

GLÁUCIA MARQUES FREITAS RIBEIRO

**ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DE
COMPONENTES NEUROENDÓCRINOS DO INTESTINO
DELGADO DO GAMBÁ *Didelphis aurita* (WIED-
NEUWIED, 1826)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

GLÁUCIA MARQUES FREITAS RIBEIRO

**ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DE COMPONENTES
NEUROENDÓCRINOS DO INTESTINO DELGADO DO GAMBÁ *Didelphis
aurita* (WIED-NEWIED, 1826)**

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

APROVADA: 21 de maio de 2009.

Prof. Clóvis Andrade Neves

Prof^a. Isabel Regina dos S. C. Maldonado

Prof. Laércio dos Anjos Benjamin

Prof^a. Larissa Pires Barbosa

Prof. Cláudio César Fonseca
(Orientador)

Dedico este trabalho ao meu filho Nicholas e ao meu esposo Alan.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Cláudio César Fonseca, pela atenção, paciência e companheirismo durante todas as etapas deste trabalho.

Aos Professores Sérgio Luiz Pinto da Matta e Prof. Clóvis Andrade Neves, pelos conselhos e auxílio na orientação.

Aos professores e funcionários do laboratório de Biologia Celular e Estrutural, em especial ao Alex, pelo fornecimento de material histológico e auxílios práticos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do material prático.

Aos professores e funcionários do Museu de Zoologia por emprestar as armadilhas para a captura dos gambás.

Ao IBAMA, pela licença concedida para a coleta de material.

À Sirlene Souza Rodrigues, por ter me ensinado todas as metodologias executadas nesta tese.

À Michelle Carvalho Maia, Giselle Carvalho Maia e Ana Paula de Almeida Caxeiro, que sempre procuraram me ajudar nos momentos difíceis.

Ao meu esposo Alan Loures Ribeiro, por aceitar a minha ausência, pelas análises estatísticas e, nesta etapa final, por cuidar do nosso bebê e pela tranquilidade que me proporcionou ao ser aprovado em concurso público.

Às minhas colegas que me ofereceram o conforto das caronas durante as viagens semanais Ipatinga-Viçosa: Andréa, Tatiana, Nilma, Kellen e Ana Paula.

À minha mãe e a Gleice, pelo incentivo e apoio sentimental.

Índice

Resumo.....	vi
Abstract.....	viii
1.0 - INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Referências Bibliográficas.....	4
2.0 - QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS ARGIRÓFILAS, ARGENTAFINS E IMUNORREATIVAS À INSULINA E DOS GÂNGLIOS NERVOSOS SUBMUCOSOS E MIOENTÉRICOS NO INTESTINO DELGADO DO GAMBÁ <i>Didelphis aurita</i> (WIED-NEUWIED, 1826)	
Resumo.....	8
Abstract.....	9
Introdução.....	10
Material e Métodos.....	13
Resultados.....	16
Discussão.....	21
Referências Bibliográficas.....	27
3.0 - MORFOMETRIA DAS CAMADAS DO INTESTINO DELGADO DE <i>Didelphis aurita</i> WIED-NEUWIED, 1826 (MAMMALIA, DIDELPHIDAE) E SUA RELAÇÃO COM AS CÉLULAS ENDÓCRINAS E GÂNGLIOS NERVOSOS.	

Resumo.....	32
Abstract.....	33
Introdução.....	34
Material e Métodos.....	36
Resultados.....	39
Discussão.....	45
Referências Bibliográficas.....	50
Conclusões Gerais e Perspectivas.....	54
Apêndices	55

Resumo

RIBEIRO, Gláucia Marques Freitas. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2009.
Análise histológica e morfométrica de componentes neuroendócrinos do intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). Orientador: Cláudio César Fonseca. Co-orientadores: Clóvis Andrade Neves e Sérgio Luiz Pinto da Matta.

Objetivou-se analisar os aspectos referentes à histologia e morfometria do intestino delgado de dez gambás pós-púberes e adultos da espécie *Didelphis aurita*. A descrição morfométrica do intestino delgado desta espécie foi realizada enfocando as camadas mucosa, submucosa e muscular. A quantificação das células enteroendócrinas e dos gânglios nervosos mioentéricos e submucosos foi realizada nos diferentes segmentos deste órgão. As técnicas de coloração utilizadas visaram identificar e quantificar células argirófilas (Grimelius), argentafins (Masson-Fontana modificada), e imunorreativas à insulina (imunoperoxidase direta), dos gânglios mioentéricos e submucosos (H-E), além das camadas mucosa, submucosa e muscular (H-E). A população de células enteroendócrinas argirófilas e argentafins foi menor distalmente, com destaque para o maior número de células argirófilas quando comparada às demais. O número destas células não variou entre as regiões iniciais, médias e finais do duodeno, jejuno e íleo ($P > 0,05$), exceto as células argirófilas no jejuno. Em média, foram encontrados cerca de 17,29 gânglios submucosos/mm² na camada submucosa, e 23,77 gânglios mioentéricos/mm² entre as camadas musculares. Nenhuma diferença foi constatada em relação ao número destes gânglios entre os segmentos intestinais ($P > 0,05$). Também, não existiu nenhuma relação entre o número de gânglios nervosos submucosos e mioentéricos e as células endócrinas dos diferentes segmentos do intestino delgado ($P > 0,05$). Foram constatadas diferenças na espessura das camadas intestinais entre o duodeno, jejuno e íleo ($P < 0,05$), embora nenhuma variação tenha ocorrido entre as regiões inicial, média e final de cada segmento ($P > 0,05$). Nenhuma relação foi encontrada entre o número de células enteroendócrinas e a espessura das camadas do intestino delgado de *D. aurita* adultos e pós-púberes ($P > 0,05$) e entre o número de gânglios nervosos submucosos e mioentéricos e a espessura das camadas da parede intestinal ($P > 0,05$). A maioria das células endócrinas não diferiu numericamente ($P > 0,05$) entre animais adultos (Classe 1) e pós-púberes (Classe 2) e, somente a espessura da camada muscular do duodeno e jejuno foi maior nos gambás da classe 2 ($P < 0,05$). Os aspectos histológicos e neuro-endócrinos encontrados no intestino delgado

do gambá *Didelphis aurita* foi similar ao relatado na literatura para os mamíferos placentários.

Abstract

RIBEIRO, Gláucia Marques Freitas. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2009.

Hystological analysis and morphometry of the neuroendocrine componentes of the small intestine of the opossum *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826).

Adviser: Cláudio César Fonseca. Co-advisers: Clóvis Andrade Neves and Sérgio Luiz Pinto da Matta.

The objectives of this work were to aspects of the histology and morphometry of the small intestine of adult and post-puberty big-eared opossum *Didelphis aurita*. The morphometric description of the species's small intestine focused on the mucous, sub-mucous and muscular layers. The entero-endocrinal cells and the cells of the myoenteric nervous and sub-mucous ganglia in the member's several sections were counted. Staining techniques identified and quantified argyrophilic cells (Grimelius), argentafin cells (Masson-Fontana modified) and insulin immuno-reactive cells (direct immunoperoxidase), myoenteric and sub-mucous ganglia (H-E), coupled to the mucous, submucosal and muscle layers (H-E). Amount of entero-endocrinal argyrophilic, argentafin and insulin immuno-reactive cells was distally less, albeit a higher number of argyrophilic cells occurred when compared to that of the others types. The number of these cells did not vary among the initial, middle and distal regions of the duodenum, jejunum and ileum ($P>0.05$), with the exception of the argyrophilic cells in the jejunum. An average of approximately 17.29 sub-mucous ganglia/mm² and 23.77 myoenteric ganglia/mm² of the muscle layer were found. No difference in the number of the above-mentioned ganglia among the intestine segments ($P>0.05$) was reported. There was no relationship between the number of sub-mucous and myoenteric nervous ganglia and endocrine cells of the small intestine's different segments ($P>0.05$). There was difference of intestine layers between the duodenum, jejunum and ileum ($P<0.05$) was reported, with no variations among the initial, middle and distal regions of each segment ($P>0.05$). No relationship existed between the number of entero-endocrinal cells and the layer thickness of the small intestine of adult and post-puberty *D. aurita* ($P>0.05$). There was no relationship between the number of sub-mucous and myoenteric nervous ganglia and the thickness of the small intestine layers ($P>0.05$). Although no difference was registered in most endocrinal cells ($P>0.05$) between adult (Class 1) and post-puberty animals (Class 2), greater thickness in the muscle layer of the duodenum and jejunum was only registered in Class 2 opossums ($P<0.05$). Histological and neuron-endocrinal aspects of the small intestine of opossum *Didelphis aurita* showed great similarity to that in the literature on placenta mammals.

Introdução geral

Marsupiais e mamíferos eutérios divergiram de um ancestral comum há aproximadamente 70 milhões de anos atrás (Kimble, 1997). Estes dois grupos tiveram êxito durante a diversificação dos mamíferos, expandindo-se rapidamente após a decadência dos répteis (MacAlester, 1994). Os marsupiais pertencem à Subclasse Theria, Infraclasse Metatheria e Ordem Marsupialia.

Neste estudo, os gambás foram escolhidos como modelo em função da sua relevância na evolução dos mamíferos, já que representam um elo na transição entre os Prototheria e Eutheria, podendo inclusive ser utilizados em estudos comparativos entre estes dois grupos.

A espécie *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 faz parte da família Didelphidae e encontra-se distribuída do sul do Canadá ao nordeste da Argentina. Aquelas espécies assumidas como *Didelphis marsupialis* no sudeste do Brasil, sudeste do Paraguai e nordeste da Argentina referem-se, na verdade, ao gambá *D. aurita* descrito por Cerqueira em 1985 (Eisenberg & Redford, 1999). Além de *D. aurita*, existem aproximadamente 75 espécies de didelfídeos nas Américas (Kimble, 1997). Este animal, quando adulto, pode medir de 355 a 377 mm de comprimento e pesar de 939 - 1.159g (Eisenberg & Redford, 1999). Algumas peculiaridades morfológicas são encontradas nos gambás, como o sistema genital feminino constituindo-se de dois ovários, dois úteros e vaginas laterais (Monteiro Filho & Cáceres, 2006) e, no macho, a presença de pênis com glândula bífida, e três pares de glândulas bulbouretrais (Nogueira, 2006).

Os gambás *D. aurita* apresentam uma estação reprodutiva que se inicia em julho, e um período de repouso sexual de fevereiro a junho (Nogueira, 1989). Eles preparam seu ninho com folhas secas em áreas de mata virgem, de vegetação em crescimento, plantações ou ambientes urbanos. O período de gestação é de aproximadamente 13 dias, podendo ocorrer até duas partições por ano. O número de filhotes por ninhada é de aproximadamente oito em campo, e dez em cativeiro (Dezonne et al. 1984). Os filhotes nascem com cerca de 10 mm de comprimento e são embriologicamente imaturos, pois é no marsúpio que a sua morfogênese é concluída. O marsúpio caracteriza-se como uma prega da pele localizada na parte caudal e ventral do abdômen da fêmea, onde os filhotes permanecem fixados, amamentando por aproximadamente 60 dias. Após este período, eles se deslocam para o meio externo, apesar de voltarem para o marsúpio para nutrirem-se. Somente após 90 dias é que eles abandonam o marsúpio (Nogueira, 1989).

