage.org/image.php?v=aVUem1A>.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado com 18 exemplares de mandi-amarelo coletados do reservatório da Usina Hidrelétrica de Funil do sistema de Furnas Centrais Elétricas (12 amostras) e do reservatório de Santa Branca (6 amostras) como mostra a quadro 1. As coletas no reservatório de Santa Branca foram realizadas durante o final da minha graduação para um trabalho de iniciação científica. Como é um reservatório com qualidade de água boa, quando comparado ao reservatório de Funil, os peixes deste local serviram como controle.

O reservatório de Funil (Figura 6) fica no trecho fluminense da bacia do rio Paraíba do Sul, entre as regiões de Resende e Itatiaia no Estado do Rio de Janeiro. Funil tem grande importância porque está localizada próxima aos grandes centros da região Sudeste, onde estão instaladas grandes indústrias. Este reservatório é afetado com as crescentes alterações ambientais, pois é um sistema inserido na Bacia do Rio Paraíba do Sul, que recebe elevada carga poluente do Vale Paulista do Paraíba.



Figura 6 – Foto tirada do Reservatório de Funil (22°31'46.56" S 44°34'07.43" O) pelo programa Google Earth. Altitude do ponto de visão 2.46 Km.

O reservatório de Santa Branca (Figura 7) fica no trecho superior do rio Paraíba do sul, onde o uso da terra e a inexistência de grandes cidades ao longo do rio resultaram em “melhor qualidade ambiente”, quando comparado com o reservatório de Funil.



Figura 7 – Foto tirada do Reservatório de Santa Branca (23°22'31.21" S 45°52'14.65" O) pelo programa Google Earth. Altitude do ponto de visão 3.48 Km.

Quadro 1: Quantidade de peixes utilizados no trabalho, com seus respectivos locais de coleta

Número de espécimes			Local de coleta
Machos	Fêmeas	Total	
2	10	12	Reservatório de Funil
4	2	6	Reservatório de Santa Branca

4.1 Preparação dos cortes histológicos.

Após a coleta, os peixes foram eutanaziados por hipotermia e dissecados em campo, com imediata remoção do trato digestório. Fragmentos do estômago das regiões fúndica (f) e pilórica (p) e intestino, foram fixados por 6 à 8 horas em líquido de Bouin (Di Fiori, 1975). Decorridas as 6/8 horas de fixação, o material foi colocado no álcool 70° GL. Os fragmentos foram transportados para o laboratório de Histologia e Embriologia da UFRRJ. O álcool foi trocado diariamente até clareamento do material para posterior processamento. Foram feitas seções transversais e longitudinais dos fragmentos. O processamento consistiu na desidratação do material em concentrações crescentes de etanol (70° GL, 80° GL, 90° GL, 96° GL, 100° GL I, 100° GL II); xilol-álcool; diafanização em xilol; impregnação e inclusão em parafina, segundo procedimentos de rotina (Humason, 1972). Em seguida o material foi emblocado em parafina para realização dos cortes.

Na microtomia foram realizadas seções de cortes dos diferentes órgãos coletados. Cortes de 5 µm de espessura foram colocados em lâminas previamente tratadas com poly-L-lysine (Tabela 2), para promover a maior adesão do corte a lâmina. Seções representativas de cada tecido foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), para o exame da arquitetura normal do TGI pela microscopia de luz.

4.2 Antissoros e reagentes

Os detalhes dos três tipos de antissoros e reagentes utilizados neste trabalho estão listados na quadro 2. Todos os anticorpos foram produzidos em coelho.

Quadro 2 - Detalhes dos Anticorpos e principais reagentes utilizados. Todos os anticorpos foram produzidos em coelho

ANTICORPOS E REAGENTES	CÓDIGO	DILUIÇÃO	ORIGEM
Anti-Serotonina, 5-HT	S 5545	1: 8.000	Sigma-Aldrich,inc.
Anti-Gastrina	G 0785	1: 1.000	Sigma-Aldrich,inc
Anti-Colecistoquinina CCK-8	C 2581	1: 8.000	Sigma-Aldrich,inc
ABC Kit	PK 6200	-	VECTOR
DAB	H-2200	5/ 110mL	VECTOR
Poly-L-Lysina	P-8920	10/ 90mL	Sigma-Aldrich,inc

4.3. Etapas do procedimento Imuno-histoquímico

Para o estudo imuno-histoquímico foram seguidas as seguintes etapas de procedimentos do método ABC:

- 1-Desparafinização e hidratação até o TPS 0,01M pH-7,4 (Tampão Fosfato Sorensen);
- 2- Tripsinização dos cortes com tripsina 0,1% por 15 minutos;
- 3- Três lavagens em TPS, por 5 minutos cada;
- 4- Tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,3% em metanol para bloqueio da peroxidase endógena, durante 15 minutos;
- 5- Três lavagens em tampão TPS por 5 minutos cada;
- 6- Incubação com soro normal de cabra durante 30 minutos, com a finalidade de neutralizar antígenos inespecíficos presentes no tecido;

- 7- Incubação com Antissoro primário (1ª camada) contendo anticorpos específicos anti o peptídeo regulador que se deseja investigar (Tabela 2) em câmara úmida, a 4°C durante uma noite (overnight) ou durante duas horas, resultando na formação do complexo antígeno-anticorpo;
- 8- Três lavagens em tampão TPS por 10 minutos cada;
- 9- Incubação com anticorpo secundário biotilado em câmara úmida por 30 minutos a temperatura ambiente;
- 10- Três lavagens em tampão TPS por 10 minutos cada;
- 11- Adição do complexo Avidina-Biotina-Peroxidase em câmara úmida durante 30 minutos a temperatura ambiente;
- 12- Duas lavagens em tampão TPS por 5 minutos cada;
- 13- Incubar o material com uma solução de diaminobenzidina tetrahydroclorídrico (DAB) que atua como cromógeno promovendo a revelação da imunoreação (Anticorpo primário + Anticorpo secundário biotilado + complexo ABC-peroxidase), que será visualizada pela cor marrom;
- 14- Lavagem em tampão TPS por 10 minutos e em seguida com água destilada;
- 15- Desidratação, clarificação e montagem.

4.4 Observações e Fotomicrografias

Todas as lâminas foram observadas e fotomicrografias foram feitas com microscópio Olympus Dx, objetiva 40X e câmera digital Nikon Colpix 4300 nas dimensões: 2272 X 1704.

4.5 Contagem de células e análise estatística

As fotomicrografias foram analisadas e a frequência relativa das células endócrinas imunorreativas (IR) aferidas, através de um analisador de imagem computadorizado (Image-Pro Plus software) com o cálculo da média + SD (desvio padrão) por unidade de área (0,25 mm²) da mucosa. Quatro grupos baseados na média de células IR foram criados, sendo considerado: (+) para 1 a 5 células/0,25 mm²; (++) para 5 a 15 células; (+++) para 15 a 30 células IR; (++++) para mais de 30 células IR/0,25 mm² (Tabela 1).

5 RESULTADOS

Durante a coleta em campo, foi possível detectar a presença de parasitos nas vísceras dos peixes dissecados. Na análise microscópica não foram encontradas alterações morfológicas dos órgãos coletados.

A técnica de imuno-histoquímica foi aplicada ao estômago e intestino. Os antissoros utilizados foram para colecistoquinina (CCK-8), gastrina e serotonina (5-HT).