Kimble (1997) relata como é interessante que, mesmo após o isolamento reprodutivo por milhões de anos, os marsupiais e mamíferos euterianos compartilhem comportamentos semelhantes, como a marcação de território, a vocalização, comportamentos de corte, maternal, de defesa, agonístico e de aprendizagem. Apesar de serem conhecidos como animais solitários e de hábitos noturnos, didelfídeos da espécie *D. virginiana* exibem interações sociais, como no ato de dormir e comer, quando machos e fêmeas permanecem lado a lado, em contato corporal fora do período de acasalamento (Holmes, 1992).

D. aurita forrageia durante as primeiras horas da noite, em sincronia com a atividade de pequenos mamíferos que, ocasionalmente, tornam sua presa. Esta espécie pode ser considerada onívora, com a maior parte da sua dieta equivalente a invertebrados (coleópteros, diplópodos e opiliones), seguido de frutas e vertebrados (aves) (Cáceres & Monteiro, 2001). Esta espécie apresenta um intestino grosso bastante desenvolvido, em concordância com seu hábito onívoro, e um longo intestino delgado, quando comparado a outras espécies de marsupiais, apesar de serem bastante eficientes na digestão de conteúdos ricos em proteínas e gorduras (Santori et al. 2004).

A adaptação de *D. aurita* às condições de cativeiro, o tamanho da ninhada, a aceitação da alimentação em forma de ração, a facilidade de contenção, o tamanho do corpo e a facilidade de captura são alguns dos fatores que fazem desta espécie uma candidata a estudos experimentais de laboratório, juntamente com as cobaias e coelhos (Paiva et al. 1992; Jurgelski et al. 1974). No entanto, quando se trata do estudo de aspectos morfológicos e histológicos dos órgãos, a maioria das pesquisas utiliza animais capturados na natureza (Coutinho et al. 1982; Edwin, 1982; Souza et al. 1982; Krause et al. 1986; Edwin, 1987; Barbosa et al. 1987; Krause et al. 1989; Fonseca et al. 2002).

Os marsupiais do gênero *Didelphis* já foram utilizados com frequência como modelo no estudo das células enteroendócrinas, auxiliando em aspectos da sua identificação, distribuição, quantificação (Krause et al. 1985; Barbosa et al. 1987; Takagi et al. 1990) e ontogênese (Krause et al. 1989; Fonseca et al. 2002). Estas células, através da liberação de peptídeos, atuam regulando a secreção, absorção, motilidade e proliferação das células epiteliais intestinais (Rindi et al. 2004). Não somente as células endócrinas controlam as funções do aparelho digestório via peptídeos, pois estes mensageiros químicos, incluindo fatores de crescimento, citocinas e neuropeptídeos também são produzidos por neurônios do sistema nervoso entérico e por glândulas anexas (Raybould, 1998; Rehfeld, 1998). Estes peptídeos podem ser liberados na corrente sanguínea e agir à distância (peptídeos endócrinos); podem estimular

localmente células vizinhas (peptídeos parácrinos); ou serem liberados de terminações nervosas (peptídeos neurócrinos) (Polak et al. 1993).

As células endócrinas produtoras de insulina tem sido imunolocalizadas em regiões extrapancreáticas, como na próstata, no néfron, no sistema nervoso central, na retina e no intestino (Coutinho et al. 1984; Coutinho et al. 1985; Stahler et al. 1988; Bendayan & Park, 1991; Kendzierski et al. 2000; Devaskar et al. 2002; Meimaridis et al. 2003). A insulina pancreática reduz a glicose no sangue, aumenta o depósito de glicogênio nos músculos e a utilização metabólica da glicose (Ganong, 1998); enquanto a insulina de origem enteral controla a motilidade intestinal (Kendzierski et al. 2000). Como exemplo desta última função, a indução de uma hiperglicemia via parenteral em humanos saudáveis reduz a motilidade intestinal quando a insulina alcança o duodeno via sanguínea (Eliasson et al. 1995).

A insulina liberada por células endócrinas presentes no epitélio intestinal estimularia localmente células vizinhas (enterócitos), o que bloquearia a absorção de glicose pela parede intestinal. Simultaneamente, hormônios peptídicos liberados pelo intestino estimulariam a liberação de hormônios pancreáticos, particularmente a insulina, o que provocaria um aumento da absorção de glicose (Kendzierski et al. 2000). As células endócrinas intestinais produtoras de insulina, de forma autócrina ou parácrina, estimulariam outras células, o que levaria a uma redução no peristaltismo, gerando tempo suficiente para absorção eficaz de nutrientes pelo intestino.

Em sinergismo com o controle endócrino, o controle neural das funções gastrointestinais é exercido por células nervosas presentes na parede do tubo digestivo, pâncreas e sistema biliar, constituindo o sistema nervoso entérico (Furness, 2000). Este sistema contém dois plexos ganglionares no intestino, o plexo mioentérico e o submucoso.

Em função da importância do controle endócrino, nervoso, além da própria morfologia intestinal no bom funcionamento do aparelho digestório, este trabalho teve como objetivo geral descrever as características histológicas do intestino delgado de gambás da espécie *Didelphis aurita*, destacando a distribuição das células endócrinas e dos plexos nervosos nos diferentes segmentos deste órgão. Como objetivos específicos, destacam-se:

1. Verificar variações quanto ao número de células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina nas regiões inicial, média e final de cada segmento;
2. Mensurar diferenças no número de células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina entre animais adultos e pós-púberes;

3. Quantificar os gânglios nervosos dos plexos submucosos e mioentéricos nos segmentos do intestino delgado;
4. Investigar a existência de uma relação entre o número de células endócrinas e os gânglios nervosos estudados;
5. Observar as diferenças morfométricas entre as camadas mucosa, submucosa e muscular do duodeno, jejuno e íleo;
6. Obter as variações morfométricas das camadas mucosa, submucosa e muscular entre as regiões iniciais, médias e finais de cada segmento;
7. Medir diferenças na morfometria das camadas mucosa, submucosa e muscular entre animais adultos e pós-púberes;
8. Verificar a relação entre o número de células enteroendócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina e os dados morfométricos das camadas do intestino delgado;
9. Verificar a relação entre o número de gânglios nervosos submucosos e mioentéricos e os dados morfométricos das camadas do intestino delgado.

Referências Bibliográficas

Barbosa AJA, Nogueira JC, Penna FJ, Polak JM (1987) Distribution of enteroglucagon- and polypeptide YY-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the white-belly opossum (*Didelphis albiventris*). *Histochemistry* 88, 37-40.

Bendayan M., Park I.-S.. 1991. Presence of extrapancreatic islets of Langerhans in the duodenal wall of the rat. *Diabetologia* 34: 604-606.

Cáceres NC, Monteiro ELA (2001) Food habits, home range and activity of *Didelphis aurita* (Mammalia, Marsupialia) in a forest fragment of southern Brazil. *Stud Neot Fauna Envir* 36, 85-92.

Coutinho HB, Beck F, Santiago MAA, Pessoa RG, Pinheiro PBN, Coutinho VB (1982) Some aspects of the development of the pancreas in the marsupial *Didelphis albiventris*. *Braz J Biol* 42: 15-19.

Coutinho H. B., Sewel H. F., Smith D. I., Coutinho V. B., Pinheiro P. B. N. 1984. Demonstration of insulin in the pancreas of the *Didelphis albiventris* (Opossum) by immunocytochemical techniques. *Anatomischer Anzeiger Jena* 157: 167-175.

Coutinho H. B. 1985. Insulina de gambá. *Ciência Hoje* 3 (18): 57-60.

Devaskar S. U., Singh B. S., Carnaghi L. R., Rajakumar P. A., Giddings S. J. 2002. Insulin II gene expression in rat central nervous system. *Regulatory Peptides* 48: 55-63.

Dezonne MFM, Carreira JCA, Franco AMR (1984) Estudo do ciclo estral e outros aspectos reprodutivos do *Didelphis marsupialis* (Marsupialia, Didelphidae). *An XI Congr Bras Zool*. Belém, Pará.

Edwin N (1982) Quantitative estimation of islet tissue of pancreas in possums (*Trichosurus vulpecula*). *J Zool* 197, 455-461.

Edwin N (1987) Quantitative estimation of pancreatic polypeptide (PP) cells of islet tissue of pancreas in Australian mammals. *J Zool* 213, 665-671.

Eisenberg JF, Redford KH (1999) *Mammals of the Neotropics: The Central Neotropics, Vol 3*. The University of Chicago Press. Chicago, USA. 609 p.

Eliasson B; Björnsson E; Urbanavicius V; Andersson H; Fowelin J; Attvall S; Abrahamsson H., Smith U. 1995. Hyperinsulinaemia impairs gastrointestinal motility and slows carbohydrate absorption. *Diabetologia* 38:79-85.

Fonseca CC, Nogueira JC, Barbosa AJA (2002) Diâmetro das ilhotas pancreáticas do gambá *Didelphis albiventris* em desenvolvimento intramarsupial. *Arch Vet Sci* 7, 129-134.

Furness JB (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. *J Aut Nervous Syst* 81, 87-96.

Ganong W. F. 1998. Fisiologia médica. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 578 p.

Holmes DJ (1992) Odors as cues for orientation to mothers by weaning Virginia opossums. *J Chem Ecol* 18, 2251-2259.

Jurgelski W Jr, Forsythe W, Dahl D, Thomas Ld, Moore JA, Kotin P, Falk HL, Vogel FS (1974) The opossum (*Didelphis virginiana* kerr) as a biomedical model. II. Breeding the opossum in captivity: facility design. *Laboratory Animal Science* 24, 404-411.

Kendzierski K. S., Pansky B., Budd G. C., Saffran M. 2000. Evidence for biosynthesis of preproinsulin in gut of rat. *Endocrine* 13: 353-359.

Kimble DP (1997) Didelphid behavior. *Neur Biobeh Rev* 21, 361-369.

Krause WJ, Yamada J, Cutts H (1985) Quantitative distribution of enteroendocrine cells in the gastrointestinal tract of adult opossum, *Didelphis virginiana*. *J Anat* 140, 591-605.

Krause WJ, Yamada J, Cutts JH (1986) Enteroendocrine cells in the developing opossum stomach. *J Anat* 148, 47-56.

Krause WJ, Cutts III JH, Cutts JH, Yamada J (1989) Immunohistochemical study of the developing endocrine pancreas of the opossum (*Didelphis virginiana*). *Acta Anat* 135, 84-96.

McAlester AL (1994) *História Geológica da vida*. São Paulo: E. Blucher. 173p.

Monteiro-Filho ELA, Cáceres NC (2006) Biologia reprodutiva de fêmeas de marsupiais didelfídeos. In *Os Marsupiais do Brasil* (eds. Cáceres NC, Monteiro-Filho ELA), pp 99-110. Campo Grande: Ed. UFMS.

Meimaridis D. G., Morse D. E., Pansky B., Budd G. C. 2003. Insulin immunoreactivity in the fetal and neonatal rat retina. *Neuroscience Letters* 118: 116-119.

Nogueira JC (1989) Reprodução do gambá *D. albiventris*. *Ciência Hoje* 53, 8-9.

Nogueira JC (2006) Morfologia do sistema genital masculino de marsupiais brasileiros. In *Os Marsupiais do Brasil* (eds. Cáceres NC, Monteiro-Filho ELA), pp 111-129. Campo Grande: Ed. UFMS.

Paiva MGS, Chaplin EL, Stobbe NS, Araújo FAP, Silva NRS (1992) Utilização de *Didelphis marsupialis* como animal de laboratório. *Pesq Agrop Bras* 27, 213-216.

Polak JM, Bishop AE, Barbosa AJA, Bloom SR (1993) Hormônios gastrointestinais. In *Gastroenterologia Clínica* (eds. Dani R, Castro LP), pp 1446-1465. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara-Koogan.

Raybould HE (1998) Does your gut taste? Sensory transduction in the gastrointestinal tract. *News Phys Sci* 13, 275-280.

Rehfeld JF (1998) The new biology of gastrointestinal hormones. *Phys Rev* 78, 1087-1108.

Rindi G, Leiter AB, Kopin AS, Bordi C, Solcia E (2004) The “normal” endocrine cells of the gut changing concepts and new evidences. *An New York Acad Sci* 1014, 1-12.

Santori, R. T., Astua de Moraes, D., Cerqueira, R. 2004. Comparative gross morphology of the digestive tract in ten Didelphidae marsupial species. *Mammalia* 68: 27-36.

Souza AMF, Coutinho HB, Hunter RL, Carvalho LB Jr, Pessoa RG (1982) Insulin-like proteins during the development of the pâncreas in the Brazilian opossum *Didelphis albiventris*. *Comp Bioch Phys* 72, 149-151.

Stahler M. S., Pansky B., Budd G. C. 1988. Immunocytochemical demonstration of insulin-like immunoreactivity in the rat prostate gland. *The Prostate* 13: 189-198.

Takagi C, Yamada J, Krause WJ, Kitamura N, Yamashita T (1990) An immunohistochemical study of endocrine cells in the proximal duodenum of eight marsupial species. *J Anat* 168, 49-56.

**QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS ARGIRÓFILAS, ARGENTAFINS E
IMUNORREATIVAS À INSULINA E DOS GÂNGLIOS NERVOSOS
SUBMUCOSOS E MIOENTÉRICOS NO INTESTINO DELGADO DO GAMBA**

Didelphis aurita (WIED-NEUWIED, 1826)*

Freitas-Ribeiro, G. M., Fonseca, C. C., Matta, S. L. P., Neves, C. A., Rodrigues, S. S.

Resumo

Objetivou-se quantificar as células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreáticas à insulina e os gânglios nervosos submucosos e mioentéricos nos diferentes segmentos do intestino delgado de gambás *Didelphis aurita*. O material biológico consistiu em dez exemplares de gambás *D. aurita* machos e fêmeas, divididos em dois grupos de acordo com o peso, sendo considerados animais da classe 1 aqueles com peso entre 400 e 800g, e da classe 2 os animais acima de 800 g. As técnicas de coloração utilizadas visaram a identificação e quantificação das células argirófilas (Grimelius), argentafins (Masson-Fontana modificada) e imunorreáticas à insulina (imunoperoxidase direta) e dos gânglios nervosos submucosos e mioentéricos (HE). Os resultados indicaram um predomínio das células argirófilas no intestino delgado de gambás da classe 1 e 2, com uma média de 52,58 células/mm² e 56,15 células/mm², respectivamente. O número médio de células endócrinas totais, células argirófilas e argentafins foi menor distalmente nos segmentos intestinais dos gambás das duas classes. Nenhuma diferença significativa foi observada para as células imunorreáticas à insulina entre os segmentos intestinais dos animais da classe 2 ($P > 0,05$). Foi encontrado um maior número de células imunorreáticas à insulina no jejuno e íleo de animais da classe 2 quando comparado ao mesmo segmento em animais da classe 1 ($P < 0,05$). O número de gânglios nervosos submucosos e mioentéricos não variou entre os segmentos intestinais ($P > 0,05$). As células endócrinas pesquisadas foram menores em número no intestino delgado de *D. aurita* quando comparadas aos animais metatérios e eutérios.

Palavras-chave: Células endócrinas, intestino delgado, marsupial, metatérios.

* Trabalho realizado com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**QUANTIFICATION OF ENTERO-ENDOCRINAL ARGYROPHIL,
ARGENTAFINE AND INSULIN IMMUNO-REACTIVE CELLS AND
NERVOUS GANGLIA SUBMUCOUS AND MYOENTERIC IN THE SMALL
INTESTINE'S DIFFERENT SEGMENTS OF THE OPOSSUM *Didelphis aurita*
(WIED-NEUWIED, 1826)**

Freitas-Ribeiro, G. M., Fonseca, C. C., Matta, S. L. P., Neves, C. A, Rodrigues, S. S.

Abstract

The objectives of this work were to quantify the entero-endocrinal argyrophilic, argentaflin and insulin immuno-reactive cells, and submucous and myoenteric ganglia in the small intestine of the big-eared opossum *Didelphis aurita*. Ten specimens of the big-eared opossum *Didelphis aurita*, males and females, were divided into two groups according to weight. Whereas class 1 animals weighed between 400 and 800g, class 2 animals weighed more than 800g. Staining techniques identified and quantified argyrophilic cells (Grimelius), argentaflin cells (Masson-Fontana modified) and insulin immuno-reactive cells (direct (immunoperoxidase), as well as the myoenteric and submucous nervous ganglia (HE). Results showed predominance of argyrophilic cells in the small intestine of class 1 and class 2 opossums, respectively with mean 52.58 cells/mm² and 56.15 cells/ mm². Mean total endocrinal cells, argyrophilic and argentaflin cells distally decreased in the intestine segments of Class 1 and class 2 opossums. No significant difference was reported in insulin immuno-reactive cells among the intestine segments of class 2 animals ($P>0.05$). A greater number of insulin immuno-reactive cells was reported in the jejunum and ileum of Class 2 animals when compared to those from the same segment of class 1 animals ($P<0.05$). The number of the myoenteric and submucous ganglia did not show variation among intestinal segments ($P>0.05$). Endocrine cells were less numerous in the small intestine of the *D. aurita* when compared to the Metatheria and Eutheria animals.

Key-words: Endocrine cells, small intestine, marsupial, Metatheria.

Introdução

O sistema endócrino gastroenteropancreático abrange todas as células endócrinas dispersas ao longo do tubo digestivo e pâncreas (Fujita, 1973), cujas funções incluem o controle da secreção, absorção, motilidade e proliferação das células epiteliais (Rindi et al. 2004). Estas células endócrinas podem ser classificadas de acordo com a sua morfologia (Fujita & Kobayashi, 1977; Sjölund et al. 1983; Dayal et al. 1987), capacidade de absorver determinados sais (Grimelius & Wilander, 1980), morfologia dos seus grânulos secretores (Polak et al. 1993) e presença de moléculas marcadoras específicas (Rindi et al. 2004; Schonhoff et al. 2004).

O conjunto de células endócrinas produtoras de insulina recebeu este nome em função das ilhas (insula = ilha) de células que se formam no pâncreas endócrino. A insulina do gambá exhibe considerável grau de conservação da sua estrutura primária quando comparada à insulina de animais eutérios atuais (Yu et al. 1989). De acordo com Seino et al. (1987), a insulina de marsupiais difere da insulina de porcos e macacos em somente três aminoácidos. Dentre os seus vários efeitos está a diminuição do teor de glicose no sangue, aumentando, simultaneamente, o depósito de glicogénio nos músculos e a utilização metabólica da glicose (Ganong, 1998).

Coutinho (1985) cita que a produção da insulina pelo pâncreas passaria por uma fase exócrina antes de adotar a forma tipicamente endócrina. Em pesquisas com pâncreas de gambás, ele verificou que a insulina em células-beta só era detectada em animais acima de 70 mm de comprimento. Porém, em estágios de desenvolvimento anteriores, esse hormônio só foi identificado nas unidades de secreção exócrina. O decréscimo desta insulina no pâncreas exócrino só foi observado após a diferenciação das células-beta nas ilhotas pancreáticas, embora poucas células imunorreativas isoladas ainda permanecessem em unidades secretoras exócrinas. Estas células originam-se na parede dos ductos pancreáticos e então migram para o parênquima do pâncreas, ocupando a porção endócrina.

A insulina, produzida principalmente pelo pâncreas, também foi detectada por técnicas imunohistoquímicas na próstata (Stahler et al. 1988), no néfron (Coutinho et al. 1985), no sistema nervoso central (Devaskar et al. 2002), na retina (Meimaridis et al. 2003) e no intestino (Coutinho et al. 1984; Bendayan & Park, 1991; Kendzierski et al. 2000).

A presença de receptores para insulina no epitélio intestinal sugere que ela possa ter um papel autócrino ou parácrino quando produzida neste órgão (Bergeron et al.

1980; Pillion et al. 1985). Kendzierski et al. (2000) encontraram imunorreatividade intracelular para insulina nas células glandulares do estômago e do cólon de ratos, mas não no intestino delgado. Contrariamente, Coutinho et al. (1984) observaram marcação positiva para insulina na borda em escova e em algumas células isoladas nos segmentos proximais do intestino delgado de gambás *Didelphis albiventris* adultos, embora nenhuma evidência nos segmentos médios e distais tenha sido observada. Igualmente, Bendayan & Park (1991) localizaram ilhotas extra-pancreáticas entre as criptas duodenais e a camada muscular da mucosa em ratos. Estas ilhotas estavam restritas à área do duodeno atravessada pela porção final do ducto biliar, antes da sua abertura no lúmen intestinal. As ilhotas estavam envolvidas por tecido conjuntivo e não exibiam contato direto com as células epiteliais dos ductos e das criptas. Ito et al. (1988) também encontraram um pequeno número de células imunorreativas à insulina no antro pilórico e no duodeno de porcos de 32 a 41 dias de idade.

Além do controle endócrino das funções gastrointestinais realizado pelas células enteroendócrinas, existe também um controle neural, exercido por células nervosas presentes na parede do tubo digestivo, pâncreas e sistema biliar, constituindo o sistema nervoso entérico (Furness, 2000). Este sistema contém dois plexos ganglionares no intestino, o plexo mioentérico e submucoso, onde reside a maioria das células nervosas intrínsecas. O plexo mioentérico, conhecido como plexo de Auerbach, está localizado entre a camada muscular circular interna e a longitudinal externa e, o plexo submucoso ou de Meissner, localiza-se no tecido conjuntivo da camada submucosa (Furness & Costa, 1980). Os sistemas nervoso e endócrino controlam, de forma integrada, os movimentos intestinais, a secreção das suas glândulas e, indiretamente, participam dos processos de digestão e absorção de nutrientes (Rodrigues, 2005).

No estudo do sistema endócrino, os gambás didelídeos vem se destacando como modelo devido à diferenciação simultânea do aparelho digestório e das glândulas endócrinas quando o animal ainda se encontra em período intramarsupial (Krause et al. 1989; Fonseca et al. 2002b). Além disso, como seu nascimento ocorre em estágio precoce de desenvolvimento, torna-se possível a realização de experimentos sem a exigência dos procedimentos pré, trans e pós-operatórios decorrentes de cirurgias pré-natais (Coutinho, 1985; Paiva et al. 1992). Contudo, ainda são poucas as pesquisas imunohistoquímicas das células enteroendócrinas de gambás (Krause et al. 1985; Barbosa et al. 1987; Krause et al. 1989; Takagi et al. 1990; Fonseca et al. 2002a, Barbosa et al. 2006).

Existem ainda dúvidas quanto à localização das células intestinais imunorreativas (IR) à insulina, principalmente devido às divergências dos trabalhos de Kendziersk et al. (2000) quando comparados aos relatos de Coutinho et al. (1984), Ito et al. (1988) e Bendayan & Park (1991). Assim, o presente trabalho teve por objetivo verificar possíveis diferenças no número de células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina entre o duodeno, jejuno e íleo e entre as regiões iniciais, médias e finais de cada segmento do intestino delgado de gambás *Didelphis aurita* pós-púberes e adultos. Objetivou-se também quantificar os gânglios nervosos dos plexos submucosos e mioentéricos nos diferentes segmentos do intestino delgado de gambás *D. aurita* acima de 400 g (pós-púberes e adultos).