Para avaliação estatística dos resultados foi utilizado o seguinte teste não paramétrico: Mann Whitney U Test ($P < 0,05$) (Zar, 1999). Este tipo de teste foi escolhido porque os dados das amostras não atenderam os requisitos necessários para a realização de um teste paramétrico. A distribuição e frequência das células endócrinas podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1: Distribuição e frequência relativa das células endócrinas gastrintestinais de *P. maculatus* do reservatório de Funil (A) e do reservatório de Santa Branca (B)

(A) Peixes do reservatório de Funil

Região	CCK	Gastrina	5-HT
Estômago (f)	++/++	+++/>+++	+++/>+++
Estômago (p)	+++/>+++	++/++	+++/>+++
Intestino	+++/>+++	+++/>+++	+++/>+++

(B) Peixes do reservatório de Santa Branca

Região	CCK	Gastrina	5-HT
Estômago (f)	++/++	+++/>+++	++/++
Estômago (p)	+++/>+++	++/++	++/++
Intestino	++/++	++++/>++++	++/++

5.1 Células imunorreativas ao anticorpo anti-CCK-8

No estômago as células imunorreativas (IR) para CCK foram observadas na porção mais basal do epitélio gástrico (cilíndrico simples muco-secretor). Sua forma variou do tipo piriforme à ovalada (Figura 8). Ao comparar a região fúndica com a região pilórica, foi possível observar que a região pilórica (Figura 9) apresentou maior quantidade de células imunorreativas ao anticorpo anti-CCK-8. Já no intestino estas células variaram da porção mais basal do epitélio intestinal (epitélio cilíndrico simples com planura estriada e células caliciformes) até a mais apical, conforme ia se distanciando do estômago, sendo o tipo aberto o mais freqüente (Figura 10).

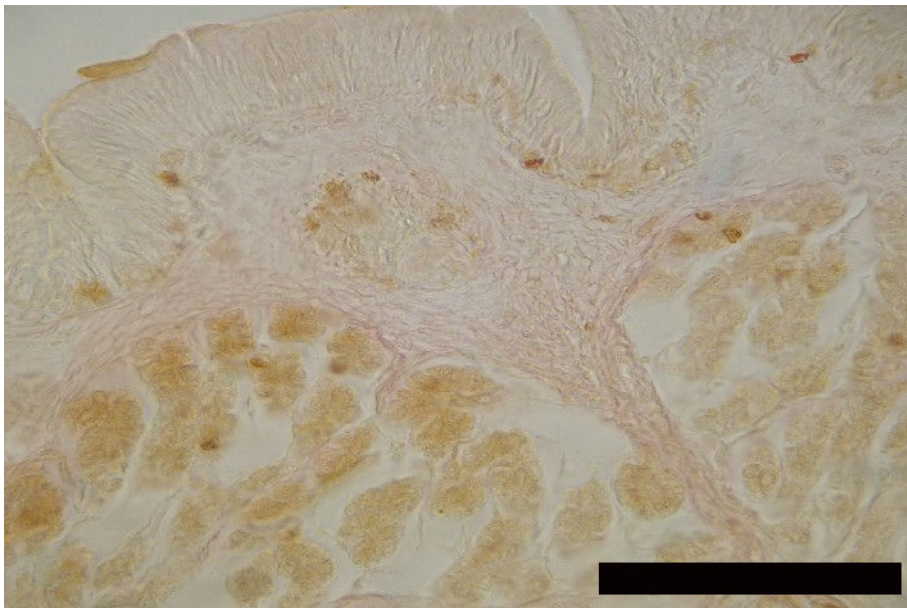


Figura 8. Fotomicrografias de células IR a CCK no estômago, região fúndica. Células com formato oval, situadas no epitélio de revestimento, observadas também nas glândulas fúndicas. Escala = 50 μ m.

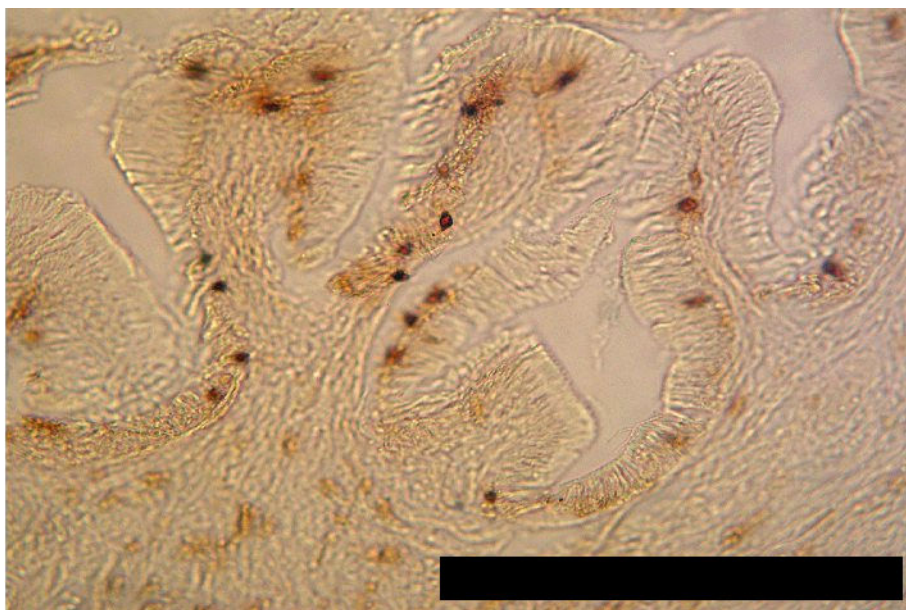


Figura 9. Fotomicrografias de células IR a CCK no estômago, região pilórica. Escala = 50 μm .

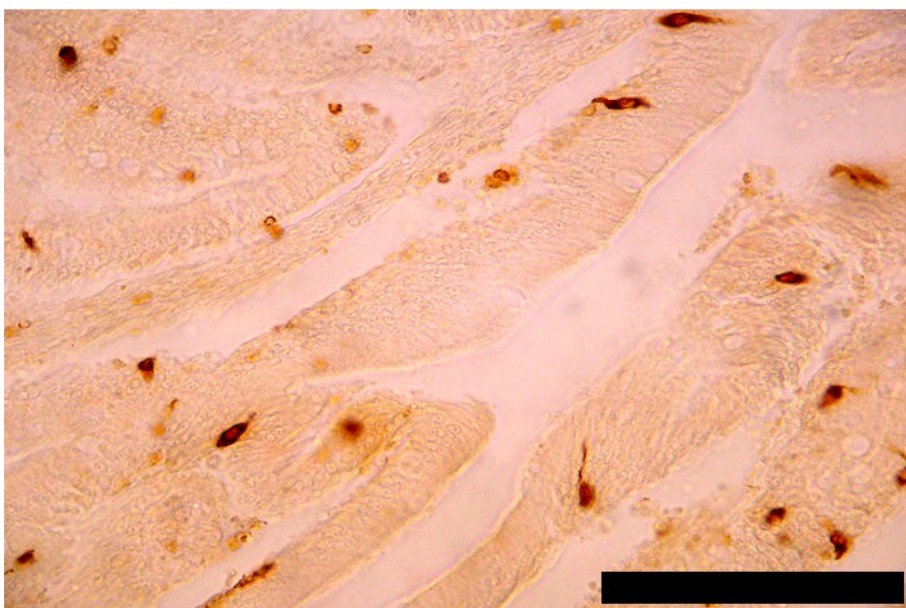
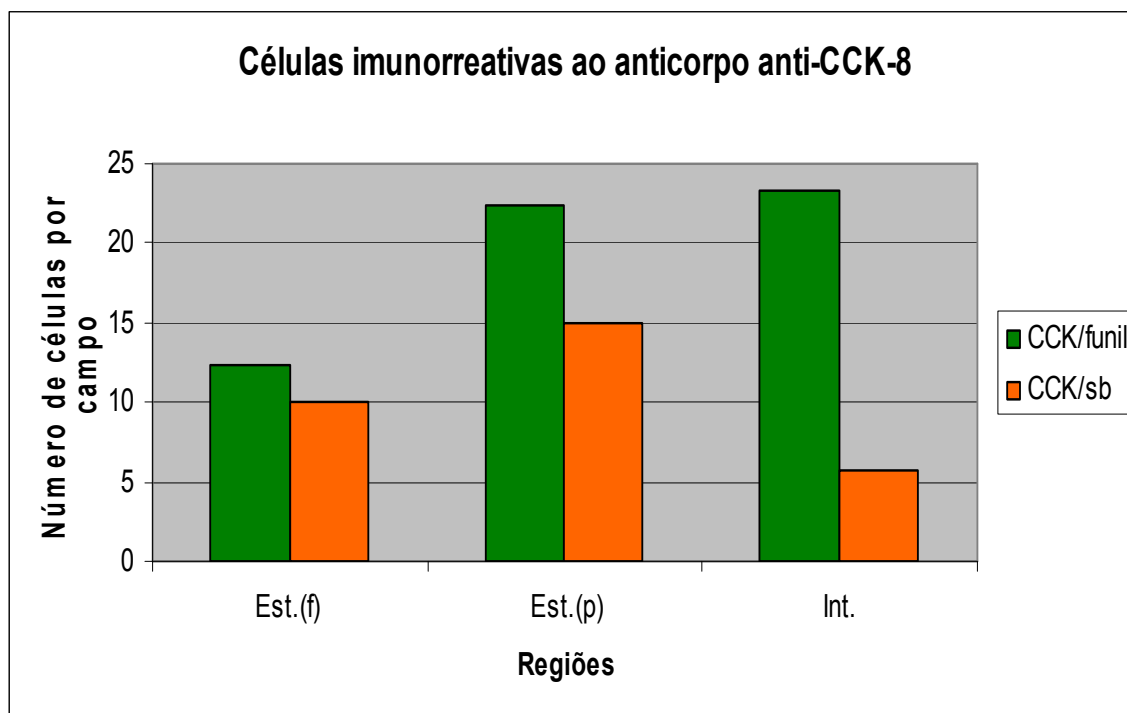