Material e Métodos

Armadilhas do tipo gancho foram utilizadas para a captura de dez espécimes de gambás pós-púberes e adultos, machos e fêmeas, da espécie *Didelphis aurita*. As capturas foram realizadas entre janeiro e junho de 2007, no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Os animais foram eutanasiados mediante o uso de anestésico geral (pentobarbital sódico), seguido da administração de cloreto de potássio. A coleta de animais foi autorizada pelo IBAMA (licença nº 10168-1), bem como os procedimentos experimentais envolvendo os animais seguiram as determinações da Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFV, sendo aprovado sob o protocolo nº 56/2007.

Apesar da estimativa da idade oscilar em função da etapa de desenvolvimento, Dezone et al. (1984) estipulou seis classes de gambás *Didelphis marsupialis* de acordo com registros biométricos, alterações na pelagem e dentição obtidos de animais em cativeiro e campo. Neste trabalho não foi possível acompanhar as fases de desenvolvimento a partir de coletas periódicas; assim, para uniformizar os dados, os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o peso para a quantificação das células endócrinas entre os segmentos intestinais. Foram considerados animais da classe 1 aqueles com peso entre 400 e 800 g (pós-púberes, n=5), e da classe 2 aqueles acima de 800 g (adultos, n=5). Como os resultados revelaram poucas diferenças significativas, foi utilizado apenas um grupo de animais (n=10) para a quantificação das células endócrinas entre as regiões de cada segmento e para a quantificação dos gânglios nervosos submucosos e mioentéricos.

Do tubo digestivo de cada um dos animais, foram identificadas e retiradas as seguintes seções: duodeno, que se estende da extremidade inicial do intestino delgado até o início do mesentério; jejuno, que vai do início do mesentério até o íleo, localizado na borda livre da prega ileocecal; íleo, que segue da prega ileocecal até a junção ileocecal (Dyce et al. 1997).

Foram coletados dois fragmentos de 1 cm² de cada uma das regiões inicial, média e final de cada segmento intestinal por animal. Estes foram fixados por 24 h em líquido de Bouin, para coloração pelas técnicas de H-E (Bancroft & Stevens, 1996), de Grimelius (Grimelius, 1968) e de imunoperoxidase direta (Sternberger, 1979), e em formol a 10% tamponado para técnica de Masson-Fontana modificada (Barbosa et al. 1984). Em seguida, os fragmentos foram desidratados, diafanizados, incluídos em parafina e seccionados na espessura de 5µm em micrótomo rotativo manual (modelo Leica, RM2155). O intervalo entre os cortes foi de aproximadamente 50µm (10 cortes

eram descartados). Após a retirada da parafina, as secções histológicas foram hidratadas e coradas. As técnicas de coloração utilizadas visaram a identificação e quantificação das células argirófilas (Grimelius), das células argentafins (Masson-Fontana modificada), das células imunorreativas à insulina (imunoperoxidase direta) e dos gânglios mioentéricos e submucosos (H-E). Cortes de pâncreas de gambás foram utilizados como controle.

Os anticorpos monoclonais utilizados na técnica imunocitoquímica foram produzidos pelo laboratório Bethyl, lote nº A90-117P-4, e como controle positivo foi utilizado pâncreas de gambás. O processamento do material foi realizado no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa - UFV.

As células argentafins, argirófilas e imunorreativas à insulina foram quantificadas em seis campos aleatórios da túnica mucosa, delimitados pela extensão da régua ocular micrométrica acoplada à ocular de 10X, equivalente a 300 µm de extensão e objetiva de 40X. Para a quantificação dos gânglios nervosos submucosos e mioentéricos foi utilizada a objetiva de 10X, onde foram pesquisados seis campos da camada submucosa e da muscular, respectivamente, sendo estes campos delimitados pela extensão da régua ocular micrométrica equivalente a 1000 µm de extensão. Foi registrado o número médio das células endócrinas para cada mm² de área da camada mucosa e de gânglios nervosos submucosos e mioentéricos para cada mm² de área da camada submucosa e muscular, respectivamente. As áreas da mucosa, submucosa e muscular foram obtidas a partir da sua espessura média multiplicada pela extensão da régua micrométrica.

As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio binocular Olympus BX 60 acoplado à câmera digital Qcolor.3 (Olympus), no Laboratório de Citogenética de Insetos do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa.

Com o objetivo de realizar comparações entre os segmentos e regiões de cada segmento do intestino delgado em relação ao número de células argentafins, argirófilas e imunorreativas à insulina, bem como ao número de gânglios nervosos submucosos e mioentéricos entre os segmentos, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi empregado para testar a normalidade dos dados ($P < 0,05$). Em função da rejeição do critério de normalidade para os grupos comparados, foram empregados testes não-paramétricos de análise de medidas de tendência central. Portanto, o teste de Kruskal-Wallis (H) foi utilizado para verificar possíveis diferenças entre as medianas dos três segmentos do intestino delgado, considerando os dados das contagens de células endócrinas,

argentafins, argirófilas e IR à insulina e de gânglios nervosos submucosos e mioentéricos ($P < 0,05$).

Resultados

A maioria das células endócrinas apresentou-se de forma ovalada. Células endócrinas do tipo aberto e fechado foram observadas intercaladas com as células exócrinas. As fotomicrografias das células enteroendócrinas são apresentadas na figura 1.

O duodeno dos gambás da classe 1 apresentou média de 80,08 células endócrinas por mm^2 , sendo que destas, 76,52% eram células argirófilas, 22,83% argentafins e 0,65% IR insulina. Em seguida, com média de 60,47 cel/ mm^2 (Tab. 1), as células endócrinas totais do íleo foram constituídas por 85,10% de células argirófilas, 13,77% argentafins e 1,13% IR insulina. O jejuno foi o segmento intestinal com menor número de células endócrinas totais, equivalente a 54,98 células endócrinas por mm^2 , onde 81,87% foram argirófilas, 17,67% argentafins e 0,46% IR à insulina (Tab. 1).

O número médio de células endócrinas totais foi menor nos segmentos distais do intestino dos gambás da classe 2 ($P < 0,05$) (Tab. 2), com 83,19% delas no duodeno, 60,57% no jejuno e 56,42% no íleo. No duodeno, as células argirófilas representaram 82,58% das células endócrinas, 16,33% as argentafins e 1,09% as IR à insulina. No jejuno, 83,5% eram argirófilas, 14,97% argentafins e 1,60% IR à insulina. No íleo, 87,26% eram argirófilas, 9,48% argentafins e 3,26% IR à insulina.

O número de células argirófilas e argentafins por mm^2 foi menor distalmente ($P < 0,05$) no intestino delgado de animais das classes 1 e 2. Nenhuma diferença foi observada para as células IR à insulina entre os segmentos intestinais da classe 1 e classe 2 ($P > 0,05$) (Tabs. 1 e 2).

Foi observado um maior número de células IR à insulina no jejuno e íleo de animais da classe 2 ($P < 0,05$) quando comparado ao mesmo segmento em animais da classe 1 (Tab. 1 e 2), enquanto o número de células argentafins foi menor no duodeno dos animais da classe 2 ($P < 0,05$). Nenhuma diferença foi detectada para os outros tipos celulares em relação aos segmentos comparados das duas classes.

Nenhuma variação foi observada entre as diferentes células endócrinas nas regiões inicial, média e final dos segmentos, exceto as células argirófilas no jejuno (Tab. 1).

O número de gânglios nervosos submucosos ($H = 0,54$; $gl = 2$; $P = 0,76$) e mioentéricos ($H = 5,44$; $gl = 2$; $P = 0,06$) não variou entre os três segmentos do intestino delgado dos gambás *D. aurita* (Tab.3). Em média, foram encontrados 17,29 gânglios submucosos/ mm^2 na submucosa, e 23,77 gânglios mioentéricos/ mm^2 na região

muscular. O plexo mioentérico foi aparentemente maior que o submucoso. As células nervosas foram observadas em agrupamentos e também isoladas, tanto na camada submucosa como entre as camadas musculares. As fotomicrografias dos gânglios nervosos submucosos e mioentéricos estão apresentados na figura 2.

Tabela 1: Número de células endócrinas por mm² (média ± desvio-padrão) da camada mucosa do duodeno, jejuno e íleo de gambás *D. aurita* da classe 1 (400g ≥ animal < 800g; n = 5).

Células endócrinas	Duodeno	Jejuno	Íleo
Argirófilas	61,27±11,76 ^a	45,01±14,17 ^b	51,46±15,35 ^b
Argentafins	18,29±6,84 ^a	9,71±4,17 ^b	8,33±3,89 ^b
IR à Insulina	0,52±0,36 ^{ab}	0,25±0,17 ^a	0,68±0,56 ^b
Total de células endócrinas	80,08±12,36 ^a	54,98±15,77 ^b	60,47±17,4 ^b

Médias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 2: Número de células endócrinas por mm² (média ± desvio-padrão) da camada mucosa do duodeno, jejuno e íleo de gambás *D. aurita* da classe 2 (animal > 800g; n = 5).

Células endócrinas	Duodeno	Jejuno	Íleo
Argirófilas	68,70±15,26 ^a	50,53±9,83 ^b	49,23±15,96 ^b
Argentafins	13,58±5,80 ^a	9,06±4,55 ^{a,b}	5,34±2,92 ^b
IR à Insulina	0,91±0,63 ^a	0,96±0,60 ^a	1,83±1,47 ^a
Total de células endócrinas	83,19±14,08 ^a	60,57±12,51 ^b	56,42±16,50 ^b

Médias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 3: Número de células endócrinas por mm² das camadas mucosas das regiões inicial, média e final do duodeno, jejuno e íleo, e de gânglios nervosos submucosos e mioentéricos por mm² das camadas submucosa e muscular nos segmentos do intestino delgado de gambás *D. aurita* acima de 400g (adultos e pós- púberes, n = 10).

Regiões (*)	Argirófilas	Argentafins	I R Insulina	Segmentos (*)	Gânglio submucoso	Gânglio Mioentérico
D _i	61,11±13,38 ^a	17,63±7,14 ^a	0,86±0,51 ^a	D	5,49±2,60 ^a	5,79±1,42 ^a
D _m	65,82±16,93 ^a	15,36±7,13 ^a	0,56±0,42 ^a			
D _f	68,02±11,40 ^a	14,81±6,06 ^a	0,72±0,68 ^a			
J _i	48,41±7,58 ^{ab}	10,18±4,26 ^a	0,71±0,65 ^a	J	5,21±2,19 ^a	8,03±3,13 ^a
J _m	54,71±11,56 ^a	10,78±3,68 ^a	0,49±0,36 ^a			
J _f	40,20±13,40 ^b	7,19±4,43 ^a	0,62±0,67 ^a			
I _i	54,11±15,56 ^a	6,92±2,54 ^a	1,46±1,45 ^a	I	6,59±3,80 ^a	9,95±5,54 ^a
I _m	45,56±11,72 ^a	7,61±4,08 ^a	1,34±1,27 ^a			
I _f	51,36±18,57 ^a	5,98±4,43 ^a	0,96±1,04 ^a			

(*) **D**, **J** e **I** representam os segmentos duodeno, jejuno e íleo, respectivamente. Letras subscritas **i**, **m** e **f** representam, na ordem, regiões inicial, média e final de cada segmento. Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis, ao nível de significância de 5%.