Figura 10. Fotomicrografias de células IR a CCK no intestino. Notar células dispersas entre o epitélio, sendo do tipo aberto o mais freqüente. Escala = 50 μm .

De acordo com o teste estatístico utilizado houve diferença significativa na quantidade de células imunorreativas para o anticorpo anti-CCK-8 no intestino, quando comparado os dois ambientes, sendo uma maior a quantidade destas células encontradas nos peixes do reservatório de Funil (Gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição e frequência relativa das células secretoras de CCK no tubo gastrintestinal de *P. maculatus*



5.2 Células imunorreativas ao anticorpo anti-gastrina

As células IR à gastrina foram abundantes e fortemente marcadas tanto no estômago quanto no intestino. Sua frequência relativa foi maior no intestino, seguido do estômago região fúndica e posteriormente região pilórica (Gráfico 2). Sua distribuição foi regular entre os componentes epiteliais, com algumas marcações nas glândulas fúndicas. Estas células IR à gastrina se apresentaram de forma variada: triangular, piriforme e ovalada (Figura 11). A maioria deste grupo de células foi considerada do tipo fechado.

Segundo o teste estatístico utilizado houve uma maior quantidade deste grupo de células na região fúndica do estômago, quando comparado com a região pilórica (Figura 12) em ambos os reservatórios. Os peixes do reservatório de Santa Branca apresentaram maior quantidade de células imunorreativas para gastrina no intestino (Figura 13).

Gráfico 2: Distribuição e frequência relativa das células secretoras de gastrina no tubo gastrintestinal de *P. maculatus*

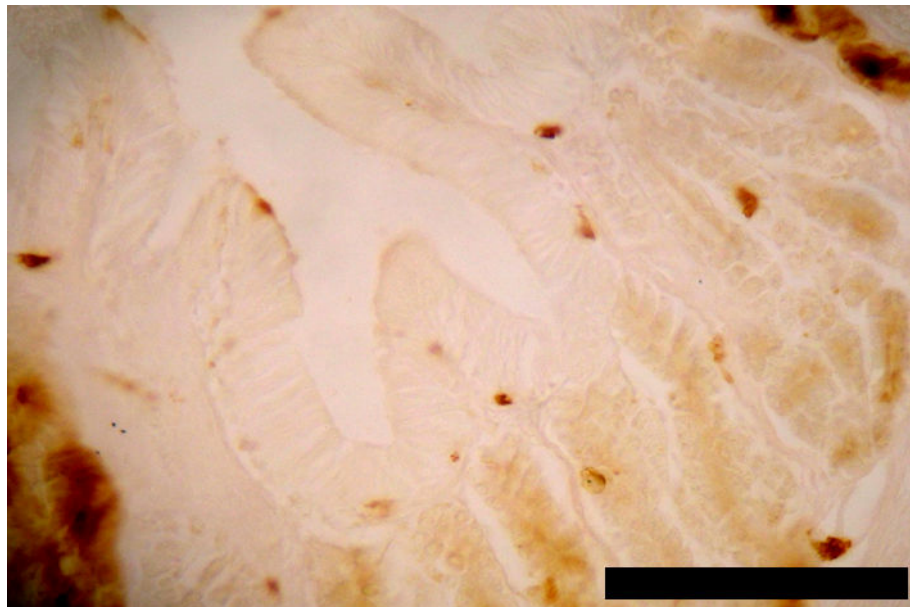
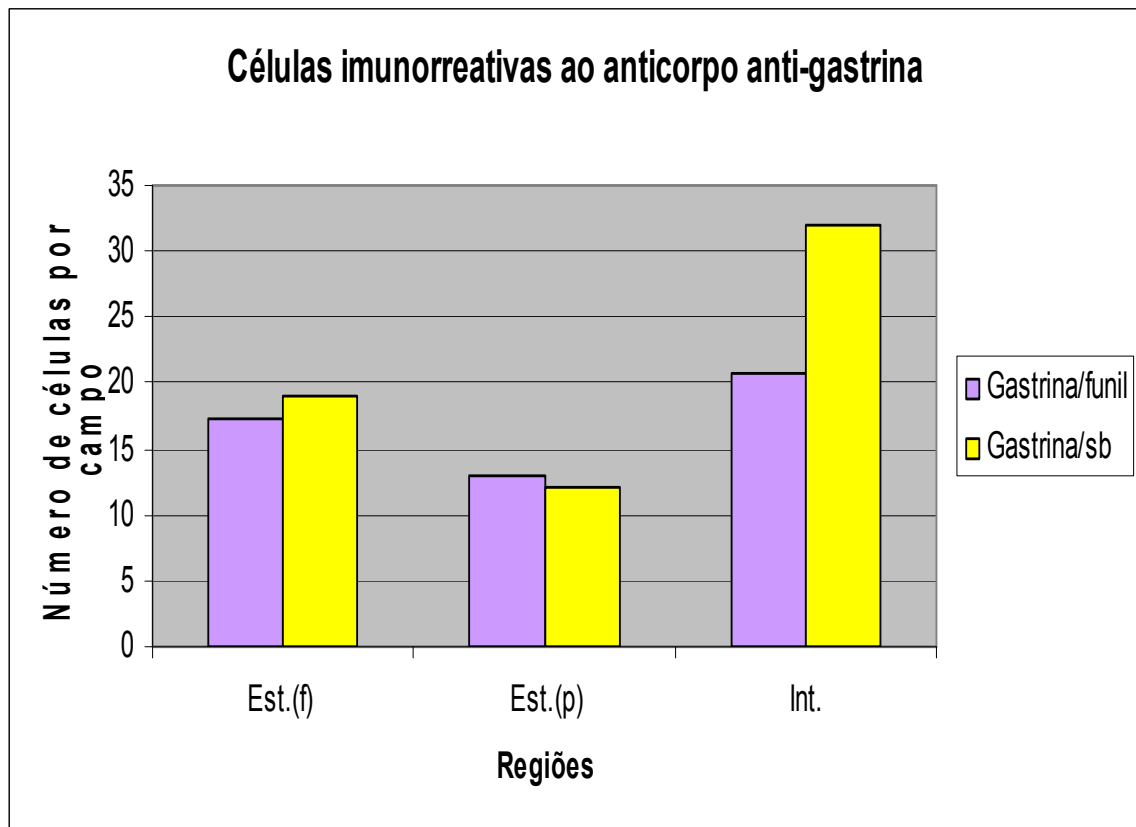


Figura 11. Fotomicrografias de células IR a gastrina no estômago, região fúndica. Células com formato variado, no epitélio de revestimento, com marcações também nas glândulas fúndicas. Escala = 50 µm.