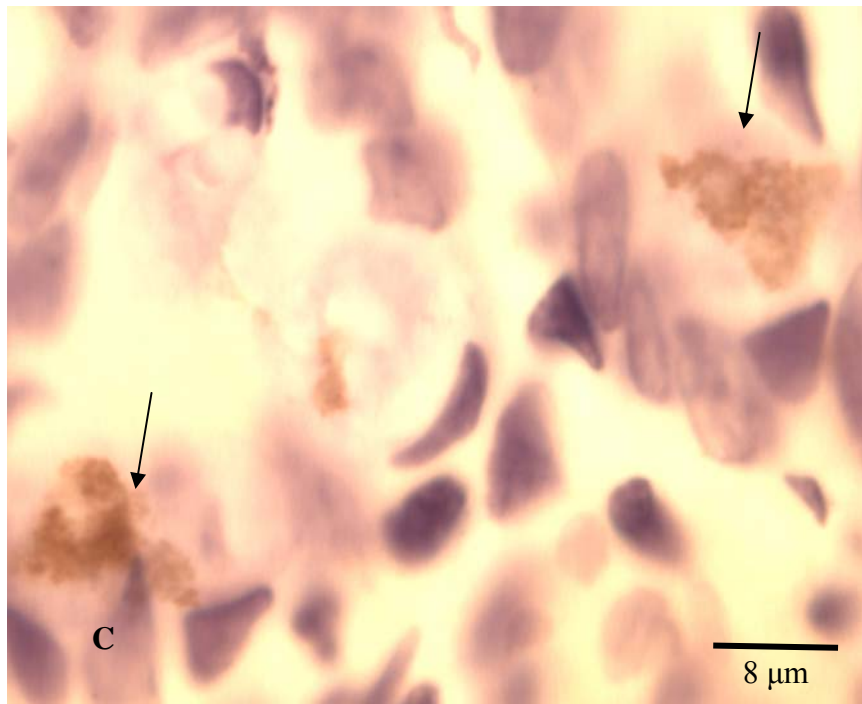
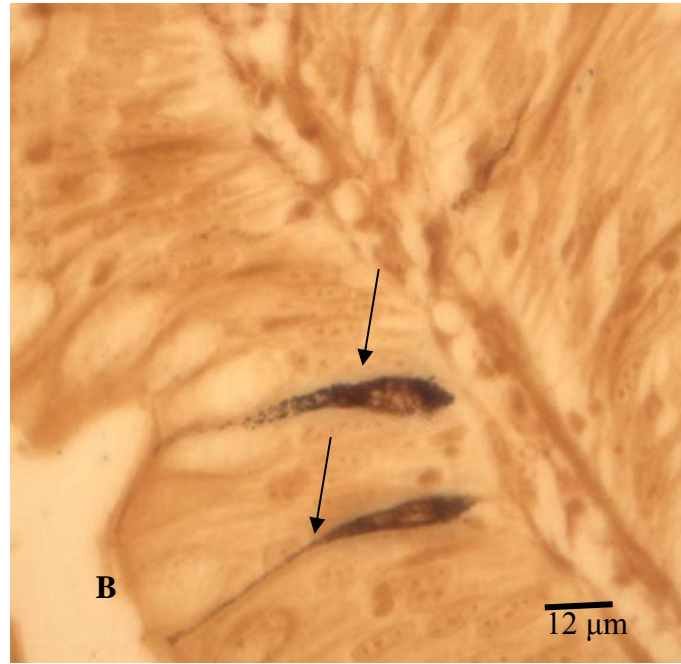
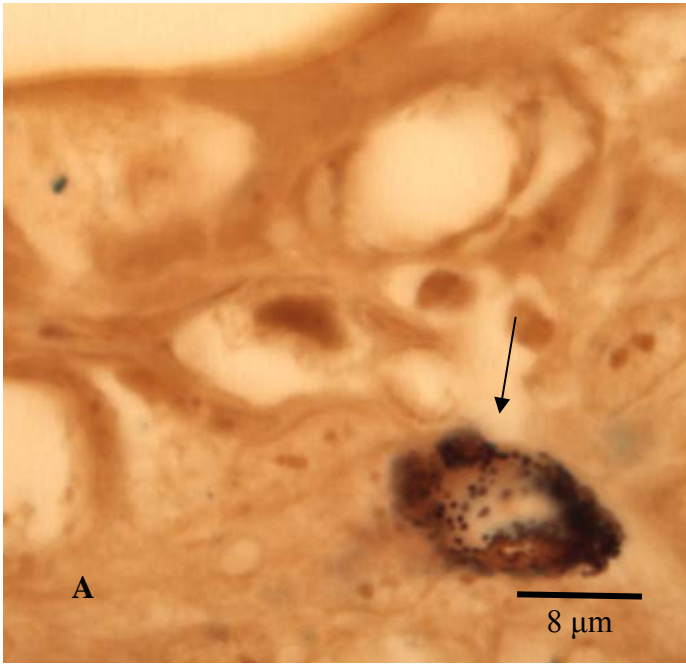


Figura 1. a. Células endócrinas argirófilas na camada mucosa do íleo do gambá *Didelphis aurita*. (Técnica de Grimelius). Figura b. Células endócrinas argentafins (Técnica de Masson-Fontana Modificada). Figura c. Células endócrinas imunorreativas à insulina (Técnica da Imunoperoxidase). As setas indicam as células endócrinas.

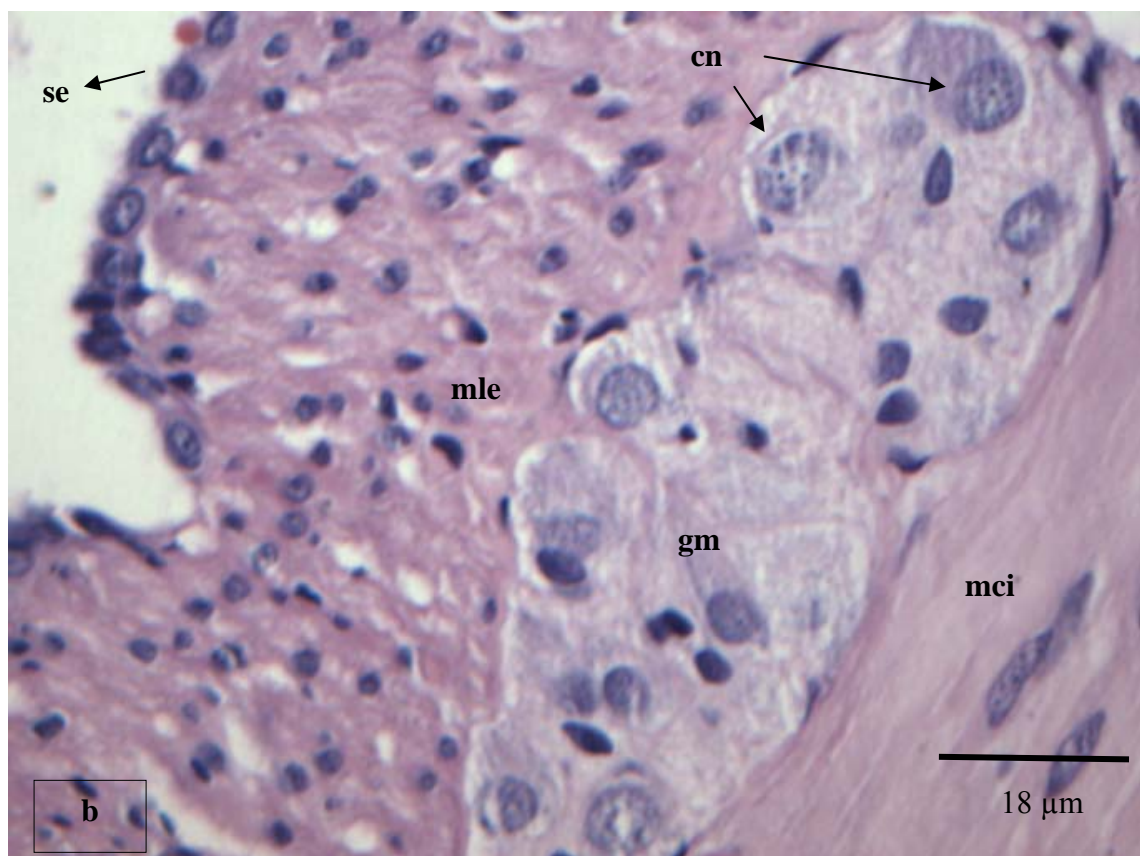
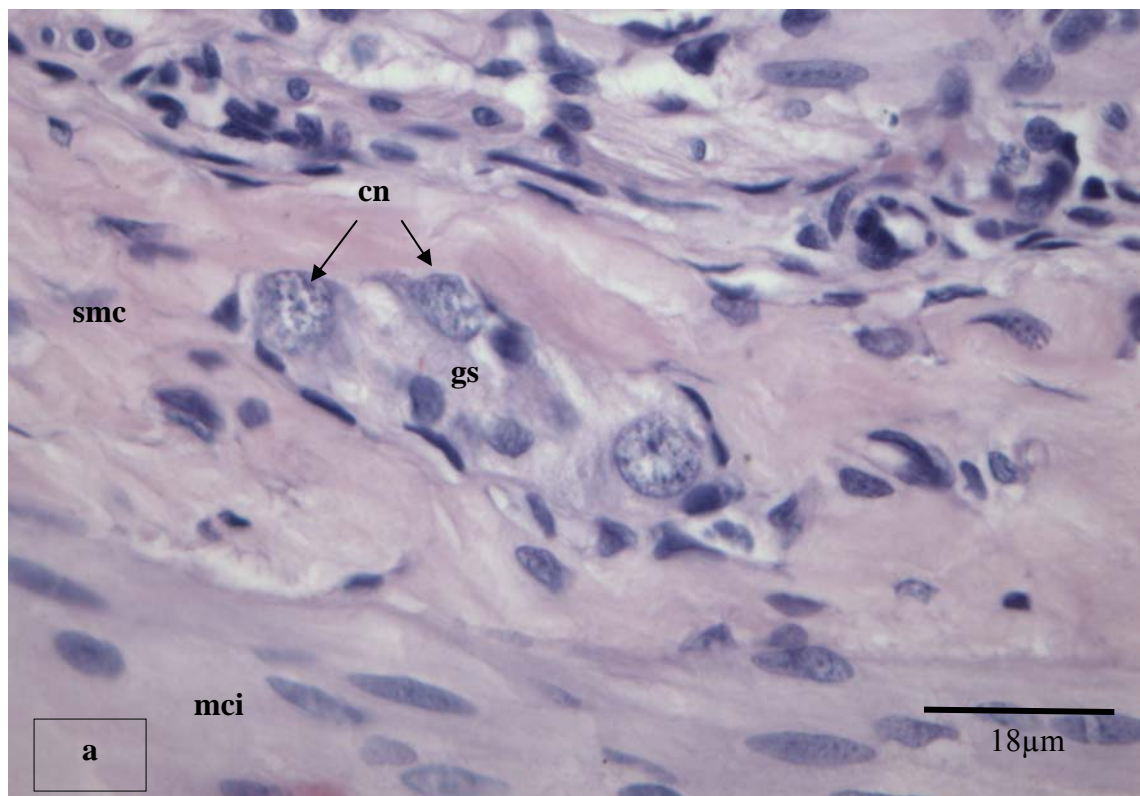


Figura 2. a. Plexo nervoso submucoso. b. Plexo nervoso mioentérico do intestino delgado do gambá *D. aurita*. H-E. gs-gânglio nervoso submucoso; gm-gânglio nervoso mioentérico; cn-corpos de neurônios; smc-submucosa; mci-muscular circular interna; mle-muscular longitudinal externa; se-serosa.

Discussão

De acordo com Polak et al. (1993) e Grimelius & Wilander (1980), as células endócrinas são argirófilas ou argentafins, com exceção das células imunorreativas à insulina, colecistocinina e somatostatina, que não são marcadas pela prata (Polak et al. 1993). Diante disto, aqui abrangemos uma análise de quase a totalidade das células endócrinas, faltando apenas para um trabalho futuro as células produtoras de colecistocinina e somatostatina.

As células endócrinas, distribuídas por toda a extensão do tubo digestivo do gambá *D. aurita* localizavam-se no epitélio de revestimento da mucosa e no epitélio glandular, intercaladas com as células exócrinas. Elas tinham morfologia variada, apesar da grande maioria apresentar-se com conformação ovalada. Dois tipos celulares foram observados, sendo um cujas células alcançavam a superfície luminal, consideradas do tipo aberto, e outra sem continuidade com o lúmen, as do tipo fechado. De acordo com Santos & Zucoloto (1996), as células do tipo fechado respondem à distensão ou estimulação humoral, enquanto que as do tipo aberto controlam pequenas alterações do pH ou da composição do conteúdo luminal do intestino.

Foram detectadas diferenças de intensidade de coloração entre as células endócrinas de uma mesma lâmina, o que, segundo Rodrigues (2005) e Leaming & Cauna (1961), deve-se à existência de subtipos celulares específicos, alterações temporárias no estado de atividade da célula, diferenças no conteúdo enzimático e diferentes estágios de desgranulação.

As pesquisas envolvendo células endócrinas distribuídas ao longo do tubo digestivo de mamíferos geralmente se referem apenas àquelas localizadas em uma das regiões dos segmentos, desconsiderando assim as regiões inicial, média e final de cada um deles (Krause et al. 1989; Takagi et al. 1990; Fonseca et al. 2002). Acreditava-se que diferenças no número de células endócrinas pudessem ser encontradas entre as regiões dos segmentos do intestino delgado de *D. aurita*. Entretanto, este fato não foi estatisticamente comprovado neste trabalho.

As células argirófilas foram mais numerosas que as argentafins e, estas, mais numerosas do que as imunorreativas à insulina. Tal resultado pode ser explicado pela técnica empregada, pois, a reação argentafim aparece apenas nas células enterocromafins, enquanto que a reação argirófila ocorre em quase todas as células enteroendócrinas, exceto nas células produtores de colecistocinina, somatostatina e insulina (Polak et al. 1993). A técnica imunohistoquímica utilizada para corar as células

imunorreativas à insulina é mais específica do que as anteriores, devendo-se este fato ao emprego de anticorpos monoclonais que aumentam a sensibilidade deste método.

As células argirófilas também representam uma população heterogênea de células endócrinas, apresentando diversos tipos de peptídeos e aminas biogênicas como produto de secreção (Polak et al. 1993). Fonseca et al. (2002a), ao identificarem células argirófilas no íleo de gambás da espécie *D. albiventris*, encontraram uma média de aproximadamente 122 a 138 células/mm² em animais no período intramarsupial, 133 células/mm² em animais desmamados e 211 células/mm² em animais adultos. Aqui, foram observadas no íleo de *D. aurita* uma média de aproximadamente 49 células argirófilas/mm². Ito et al. (1988) encontraram entre 80 e 160 células argirófilas/mm² no intestino proximal de embriões de camundongo, e Rodrigues (2005) uma média de 68,1 células argirófilas/mm² no íleo de capivaras adultas. A quantificação destas células pelo método de Grimelius (1968) pode ser arbitrária pelo fato do pesquisador poder considerar a presença das mesmas apenas quando o citoplasma apresenta-se impregnado por sais de prata, associados ou não à imagem negativa do núcleo ou somente traços de prata. Neste trabalho, foram consideradas positivas as células com a área do citoplasma totalmente impregnada pelos sais de prata.

As células argentafins foram consideravelmente menores em número do que as células argirófilas, com uma média de 12,11 células/mm² (classe 1) e 9,33 células/mm² (classe 2) no intestino delgado de *D. aurita*. Rodrigues (2005) também encontrou no intestino delgado da capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* predominância de células argirófilas (83,1 células/mm²) em relação às células argentafins (53,4 células/mm²). Igualmente, Bressan et al. (2004) identificaram uma média de 235,7 células argirófilas/mm² na região íleocecal da capivara *H. hydrochaeris*, e 228 células argentafins/mm² na mesma região. O elevado número de células argentafins encontradas por Bressan et al. (2004) pode ter ocorrido em função do espessamento da região íleocecal, onde provavelmente ocorre maior controle neuroendócrino.

A população de células enteroendócrinas foi menor distalmente nas duas classes de animais estudados. De acordo com Rodrigues (2005), a frequência de células endócrinas aparentemente maior no duodeno da capivara se deve à importância deste segmento intestinal nas funções digestivas e absorptivas. Inversamente, Krause et al. (1985), ao quantificar vários tipos de células enteroendócrinas na mucosa gastrointestinal de gambás da espécie *D. virginiana*, registraram maior número na porção final do intestino delgado, destacando ainda a similaridade dos seus resultados em relação a outros mamíferos. Os autores também observaram variação considerável

na distribuição de tipos específicos dentro de um determinado segmento. Takagi et al. (1990) também encontraram semelhanças na distribuição e frequência relativa das células endócrinas no duodeno de oito espécies de marsupiais quando comparadas às espécies de mamíferos eutérios, não tendo sido observada diferença entre marsupiais herbívoros, onívoros ou carnívoros.

Visualmente, detectamos maior abundância de células endócrinas nas criptas, com uma gradativa redução nas vilosidades intestinais e nenhuma ocorrência nas glândulas de Brunner, assim como em Takagi et al. (1990) e Rodrigues (2005). Contrariamente, Krause et al. (1985) identificaram a maioria dos tipos de células enteroendócrinas nas vilosidades e um menor número nas criptas do epitélio intestinal de *D. virginiana*. Os resultados de Krause et al. (1985) foram distintos dos demais supracitados muito provavelmente em função da metodologia empregada para a detecção das células enteroendócrinas. A técnica utilizada por estes últimos autores foi da peroxidase anti-peroxidase com anticorpos policlonais, enquanto em nosso trabalho, a técnica imunohistoquímica foi realizada com anticorpos monoclonais.

Quando o número de células endócrinas argirófilas e argentafins foi comparado entre as duas classes, nenhuma diferença foi observada no intestino delgado de animais da Classe 1 em relação aos animais da Classe 2. Entretanto, em estágios diferentes de desenvolvimento, Fonseca et al. (2002a) encontraram maior número de células argirófilas no íleo de *D. albiventris* adultos em relação aos jovens no marsúpio. No jejuno e íleo de animais da Classe 2, foi observado um maior número de células IR à insulina quando comparado aos mesmos segmentos em animais da classe 1. Provavelmente estes resultados refletem o fato dos animais adultos apresentarem constituição numérica definitiva das células IR à insulina, diferentemente dos jovens, nos quais estas células ainda não entraram em número constante.

Não houve diferença na quantidade de células imunorreativas à insulina entre o duodeno, jejuno e íleo das duas classes estudadas, apesar de aparentemente estas terem sido mais abundantes no íleo. Pelo fato desta última porção do intestino delgado ter envolvimento com absorção de água, especula-se que a insulina produzida neste segmento tenha participação neste processo.

Quando o número de células IR à insulina foi comparado entre as duas classes, observou-se aumento de 0,75 células/mm² no intestino delgado dos animais com peso maior que 800 g. Ito et al. (1988) encontraram um pequeno número destas células no duodeno e antro pilórico de porcos com 33 a 41 dias. Coutinho et al. (1984) também registraram estas células na região proximal do intestino delgado ainda imaturo de

marsupiais lactentes. Coutinho et al. (1984) acreditam que a porção proximal do intestino funcione como local de absorção da insulina secretada diretamente no interior deste órgão e, que animais definitivamente adultos não relembram o status embrionário/jovem que apresentam um número muito grande de células IR à insulina.

Este estudo preocupou-se com a localização de células endócrinas no intestino delgado de *D. aurita*, enquanto que Kendzierski et al. (2000) evidenciaram a biossíntese de preproinsulina nas células epiteliais do cólon, nas criptas intestinais e em algumas células glandulares do estômago de ratos. A insulina liberada por células endócrinas presentes no epitélio intestinal estimularia localmente células vizinhas (enterócitos), o que bloquearia a absorção de glicose pela parede intestinal. Simultaneamente, hormônios peptídicos liberados pelo intestino estimulariam a liberação de hormônios pancreáticos, particularmente a insulina, o que levaria a um aumento da absorção de glicose. As células endócrinas intestinais produtoras de insulina, de forma autócrina ou parácrina, estimulariam outras células, o que levaria a uma redução no peristaltismo, gerando tempo suficiente para absorção eficaz de nutrientes pelo intestino (Kendzierski et al. 2000).

A insulina pancreática reduz a glicose no sangue, aumenta o depósito de glicogênio nos músculos e a utilização metabólica da glicose (Ganong, 1998), enquanto a insulina de origem enteral controla a motilidade intestinal (Kendzierski et al. 2000). Eliasson et al. (1995) observaram alterações no trato gastro-intestinal ao induzir hiperinsulinemia via parenteral (46 +/- 4 mU/l) em humanos saudáveis, principalmente no estômago e duodeno proximal. Neste caso, a insulina, ao alcançar o intestino por via sanguínea, reduziu a motilidade intestinal e a absorção de carboidratos.

Em nosso trabalho, as células imunorreativas à insulina foram encontradas isoladas nas criptas e vilosidades intestinais. Por outro lado, Bendayan & Park (1991) detectaram, através do uso de técnicas histológicas e imunocitoquímicas, células imunorreativas à insulina formando ilhotas no duodeno de ratos. Estas células localizavam-se no centro de ilhotas rodeadas por células imunorreativas ao glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático. Estas células endócrinas estavam no tecido conjuntivo, entre as criptas duodenais e a camada muscular, próximas à porção final do ducto biliar. Todas as células imunorreativas à insulina exibiram retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi desenvolvidos, bem como numerosos grânulos secretórios.

Apesar de não termos observado a presença de ilhas de células endócrinas no intestino delgado de *D. aurita*, de acordo com Bendayan & Park (1991), as ilhotas que

se formam no intestino são bem parecidas às pancreáticas, com as células produtoras de glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático organizando-se perifericamente ao redor das células produtoras de insulina.

Os gânglios nervosos do plexo submucoso concentraram-se próximos à muscular da mucosa e os gânglios do mioentérico entre as camadas musculares circulares interna e longitudinal externa, juntamente com os feixes de fibras nervosas, assim como relatado para mamíferos eutérios (Kierszenbaum, 2004). Os plexos eram proeminentes, sendo o mioentérico aparentemente maior do que o submucoso, ou seja, com maior população de corpos de neurônios. Segundo Rodrigues (2005), o maior tamanho do gânglio mioentérico reflete a sua importância no controle da motilidade intestinal. Os movimentos de propulsão e mistura do intestino delgado envolvem uma assembléia de neurônios nos plexos. No intestino delgado de porcos, a contração de uma única unidade de 10 mm envolve cerca de 6.500 neurônios aferentes primários intrínsecos no gânglio mioentérico, 1.200 interneurônios ascendentes, 3.000 interneurônios descendentes, 4.000 neurônios motores inibitórios da musculatura circular e 3.000 neurônios motores excitatórios para o músculo circular (Clerc et al. 1998; Kunze & Furness, 1999).