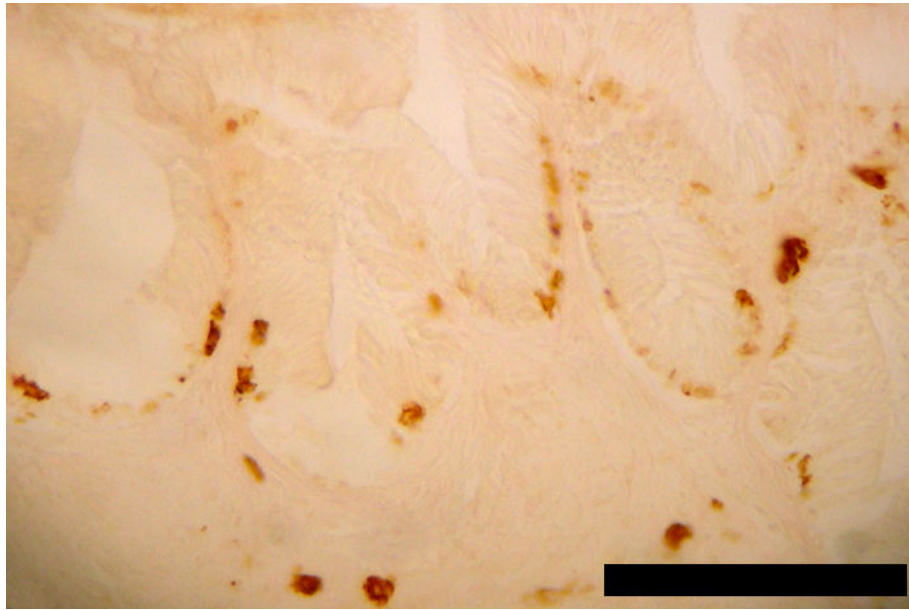


Figura 12. Fotomicrografias de células IR a gastrina no estômago, região pilórica. Escala = 50 μm .

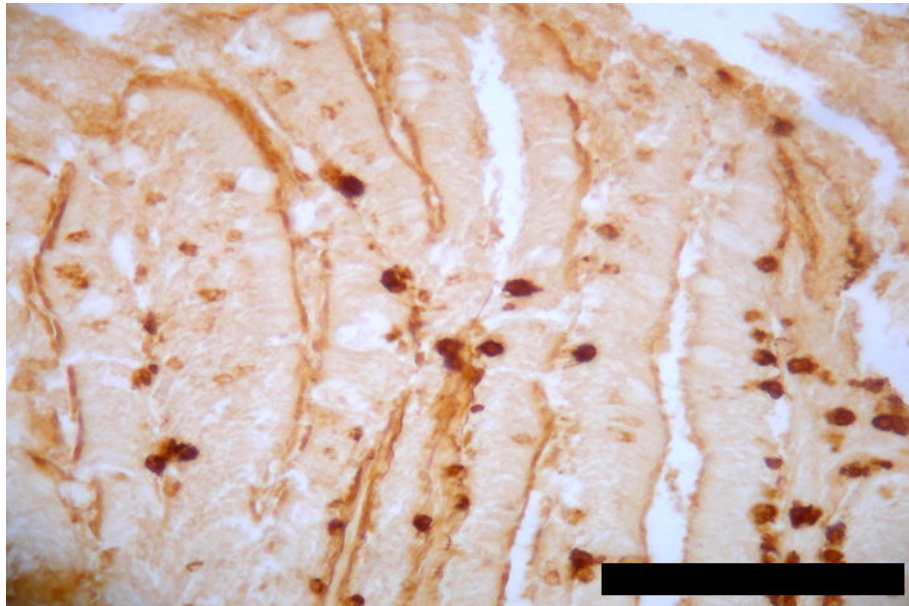


Figura 13. Fotomicrografias de células IR a gastrina no intestino. Notar a quantidade de células presente no epitélio, sendo do tipo fechado o mais freqüente. Escala = 50 μm .

As células IR para gastrina em relação às células IR para CCK e 5-HT foram o tipo celular predominante tanto no estômago (região fúndica) quanto no intestino.

5.3 Células imunorreativas ao anticorpo anti-5-HT

Estas células imunorreativas foram observadas em grande quantidade também na porção basal do epitélio gástrico, porém houve raras marcações nas glândulas gástricas (Figuras 14 e 15). Sua forma variou de piriforme a triangular, com presença de um processo citoplasmático em sua porção apical (Figura 16). No intestino estas células apresentaram-se ao longo de todo o órgão aparecendo inclusive os seus prolongamentos bem definidos e visíveis, estabelecendo contato com o lúmen (Figuras 17 e 18). Por este motivo elas são classificadas como sendo do tipo aberto.

De acordo com o teste de Mann Whitney a quantidade de células imunorreativas para 5-HT foi maior na região pilórica e no intestino dos peixes do reservatório de Funil (Gráfico 3).

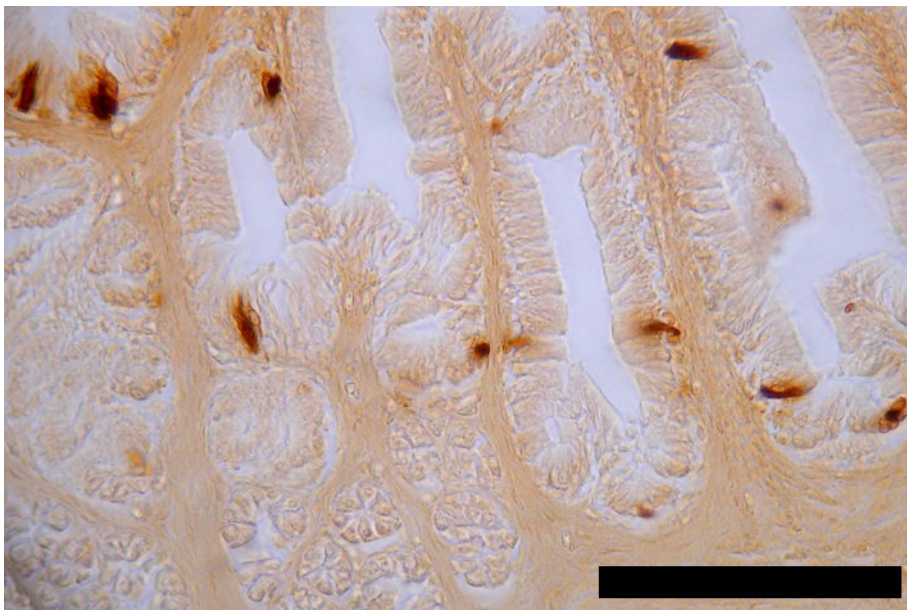


Figura 14. Fotomicrografias de células IR a 5-HT no estômago, região fúndica. Células com formato variando de piriforme a triangular, no epitélio de revestimento. Escala = 50 μ m.

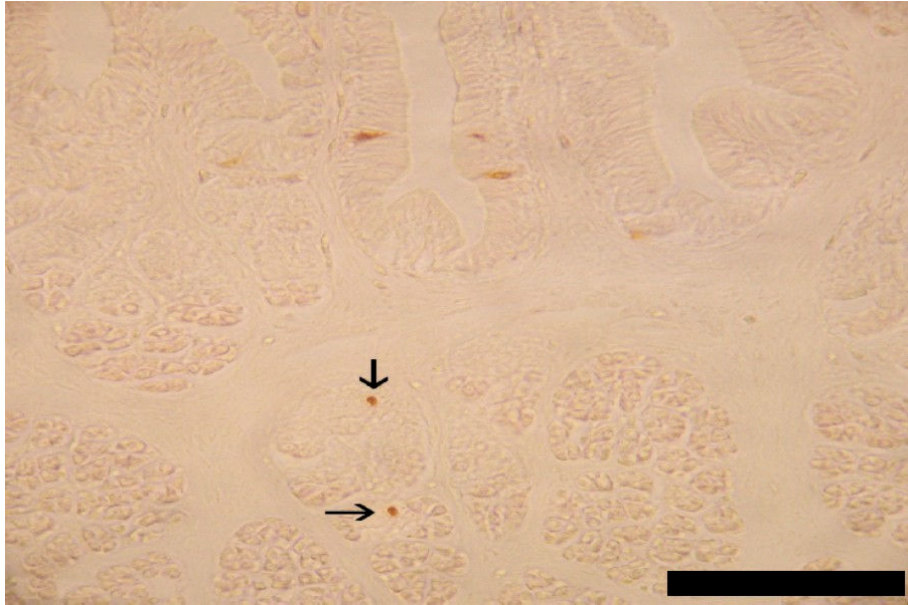


Figura 15. Fotomicrografias de células IR a 5-HT no estômago, região fúndica. Células no epitélio de revestimento, com marcações também nas glândulas fúndicas. Escala = 50 μ m.

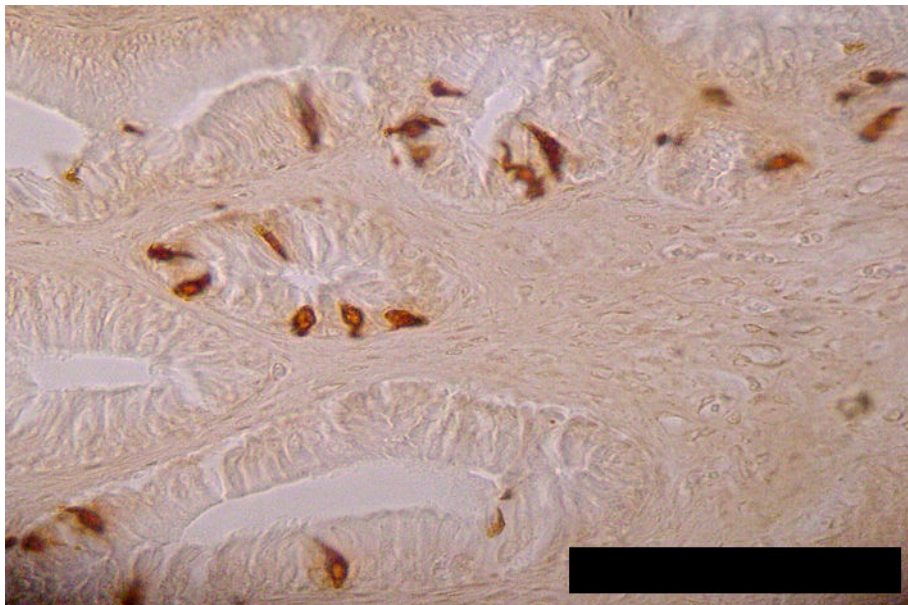


Figura 16. Fotomicrografias de células IR a 5-HT no estômago, região pilórica. Células com formato que variaram de piriforme a triangular, no epitélio de revestimento. Escala = 50 μ m.

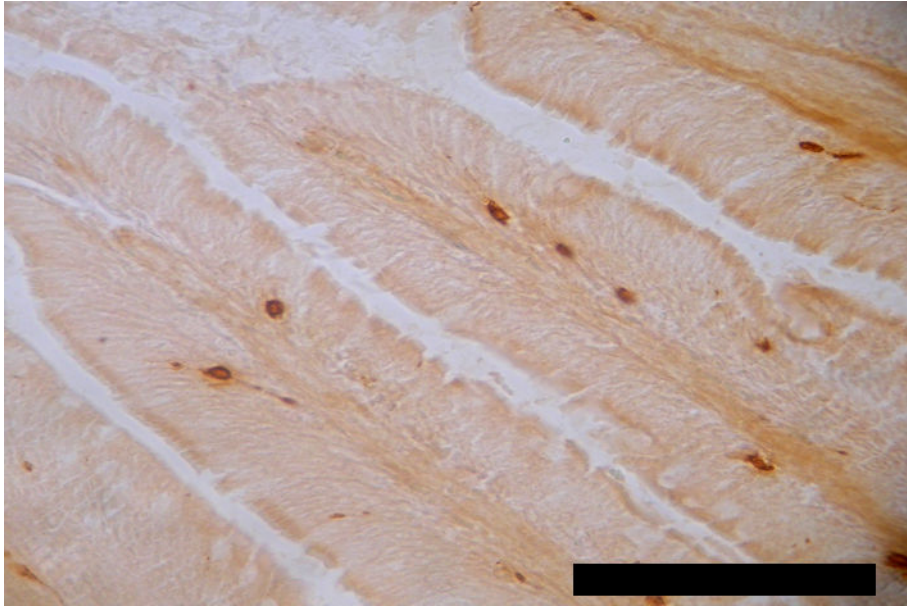


Figura 17. Fotomicrografias de células IR a 5-HT no intestino. Células aparecendo ao longo de todo o epitélio intestinal. Escala = 50 μ m.

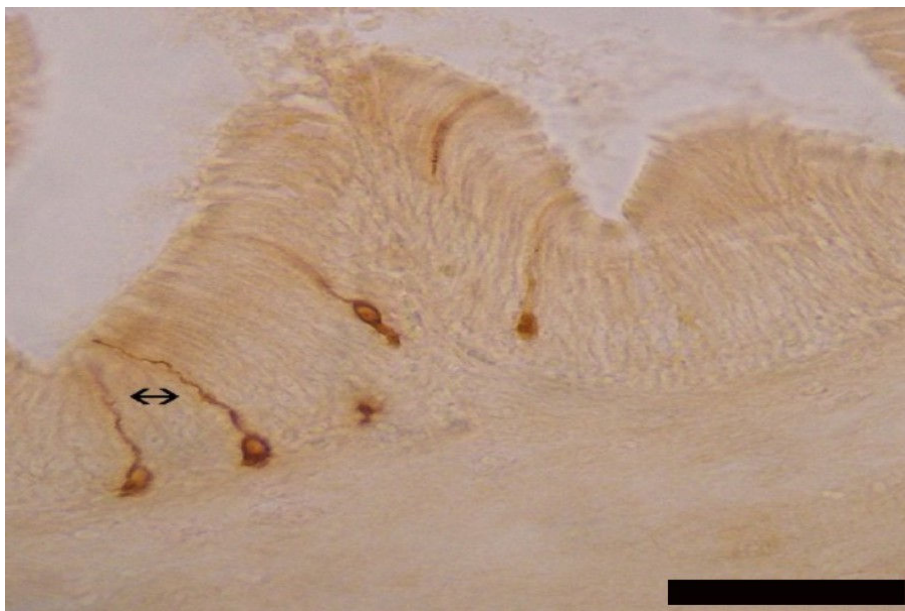
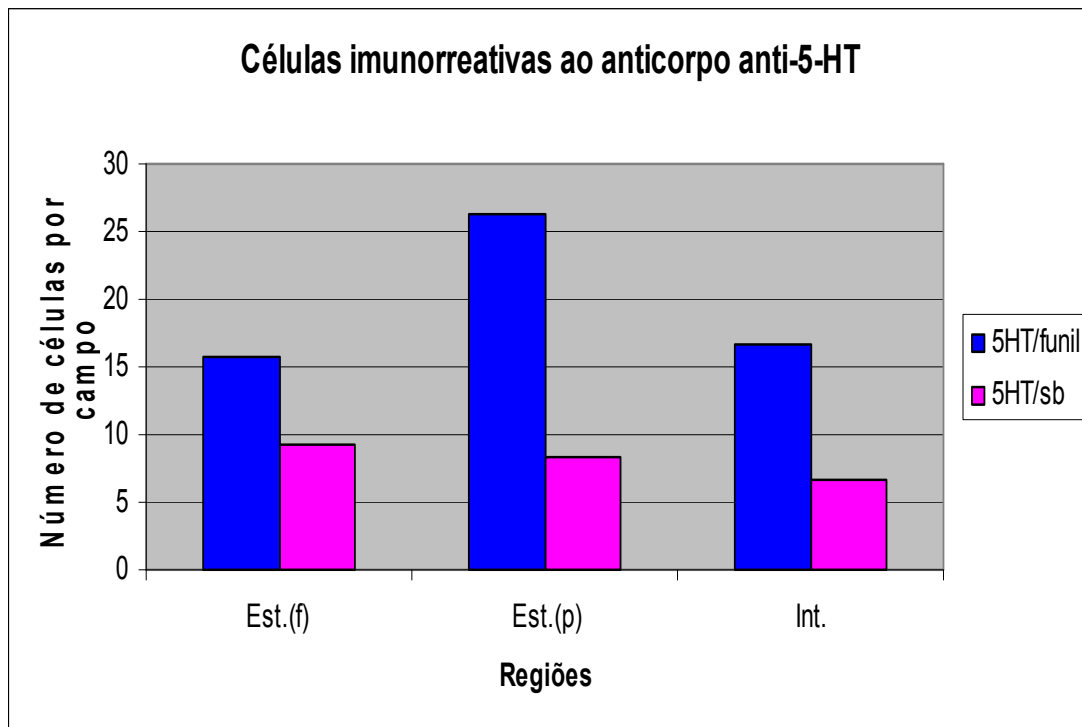


Figura 18. Fotomicrografias de células IR a 5-HT no intestino. Notar prolongamentos bem definidos e visíveis (seta).