Os “clusters” formados pelos corpos de neurônios tinham tamanho e forma variada nos dois plexos. As células nervosas também foram observadas isoladas, não formando agrupamentos, em ambos os plexos. Leaming & Cauna (1961) também encontraram células nervosas isoladas e agrupadas no duodeno e jejuno de gatos, sendo que o plexo mioentérico do jejuno continha mais células nervosas formando os agrupamentos do que o plexo mioentérico do duodeno, com uma média de 37 células/mm² no jejuno e 12,17 células/mm² no duodeno.

Com a metodologia empregada, foi possível observar células ganglionares com citoplasma intensamente basófilo, núcleo com cromatina frouxa e nucléolo evidente. Este trabalho não contemplou a forma dos neurônios, mas sabe-se que eles podem ser classificados em três tipos de acordo com Dogiel (1896) *apud* Christensen (1988), com base principalmente na forma dos dentritos, e em cinco tipos de acordo com Stach (Stach 1980, 1981, 1982a, 1982b, 1985) *apud* Christensen (1988), conforme o destino dos axônios. No intestino delgado do gambá-americano *Didelphis virginiana*, Christensen (1988) encontrou células ganglionares de várias formas pela técnica de Silver, onde a metade delas eram argirófilas.

Os plexos mioentéricos e submucosos podem diferir funcionalmente entre órgãos em função dos seus padrões de motilidade, podendo ainda variar quanto à forma

e número dentro do mesmo órgão e diferir entre espécies (Christensen, 1988). Como exemplo, o intestino delgado de ovelhas contém 11 vezes mais neurônios mioentéricos do que porcos e aproximadamente 80 vezes mais do que camundongos (Gabella, 1987).

Nossos dados indicaram maior quantidade de gânglios mioentéricos (23,77 gânglios/mm²) quando comparados aos submucosos (17,29 gânglios/mm²) no intestino delgado de *D. aurita*. Rodrigues (2005) também obteve esta relação, onde no intestino delgado de capivaras ocorreram 2,29 gânglios mioentéricos na camada muscular, e 0,69 gânglios submucosos na camada submucosa, ambos a cada 1,2 mm de extensão. Entre os segmentos não houve diferença na quantidade de gânglios mioentéricos e submucosos, embora aparentemente tenha sido observado maior quantidade dos mesmos no íleo. Rodrigues (2005) também não encontrou variação significativa na quantidade destes gânglios ao longo do intestino delgado de capivaras. De acordo com este autor, como o número de gânglios é mais freqüente nas porções de maior motilidade, possivelmente não existam grandes diferenças entre duodeno, jejuno e íleo de capivaras quanto à capacidade de peristaltismo da musculatura. O gânglio mioentérico controla os movimentos peristálticos do intestino, e o submucoso, além de participar da inervação da camada muscular, regula a secreção gastrointestinal e o fluxo sanguíneo (Guyton & Hall, 1996; Hudson et al. 2000; Hens et al. 2002).

Pode-se concluir que, no intestino delgado de *D. aurita*, o número de células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina não variou entre as regiões iniciais, médias e finais do duodeno, jejuno e íleo, exceto as células argirófilas no jejuno, embora o número delas tenha sido diferente entre os segmentos intestinais. A população de células endócrinas foi menor distalmente, e dentre as células estudadas, as argirófilas foram as mais abundantes. As células IR à insulina não formaram ilhotas, encontrando-se isoladas nas vilosidades e criptas intestinais. Quanto aos gânglios nervosos submucosos e mioentéricos, nenhuma diferença foi observada entre os segmentos intestinais. As células endócrinas pesquisadas foram menores em número no intestino delgado de *D. aurita* quando comparadas a outras espécies de animais metatérios (Fonseca et al. 2002a) e eutérios (Ito et al. 1988; Bressan et al. 2004; Rodrigues, 2005). Diferenças na metodologia empregada, na região do tubo digestivo selecionado e no modelo animal utilizado podem revelar resultados variados.

Referências Bibliográficas

Bancroft, J. D., Stevens, A. 1996. Theory and practice of histological techniques. 4 ed. New York: Churchill Livingstone. 766 p.

Barbosa AJA, Castro LPF, Nogueira AMF (1984) A simple and economical modification of the Masson-Fontana method of staining melanin granules and enterochromaffin cells. *Stain Tech* 59, 193-196.

Barbosa AJA, Nogueira JC, Penna FJ, Polak JM (1987) Distribution of enteroglucagon- and polypeptide YY-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the white-belly opossum (*Didelphis albiventris*). *J Histochem* 88, 37-40.

Barbosa AJA, Nogueira JC, Fonseca CC (2006) Células endócrinas (APUD) do sistema digestivo do gambá *Didelphis albiventris*. In *Os Marsupiais do Brasil* (eds. Cáceres NC, Monteiro-Filho ELA), pp 89-98. Campo Grande: Ed. UFMS.

Bendayan M, Park I.-S (1991) Presence of extrapancreatic islets of Langerhans in the duodenal wall of the rat. *Diabetologia* 34, 604-606.

Bergeron JJM, Rachubinsky R, Searlem N, Borts D, Sikstrom R, Posner BI (1980) Polypeptide hormone receptors in vivo: demonstration of insulin binding to adrenal gland and gastrointestinal epithelium by quantitative radioautography. *J Histochem Cytochem* 28, 824-835.

Bressan MS, Fonseca CC, Menin E, Paula TAR (2004) Identificação e quantificação de gânglios nervosos, células argentafins, argirófilas e imuno-reativas à serotonina no ceco de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Rev Ceres* 51, 729-739.

Christensen, J. 1988. The forms of argyrophilic ganglion cells in the myenteric plexus throughout the gastrointestinal tract of the opossum. *Journal of the Autonomic Nervous System* 24: 251-260.

Clerc, N., Furness, J. B., Li, Z. S., Bornstein, J. C., Kunze, W. A. A. 1998. Morphological and immunohistochemical identification of neurons and their targets in the guinea-pig duodenum. *Neuroscience* 86(2): 679-694.

Coutinho HB (1985) Insulina de gambá. *Ciência Hoje* 3, 57-60.

Coutinho HB, Sewel HF, Coutinho VB (1985) Immunocytochemical demonstration of insulin in the mesonephros and metanephros of the brazilian opossum *Didelphis albiventris*. *Anat Anz Jena* 159, 97-103.

Coutinho HB, Sewel HF, Smith DI, Coutinho VB, Pinheiro PBN (1984) Demonstration of insulin in the pancreas of the *Didelphis albiventris* (Opossum) by immunocytochemical techniques. *Anat Anz Jena* 157, 167-175.

Dayal Y, Delellis RA, Wolf HJ (1987) Hiperplastic lesion of the gastrointestinal endocrine cells. *Am J Sur Path* 11, 87.

Devaskar SU, Singh BS, Carnaghi LR, Rajakumar PA, Giddings SJ (2002) Insulin II gene expression in rat central nervous system. *Regul Pept* 48, 55-63.

Dezonne M. F. M., Carreira, J. C. A., Franco, A. M. R. 1984. Estudo do desenvolvimento extra-uterino de *Didelphis marsupialis* e estabelecimento de uma tabela de classes etárias (Marsupialia, Didelphidae). Anais do XI Congresso Brasileiro de Zoologia. Belém, Pará.

Dyce KM, Sack WO, Wensing CJ (1997) *Tratado de Anatomia Veterinária*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 663 p.

Eliasson B, Björnsson E, Urbanavicius V, Andersson H, Fowelin J, Attvall S, Abrahamsson H, Smith U (1995) Hyperinsulinaemia impairs gastrointestinal motility and slows carbohydrate absorption. *Diabetologia* 38, 79-85.

Fonseca CC, Nogueira JC, Barbosa AJA (2002) Argyrophilic and Glucagon-Immunoreactive cells in the ileum and colon of the developing opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). *Cells Tissues Organs* 170, 20-33.

Fujita T (1973) Insulo-acinar portal system in the horse pancreas. *Arch Histol Jap* 35, 161-171.

Fujita T, Kobayashi S (1977) Structure and function of gut endocrine cells. *Int Rev Cytol* 6, 187-233.

Furness, J. B., Costa, M. 1980. Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* 5: 1-20.

Furness, J. B. 2000. Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System* 81: 87-96.

Gabella, G. 1987. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. *Neuroscience* 22 (2): 737-752.

Ganong WF (1998) *Fisiologia médica*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 578 p.

Grimelius L (1968) A silver nitrate for $\alpha 2$ cells in human pancreatic islets. *Acta Soc Medical Upsal* 73, 243-270.

Grimelius L, Wilander E (1980) Silver stains in the study of endocrine cells of the gut and pancreas. *Inv Cell Path* 3, 3-12.

Guyton, A. C., Hall, J. E. 1996. *Tratado de fisiologia médica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1014 p.

Hens, J., Gajda, M., Scheuermann, D. W., Adriaensen, D. 2002. The longitudinal smooth muscle layer of the pig small intestine is innervated by both myenteric and submucous neurons. *Histochemistry and Cell Biology* 117(6): 481-492.

Hudson, N. P. H., Pearson, G. T., Mayhew, I. G. 2000. Tissue culture of the enteric nervous system from Equine Ileum. *Veterinary Research Communications* 24: 299-307.

Ito H, Hashimoto Y, Kitagawa H, Kon Y, Kudo N (1988) Ontogeny of gastroenteropancreatic (GEP) endocrine cells in mouse and porcine embryos. *Jap J Vet Sci* 50, 99-110.

Kendzierski KS, Pansky B, Budd GC, Saffran M (2000) Evidence for biosynthesis of preproinsulin in gut of rat. *Endocrine* 13, 353-359.

Kierszenbaum A. L. 2004. Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à Patologia. Ed. Elsevier. Rio de Janeiro. 654p.

Krause WJ, Yamada J, Cutts H (1985) Quantitative distribution of enteroendocrine cells in the gastrointestinal tract of adult opossum, *Didelphis virginiana*. *J Anat* 140, 591-605.

Krause WJ, Yamada J, Cutts H (1989) Enteroendocrine cells in the developing opossum small intestine and colon. *J Anat* 162, 83-96.

Kunze, W. A. A., Furness, J. B. 1999. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annual Review of Physiology* 61: 117-142.

Leaming, D. B., Cauna, N. 1961. A qualitative and quantitative study of the myenteric plexus of the small intestine of the cat. *Journal of Anatomy* 95 (2): 160-168.

Meimaridis DG, Morse DE, Pansky B, Budd GC (2003) Insulin immunoreactivity in the fetal and neonatal rat retina. *Neur Letters* 118, 116-119.

Paiva MGS, Chaplin EL, Stobbe NS, Araújo FAP, Silva NRS (1992) Utilização de *Didelphis marsupialis* como animal de laboratório. *Pesq Agrop Bras* 27, 213-216.

Pillion DJ, Ganapathy V, Leilabach FH (1985) Identification of insulin receptors on the mucosal surface of colon epithelial cells. *J Biol Chem* 10, 5244-5247.

Polak JM, Bishop AE, Barbosa AJA, Bloom SR (1993) *Hormônios gastrointestinais*. In *Gastroenterologia Clínica* (Eds. Dani R, Castro LP), pp. 1446-1465. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara-Koogan.

Rindi G, Leiter AB, Kopin AS, Bordi C, Solcia E (2004) The “normal” endocrine cells of the gut changing concepts and new evidences. *An New York Acad Sci* 1014, 1-12.

Rodrigues SS (2005) Aspectos anátomo-histológicos e neuro-endócrinos do intestino delgado da capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766 (Mammalia, Rodentia, Hydrochaeridae). *Dissertação de Mestrado*. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa. 95 p.