Gráfico 3: Distribuição e frequência relativa das células secretoras de 5-HT no tubo gastrintestinal de *P. maculatus*



6 DISCUSSÃO

A presença de células imunorreativas ao anticorpo anti-CCK-8 foi relatada em répteis (Lee & Ku, 2004), em peixes (Pan *et al.*, 2000), em aves (Rawdon & Andrew, 1981) e em mamíferos (Ku *et al.*, 2004a), tendo sido encontrada desde o estômago região do fundo até ao íleo.

Em *P. maculatus*, as células IR a CCK foram relatadas nas três regiões estudadas, aparecendo em maior quantidade na região pilórica do estômago, seguido do intestino e região fúndica. Estas células foram observadas não só no epitélio como também nas glândulas fúndicas. Estes resultados diferem de Hernández, M. P. G. *et al.*, 1994 e de Bosi G. *et al.*, 2004, os quais não encontraram marcação deste tipo celular no estômago de peixes.

As células IR à gastrina foram detectadas no esôfago de teleósteo (Pan *et al.*, 2000), no duodeno/ jejuno de répteis (Ku *et al.*, 2001), nos mamíferos (Kitamura *et al.*, 1984, Ku *et al.*, 2004a) e no intestino grosso do suíno *Babyrousa babyrousa* (Agungpriyono *et al.*, 2000); entretanto, sua maior frequência na maioria das espécies estudadas foi na região pilórica.

Em *P. maculatus* essas células IR foram muito numerosas no intestino e no estômago região fúndica e menos numerosas na região pilórica. Também apresentaram marcação nas glândulas fúndicas e foi o tipo celular predominante em relação às células imunorreativas a CCK e 5HT.

As células imunorreativas à serotonina foram identificadas ao longo de todo o tubo digestivo de diversas classes como peixes (Ku *et al.*, 2004b), anfíbios (D'este *et al.*, 1994), répteis (Huang & Wu, 2005), aves (Yamanaka *et al.*, 1989) e mamíferos (Cardoso *et al.*, 1994, Agungpriyono *et al.*, 2000), sendo considerada a célula endócrina mais amplamente distribuída do TGI de vertebrados. Estudos prévios indicam que estas células surgiram cedo na evolução dos vertebrados (Solcia *et al.*, 1975, El-Salhy *et al.*, 1985).

Em *P. maculatus* as células imunorreativas ao anticorpo anti-5HT foram mais abundantes na região pilórica dos peixes do reservatório de Funil, apesar de terem sido identificadas também na região fúndica e no intestino. Ocorreram poucas marcações nas glândulas fúndicas.

Ao se comparar os dois ambientes não foi verificada diferença significativa na quantidade de células imunorreativas para nenhum dos antissoros na região fúndica do estômago.

Na região pilórica a quantidade de células imunorreativas para 5HT foi maior nos peixes do reservatório de Funil. Para os outros tipos celulares não houve diferença significativa.

No intestino houve diferença significativa para todos os antissoros utilizados. A quantidade de células imorreativas para 5HT e CCK foi maior nos peixes do reservatório de Funil, enquanto as células imorreativas para gastrina apareceram em maior quantidade nos peixes do Reservatório de Santa Branca.

7 CONCLUSÕES

- A marcação foi positiva para os três anticorpos (anti-CCK-8, anti-gastrina e anti-5HT) utilizados, em todos os tecidos estudados: estômago (região fúndica e pilórica) e intestino, nos dois ambientes.
- As células imunorreativas ao anticorpo anti-CCK-8 foram mais abundantes no intestino dos peixes do reservatório de Funil
- As células imunorreativas ao anticorpo anti-gastrina foram as mais abundantes dentre as três estudadas nos peixes de ambos os reservatórios.
- As células imunorreativas ao anticorpo anti-5HT foram mais abundantes na região pilórica do estômago nos peixes do reservatório de Funil.
- As células imunorreativas aos anticorpos: anti-CCK, anti-gastrina e anti-5HT foram identificadas nos epitélios e nas glândulas fúndicas.
- Houve diferenças na distribuição e na frequência relativa das células endócrinas do tubo gastrintestinal dos peixes dos dois reservatórios.
- Todas estas observações imuno-histoquímicas são somente sobre o aspecto morfológico, contudo elas abrem as portas para um estudo fisiológico ou morfo-fisiológico mais complexo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUNGPRIYONO, S., MACDONALD, A. A., LEUS, K. Y. G., KITAMURA, N., ADNYANE, I. K. M., GOODALL, G. P., HONDO, E. & YAMADA, J. Immunohistochemical Study on the Distribution of Endocrine Cells in the Gastrointestinal Tract of the Babirusa, *Babyrousa babyrussa* (Suidae) **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C**, v. 29, n. 3, p. 173–178, 2000.
- AHLMAN, H., NILSSON, O. The gut as the largest endocrine organ in the body. **Annals of Oncology** 12, 63-8, 2001.
- BAYLISS, W. M. & STARLING, E. H. The mechanism of pancreatic secretion. **The Journal of Physiology**, v. 28, p. 325-53, 1902.
- BELL, F. R. The relevance of the new knowledge os gastrointestinal hormones to veterinary science. **Veterinary Science Communications**, v. 2, p. 305-314, 1979.
- BERNE, R. M. & LEVY, M. N. **Fisiologia**. Guanabara koogan. Rio de Janeiro. RJ, 4 edição, 1034p., 2000.
- BOSI, G., GIANCAMILLO, A. D., ARRIGHI, S. & DOMENEGHINI, C. An immunohistochemical study on the neuroendocrine system in the alimentary canal of the brown trout, *Salmo trutta*, L., 1758. **General and Comparative Endocrinology**, 138: 166-181, 2004.
- BUNDGAARD, J. R., BIRKEDAL, H. & REHFELD, J. F. Progastrin is directed to the regulated secretory pathway by synergistically actin basic and acidic motifs. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 5488-5493, 2004.
- CARDOSO, T. R. D., PINHEIRO, N. L., & SALES, A. Imunocitoquímica para detecção de células endócrinas produtoras de gastrina e serotonina na mucosa gástrica do tatu (MAMMALIA: EDENTATA). **Revista Universidade Rural, Serie Ciências da Vida**, v. 16, p. 85-89, 1994.
- CARVALHEIRA, A. F., WELSCH, H. & PEARSE, A. G. E. Cytochemical and ultrastructural observations on the argentaffin and argyrophil cells of the gastrointestinal tract in mammals, and their place in the APUD series of polypeptide-secreting cells. **Histochemistry**, v. 14, p. 33-46, 1968.
- CECCARELLI, P.; PEDINI, V.; GARGIULO, M. Serotonincontaining cells in the horse gastrointestinal tract. **Anatomia, Histologia, Embryologia** v. 24, p. 97-99, 1995.
- D'ESTE, L., BUFFA, R., PELAGI, M., SICCARDI, A. G. & RENDA, T. Immunohistochemical localization of chromogranin A and B in the endocrine cells of the alimentary tract of the green frog, *Rana esculenta*. **Cell and Tissue Research**, v. 277, p. 341-349, 1994.
- DEVENEY, C. W. & WAY, L. W. Regulatory peptides of gut. In: **Basic and Clinical Endocrinology** (F. S. Greenspan and P. H. Forsham, eds), *Asian edn. Singapore: Maruzen.*, p. 479- 499, 1983.
- DIAZ, A. O.; GARCÍA, A. M.; DEVINCENTI, C. V. & GOLDEMBERG, A. L. Morphological and histochemical characterization of the mucosa of the digestiva tract in *Engraulis anchoita*. *Anatomie and Histologia and Embryologia: Journal of Veterinary Medicine. Série C. Berlin* 32: 341-346, 2003.
- DI FIORI, M. S. H. **Diagnostico Histologico**. Tomo I. 7 ed. Argentina, Buenos Aires; Libreria “El Ateneo”. Editorial, 591p., 1975.
- DUARTE, S. Estudo do sistema digestório de duas espécies de peixes Siluriformes (*Hypostomus auroguttatus* e *Pimelodus maculatus*) no reservatório da UHE de Funil, RJ. 2007. 200f. **Tese** (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em

- Biologia Animal) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- EL – SALHY M., WINDER, E., LUNDQVIST, M. Comparative studies of serotonin-like immunoreactive cells in the digestive tract of vertebrates. **Biomedical Research**, v. 6, p. 371-375, 1985.
- FALKMER, S. & VAN NOORDEN, S. Ontogeny and phylogeny of the glucagon cell. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 66, p. 81-199, 1983.
- FUJITA, T.; KOBAYASHI, S. Structure and Function of Gut Endocrine Cells. **International Review of Cytology Suppl.**6, p. 187-233, 1977.
- GANONG, W. F. **Fisiologia Médica**. 17. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 578 p., 1998.
- GARTNER, L. P. & HIATT, J. L. **Tratado de Histologia**. Ed. Guanabara Koogan, 425p., 1999.
- GRANNER, D. K. Gastrointestinal hormones. **In: Haper's Biochemistry**. Editores R. K. Murray; D.K. Granner; P. A. Mayes e V. W. Rodwell; 21st edition, p. 564-569, 1988.
- GROSSMAN, M. I. Physiological effects of gastrointestinal hormones. **Federation proceedings**, v. 36, p. 1930-32, 1977.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1014 p., 1996.
- HARDER, W. The digestive tract. **Anatomy of Fishes**. Stuttgart, 128-187, 1975.
- HASSAN, G.; SHAFI, M. Diffuse endocrinology the (APUDsystem) anatomical, histological and clinical perspectives. **JKPractitioner**. v. 9, n. 4, p. 260-261, Oct-Dec. 2002.
- HERNÁNDEZ, M. P. G., LOZANO, M. T. & AGULLEIRO, B. Ontogeny of some endocrine cells of the digestive tract in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): An immunocytochemical study. **Cell & Tissue Research**, 277: 373-383, 1994.
- HSU, S. M., RAINE, L. & FANGER, H. Use of Avidin-Bioin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between abc and unlabeled antibody (PAP) procedures. **The Journal of Histochemical and Cytochemical**, v. 29, p. 577-80, 1981.
- HUANG, X. & WU, X. Immunohistochemical study on gastrointestinal endocrine cells of four reptiles. **World Journal Gastroenterology**, v. 11, n.35, p. 5498-5505, 2005.
- HUMASON, G.L. **Animal tissue techniques**. 3a ed. São Francisco, W.H. Freeman and Company. 641 pp., 1972.
- JUNQUEIRA, L. C & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 11ª edição, 524 p., 2008.
- KAPOOR, B.G.; SMITH, H & VERIGHINA. I. A. The alimentary canal and digestion in teleosts. **Advance in Marine Biology**. Austin. 63: 301-308, 1975.
- KHANNA, S. S. & MEHROTRA. I. F. Morphology and histology of teleostean intestine. **Anatomischer Anzeiger**. Lubeck. 129: 1-18, 1971.
- KITAMURA, N., YAMADA, J., CALINGASAN, Y. N., YAMASHITA, T. immunohistochemical study of the endocrine cells in the gastro-intestinal tract of the horse. **Equine veterinary Journal**, v. 16, p. 103-107, 1984.
- KÖHLER, G. & MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, 495-497, 1975.
- KU, S. K., LEE, H. S., LEE, J. H. & PARK, K. D. An immunohistochemical study of the endocrine cells in the alimentary tract of Red-Eared Slider (*Trachemys*

- scripta elegans*). **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C**, v. 30, p. 33-39, 2001.
- KU, S. K., LEE, H. S. & LEE, J. H. Immunohistochemical study of gastrointestinal Endocrine Cells in the BALB/c mouse. **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C**, v. 33, p. 42-48, 2004a.
- KU SK, LEE JH, LEE HS. Immunohistochemical study on the endocrine cells in gut of the stomachless Teleost, Zacco platypus (Cyprinidae) **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C**, v.33(4), p.212-9, 2004b.
- LEE, H. S & KU, S. K. An immunohistochemical study of endocrine cells in the alimentary tract of the grass lizard, *Takydromus wolteri* Fischer (Laceridae). **Acta Histochemica**, v. 106, p. 171- 178, 2004.
- LI, Y. *et al.* Serotonin released from intestinal enterochromaffin cells mediates luminal non-cholecystokinin-stimulated pancreatic secretion in rats. **Gastroenterology**. v. 118, p. 1197-1207, 2000.
- LÓLIS, A. A. & ANDRIAN, I. F. Alimentação de *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Pimelodidae) na planície de inundação do Alto Rio Paraná, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**. São Paulo. 23(1):23-28, 1996.
- MENIN. E & MIMURA, O. M. Anatomia funcional comparativa do estômago de três peixes Teleosteos de hábito alimentar onívoro. **Revista Ceres**. São Paulo. 39 (223): 233-260, 1992.
- MILLS, B. **Immunohistochemistry**. In: Prophet, E.D. *et al.* (eds.) Laboratory methods in histotechnology. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p. 247-55, 1992.
- MINAMI, M. *et al.* Pharmacological aspects of anticancer druginduced emesis with emphasis on serotonin release and vagal nerve activity. **Pharmacology and Therapeutics** v. 99, n. 2, p. 149-65, 2003.
- MONTUEGA, L. M. *et al.* The diffuse endocrine system: from embryogenesis to carcinogenesis. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry** v. 38, n. 2, p. 155-272, 2003.
- MORAN, T. H. & SCHWARTZ, G. I. Neurobiology of cholecystokinin. **Critical reviews in neurobiology**, v. 9, p. 1- 28, 1994.
- MUTOH, H. *et al.* Review article: transcriptional events controlling the terminal differentiation of intestinal endocrine cells. **Alimentary Pharmacology and therapeutics**. v. 14, suppl. 1, p. 170-175, Apr. 2000.
- ODUM, L., PETERSEN, H. D., ANDERSEN, I. B., HANSEN, B. F. & REHFELD, J. F. Gastrin and somatostatin in helicobacter pylori infected antral mucosa. **Gut**, v. 35, p. 615- 618, 1994.
- PAN, Q. S., FANG, Z. P. & HUANG, F. J. Identification, localization and morphology of APUD cells in gastroenteropancreatic system of stomach-containing teleosts. **World Journal Gastroenterology**, v. 6, p. 842-847, 2000.
- PEARSE, A. G. E. Common cytochemical and ultrastructural characteristics of cells producing polipeptide hormones (the APUD series) and their relevance to thyroid and ultimobranchial C and calcitonin. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B**, v. 170, p. 71-80, 1968.
- PEARSE, A. G. E. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone producing cells (the APUD series) and the embryology, physiology and pathologic implications of the concept. **The Journal of Histochemical and Cytochemical**, v. 17, p. 303-13, 1969.
- POLAK, J. M. & BLOOM, S. R. Distribution of newly discovered regulatory peptides. **Biomedical Research**, v. 4, p. 7-23, 1983.

- POLAK, J. M. *et al.* Hormônios gastrointestinais. In : DANI, R. ; CASTRO, L. P. **Gastroenterologia clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, p. 1107-2015, 1993.
- PUZYREV, A. A.; IVANOVA, V. F.; KOSTIUKEVICH, S. V. Regularities of cytogenesis in the enocrine gastroenteropancreatic system in vertebrates. **Morfologiia**. v. 124, n. 4, p. 11-19, 2003.
- RACKE, K. *et al.* Regulation of 5-HT release from enterochromaffin cells. **Behavioural Brain Research** v. 73, n. 1-2, p. 83-87, 1996.
- RANTALA, I., PARONEN, I., KAINULAINEN, H. & ALA- KAILA, K. Enterocromaffin cell density in the gastric mucosa of patients with chronic renal failure. **Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica**, v. 104, p. 362-366, 1996.
- RAWDON, B. B. & ANDREW, A. An immunocytochemical survey of endocrine cells in the gastrointestinal tract of chicks at hatching. **Cell Tissue Research**, v. 220, p. 279-292, 1981.
- RAYBOULD, H. E. *et al.* Expression of 5-HT₃ receptors by extrinsic duodenal afferents contribute to inhibition of gastric emptying. **American journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology** v. 284, n. 3, p. G367-72, mar. 2003.
- REID, P.E, VOLZ, D., CHO, K. Y. & OWEN, D. A. A new method for the histochemical demonstration of O-acyl sugars in human colonic epithelial Glycoproteins. **Histochemical Journal** 20: 510-518, 1988.
- RESNICK, R. H., ADELARDI, C. F. & GRAY, S. J. Stimulation of gastric secretion in may by serotonin antagonist. **Gastroenterology**, v. 42, p. 22-25, 1962.
- REY, L. **Dicionário de termos técnicos de medicina e saúde**. Guanabara Koogan, 1999.
- RINDI, G. *et al.* Targeted ablation of secretin-producing cells in transgenic mice reveals a common differentiation pathway with multiple enteroendocrine cell lineages in the small intestine. **Development Cambridge**, v. 126, n. 18, p. 4149-4156, Sept. 1999.
- RINDI, G. *et al.* The “normal” endocrine cell of the gut changing concepts and new evidences. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 1014, p. 1-12, 2004.
- RODRIGUES, S. S. Aspectos anátomo-histológicos e neuroendócrinos do intestino delgado da capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766 (Mammalia, Rodentia, Hydrochaeridae). 2005. 94f. **Dissertação** (Mestrado em Morfofisiologia de Animais Domésticos e Silvestres, Setor de Morfologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- ROTH, J., LE ROITH, D., SHILOAC, J., ROSENWEIG, J. L., LESNIAK, M. A. & HAVRANKOVA, J. The evolutionary origins of hormones, neurotransmitters and other extracellular chemical messengers. Implications for mammalian biology. **The New England journal of medicine**, v. 306, p. 150-152, 1982.
- ROTTA, M. A. Aspectos Gerais da Fisiologia e Estrutura do Sistema Digestivo dos Peixes Relacionados à Piscicultura. **Embrapa Pantanal, Documentos 53**, Corumbá-MS, ISSN 1517-1973, Dezembro, 2003.
- SANKEY, E. A., HELLIWELL, P. A. & DHILLON, A. P. Immunostaining of antral gastrin cells is quantitatively increased in helicobacter pylori gastritis. **Histopathology**, v. 16, p. 151-155, 1990.
- SANTOS, CLARICE M.; DUARTE, SILVANA; SOUZA, TATIANA G. L.; RIBEIRO, THATIANA P.; SALES, ARMANDO; ARAÚJO, FRANCISCO G. Histologia e caracterização histoquímica do tubo gastrintestinal de *Pimelodus*

- maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) no reservatório de Funil, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia**, Sér. Zool., vol.97, no.4, p.411-417. ISSN 0073-4721, Dec. 2007.
- SANTOS, C. M. Estudo Imuno-histoquímico das células endócrinas do tubo gastrointestinal de morcegos (Mammalia, Chiroptera). 2007. 48p. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, 2007.
- SANTOS, G. C.; ZUCOLOTO, S. Células endócrinas gastrointestinais: breve histórico e principais métodos de identificação à microscopia óptica. **Arquivos de Gastroenterologia** v. 33, n. 1, p. 36-43, 1996.
- SCHONHOFF, S. E.; GIEL-MOLONEY, M.; LEITER, A. B. Minireview: Development and Differentiation of Gut Endocrine Cells. **Endocrinology** v. 145, n. 6, p. 2639-2644, 2004.
- SMITH, E. L. *et al.* **Bioquímica de mamíferos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 620 p., 1988.
- SMITH, L. S. Digestive functions in teleosts fishes **In: Fish nutrition**. J. E. Halver (Ed.), Academic press, San Diego, 331-421p., 1989.
- SOLCIA, E., CAPELLA, C., VASSALLO, G. & BUFFA, R. Endocrine cells of the gastric mucosa. **International review of cytology**, v. 42, p. 223-286, 1975.
- SPREAFICO, J. M., DIAZ FLORES, L., GAYOSO, M. J., VARELA, J. & AGUIAR, D. Celulas endócrinas del tubo digestivo. **Morfologic Patology**, v. 1, p. 99-124, 1977.
- SWENSON, M. J.; REECE, W. O. Dukes. **Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 856 p., 1996.
- TIBBETS I. R. The distribution and function of mucous cells and their secretions in the alimentary tract of *Arrhamphus sclerolepis krefftii*. **Journal of Fish Biology**. Drumfreis. 50: 809-820, 1997.
- TUO, B. G.; ISENBERG, J. I. Effect of 5-hydroxytryptamine on duodenal mucosal bicarbonate secretion in mice. **Gastroenterology**, v. 125, n. 3, p. 805-814, Sep. 2003.
- TWEDT, D. C. Gastrointestinal peptide hormones. In: DRAZNER, F. H. **Small animal endocrinology**. New York: Churchill Livingstone, 508 p., 1987.
- VAN NOORDEN, S. & FALKMER, S. Gut islet endocrinology some evolutionary aspects. **Investigative & cell pathology**, v. 3, p. 21-35, 1980.
- VAN NOORDEN, S. The neuroendocrine system in protostomian and deuterostomian invertebrates and lower vertebrates. In: **Evolution and tumour pathology of the neuroendocrine system**. Eds. S. Falkmer, R. Hakanson, F. Sundler. New York, Elsevier. Pp. 7-38, 1984.
- VANNER, S. Myenteric neurons activate submucosal vasodilator neurons in guinea pig ileum. **American journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology** v. 279, p. 380-387, 2000.
- 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**. v. 5, p. 654-655, 1997.
- YAMANAKA, Y., YAMADA, J., KITAMURA, N. & YAMASHITA, T. An immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the chicken gastrointestinal tract. **Zeitschrift fur Mikroskopisch Anatomische Forschung**, v. 103, p. 3, 437-446, 1989.

- YANAIHARA, N., YANAIHARA, C., MOCHIZUKI, T., HOSHITO, M., ZHANG, T. & IGUCHI, K. New gastrointestinal hormones. **Progress in endocrinology**, 1545-1550, 1988.
- YANG, Q. *et al.* Requirement of Math 1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. **Science Washington D C.** v. 294, n. 5549, p. 2155-2158, Dec. 2001.
- ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4th. Ed. Prentice Hall, New Jersey, 663 p. 1999.
- ZHANG, C. & LI, D. G. 5-HT and the regulation of gastrointestinal tract motility. **Zhonghua xin xue guan bing za zhi** v. 5, p. 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**, v. 7, p. 687-688, 1999.

REFERÊNCIAS ONLINE:

- http://pwp.netcabo.pt/sistema.imune/Biotecnologia_no_diagnostico_terapeutica.htm
http://pwp.netcabo.pt/sistema.imune/miolo_programa.htm