Santos G. C., Zucoloto S. 1996. Células endócrinas gastrointestinais: breve histórico e principais métodos de identificação à microscopia óptica. *Arquivos de Gastroenterologia* 33: 36-44.

Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB (2004) Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* 145: 2639-2644.

Seino S, Steiner DF, Bell GI (1987) Sequence of a New World primate insulin having low biological potency and immunoreactivity. *Proc Nat Acad Sci* 84, 7423-7427.

Sjölund K, Sandén G, Hakanson R, Sundler F (1983) Endocrine cells in human intestine: an immunocytochemical study. *Gastroent* 85, 1120-1130.

Stahler MS, Pansky B, Budd GC (1988). Immunocytochemical demonstration of insulin-like immunoreactivity in the rat prostate gland. *Prostate* 13, 189-198.

Sternberger LA (1979) *Immunocytochemistry*. New York : Ed. John Wiley & Sons. 104 p.

Takagi C, Yamada J, Krause WJ, Kitamura N, Yamashita T (1990) An immunohistochemical study of endocrine cells in the proximal duodenum of eight marsupial species. *J Anat* 168, 49-56.

Yu J-H, Eng J, Rattan S, Yalow RS (1989) Opossum insulin, glucagons and pancreatic polypeptide: amino acid sequences. *Peptides* 10, 1195-1197.

MORFOMETRIA DAS CAMADAS DO INTESTINO DELGADO DE *Didelphis aurita* WIED-NEUWIED, 1826 (MAMMALIA, DIDELPHIDAE) E SUA RELAÇÃO COM AS CÉLULAS ENDÓCRINAS E GÂNGLIOS NERVOSOS. *
Freitas-Ribeiro, G. M., Fonseca, C. C., Matta, S. L. P., Neves, C. A, Rodrigues, S. S.

Resumo

As diferenças histológicas entre o duodeno, jejuno e íleo em relação às camadas mucosa, submucosa e muscular de gambás da espécie *Didelphis aurita* foram analisadas. Verificou-se também a existência de possível relação entre a morfologia intestinal, células endócrinas e gânglios nervosos. Dez espécimes de gambás da espécie *Didelphis aurita* foram capturados e divididos em dois grupos. Os animais foram distribuídos em duas classes, sendo a Classe 1 aqueles com peso entre 400 e 800 g (pós-púberes), e Classe 2 os animais acima de 800g (adultos). As técnicas de coloração utilizadas visaram a identificação e quantificação das células argirófilas (Grimelius), argentafins (Masson-Fontana modificada), imunorreativas à insulina (imunoperoxidase direta), das camadas da parede intestinal (HE) e dos gânglios nervosos submucosos e mioentéricos (HE). Observou-se que os gambás adultos possuem as camadas submucosas e musculares mais espessas do que os gambás pós-púberes ($P < 0,05$). Diferenças foram observadas na espessura das camadas intestinais entre o duodeno, jejuno e íleo dos animais de ambas as classes ($P < 0,05$). Contudo, entre as regiões inicial, média e final de cada segmento, a morfometria das camadas foi similar ($P > 0,05$). As diferenças nos números de células enteroendócrinas não foram acompanhadas de alterações nas espessuras das camadas mucosa, submucosa e muscular do intestino delgado de *D. aurita* ($P > 0,05$). Nenhuma correlação foi encontrada entre o número de gânglios nervosos submucosos e a espessura da camada submucosa, bem como entre o número de gânglios nervosos mioentéricos e a espessura da camada muscular ($P > 0,05$). Também, nenhuma relação quantitativa foi observada entre o número de gânglios nervosos submucosos e mioentéricos e o número de células enteroendócrinas, embora fisiologicamente os resultados aqui encontrados possam ser importantes.

Palavras-chave: histologia, intestino delgado, células endócrinas, gambás.

* Trabalho realizado com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

MORPHOMETRY OF THE SMALL INTESTINE LAYERS OF THE *Didelphis aurita* WIED-NEUWIED, 1826 (MAMMALIA, DIDELPHIDAE) AND YOUR RELATIONSHIP WITH AN ENDOCRINE CELLS AND NERVOUS GANGLIA.

Freitas-Ribeiro, G. M., Fonseca, C. C., Matta, S. L. P., Neves, C. A, Rodrigues, S. S.

Abstract

The histological differences between the duodenum, jejunum and ileum with regard to the mucous, sub-mucous and muscle layers of the big-eared opossum *Didelphis aurita* were analyzed. A possible relationship among the morphological aspects, endocrine cells and nervous ganglia was also verified. Ten specimens of the big-eared opossum *Didelphis aurita* were captured and divided into two groups: Class 1 animals weighed between 400 and 800 g (post-puberty) and Class 2 animals weighed over 800 g (adults). Staining techniques identified and quantified argyrophilic cells (Grimelius), argentafin cells (Masson-Fontana modified) and insulin immuno-reactive cells (direct immunoperoxidase), to the mucous, sub-mucous and muscle layers (H-E) and to the myoenteric, sub-mucous ganglia (H-E). Adult opossums present thicker sub-mucous and muscles layers than those of post-puberty ones ($P < 0.05$). Although differences in the intestine thickness between the duodenum, jejunum and ileum of both classes ($P < 0.05$) were also reported, layer morphometry between the animals' initial, middle and distal regions of each segment was similar ($P > 0.05$). None correlation was verified between the number of entero-endocrinal cells and the thickness of the small intestine layers of *D. aurita* ($P > 0.05$). None correlation was also observed between the number of sub-mucous nervous ganglia and thickness of the sub-mucous layer, as well myoenteric nervous ganglia and thickness muscle layer ($P > 0,05$). The number of the myoenteric and submucous ganglia, as well as enteroendocrine cells was not correlated, although in the physiological level, the results may be important.

Key-words: Histology, small intestine, endocrine cells, opossum.

Introdução

Existem aproximadamente 75 espécies de didelfídeos nas Américas (Kimble, 1997), distribuídos do Sul do Canadá à Argentina. Dentre estes, o gambá destaca-se como um exemplo típico pertencente à subclasse Theria, infra-classe Metatheria e ordem Marsupialia. Os marsupiais apresentam como característica diagnóstica a presença do marsúpio, estrutura similar a uma prega da pele, responsável pela formação de uma bolsa que contém as glândulas mamárias, onde os filhotes são alimentados após o nascimento (Kimble, 1997). No Brasil, existem gambás pertencentes a três espécies do gênero *Didelphis*, sendo elas *Didelphis aurita*, *Didelphis marsupialis* e *Didelphis albiventris* (Eisenberg & Redford, 1999).

As espécies da família Didelphidae são principalmente onívoras, com uma dieta rica em frutas, invertebrados e pequenos vertebrados (Santori et al. 1995). Um dos indicadores do hábito alimentar desta família são o tamanho e a forma do intestino, onde dimensões maiores deste órgão representam dieta mais herbívora, e dimensões menores com uma dieta mais carnívora (Cáceres, 2005).

O aparelho digestório inclui o segmento cranial (inicial), relacionado com a apreensão, mastigação e transporte dos alimentos, e os segmentos intermediário e caudal (final), estes dois últimos relacionados com o transporte, digestão, absorção e excreção. O intestino delgado faz parte do segmento digestório intermediário, sendo dividido em três segmentos seqüenciais, sendo eles o duodeno, jejuno e íleo (Kierszenbaum, 2004). A função fisiológica primária do intestino delgado é a assimilação e digestão do alimento. Estes processos ocorrem como resultado de ações enzimáticas, respostas neurohumorais, motilidade, mecanismos de transporte e controle endócrino (Dyce et al. 1997; Ganong, 1998).

O controle endócrino da secreção, absorção e motilidade intestinal é realizado por células endócrinas dispersas ao longo do tubo digestivo e pâncreas (Fujita, 1973). Estas células podem ser classificadas em argirófilas ou argentafins pela capacidade de reter e reduzir sais de prata, em células produtoras de hormônios (insulina, secretina, somatostatina, dentre outras), baseado principalmente nas características e conteúdo de seus grânulos secretores e em células do tipo aberto e fechado, de acordo com a comunicação apical com o lúmen (Grimelius & Wilander, 1980; Sjölund et al. 1983; Solcia et al. 1976; Dayal et al. 1987; Polak et al. 1993; Santos & Zucoloto, 1996).

Diferenças histológicas são observadas nas camadas mucosa, submucosa e muscular dos três segmentos do intestino delgado (Kierszenbaum, 2004; Junqueira &

Carneiro, 2004; Telser et al. 2007). Assim, o presente trabalho teve por objetivo destacar estas diferenças através da análise morfométrica das camadas supracitadas no duodeno, jejuno e íleo de gambás da espécie *Didelphis aurita*, além de verificar possíveis variações entre as regiões inicial, média e final de cada segmento. Foi ainda realizada uma análise morfométrica das camadas do intestino delgado de acordo com o peso do animal. Adicionalmente, foram verificadas possíveis relações entre os componentes endócrinos e a morfologia intestinal, bem como entre os componentes nervosos ganglionares e a morfologia intestinal, o que fornecerá subsídios para estabelecimento de relações entre controle endócrino e nervoso e a morfologia intestinal, respectivamente. Dados morfométricos das camadas do intestino delgado foram então correlacionados com o número de células enteroendócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina, e com o número de gânglios nervosos submucosos e mioentéricos. Como a regulação dos eventos ligados à digestão é realizada pela ação integrada do sistema nervoso e endócrino, verificamos também se as células endócrinas e os gânglios nervosos estudados estão numericamente relacionados.

Material e Métodos

Armadilhas do tipo gancho foram utilizadas para a captura dos gambás. Entre janeiro e junho de 2007, foram capturados dez espécimes de gambás adultos da espécie *Didelphis aurita* machos e fêmeas, no município de Viçosa/MG. Os animais foram eutanasiados mediante o uso de anestésico geral (pentobarbital sódico), seguido da administração de cloreto de potássio. A coleta de animais foi autorizada pelo IBAMA (licença nº 10168-1) e os procedimentos experimentais envolvendo os animais seguiram as determinações da Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFV, sendo aprovado sob protocolo nº 56/2007.

Apesar da estimativa da idade oscilar em função da etapa de desenvolvimento, Dezone et al. (1984) estipulou seis classes de gambás *Didelphis marsupialis* de acordo com registros biométricos, alterações na pelagem e dentição obtidos de animais em cativeiro e campo. Neste trabalho não foi possível acompanhar as fases de desenvolvimento a partir de coletas periódicas; assim, para uniformizar os dados, os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o peso para a realização da morfometria das camadas intestinais. Foram considerados animais da classe 1 aqueles com peso entre 400 e 800 g (pós-púberes, n=5), e da classe 2 aqueles acima de 800 g (adultos, n=5). Como os resultados revelaram poucas diferenças significativas, foi utilizado apenas um grupo de animais (n=10) para as análises de correlação entre as células endócrinas e a espessura das camadas intestinais, entre os gânglios nervosos e a espessura das camadas intestinais e para relacionar o número de gânglios nervosos com o número de células endócrinas.

Após a abertura e exposição da cavidade abdominal dos animais, foram identificados os segmentos do tubo digestivo, a saber: duodeno, que se estende da extremidade inicial do intestino delgado até o início do mesentério; jejuno, que vai do início do mesentério até o íleo, localizado na borda livre da prega ileocecal; íleo, que segue da prega ileocecal até a junção ileocecal (Dyce et al. 1997).

Foram coletados dois fragmentos de 1 cm² de cada uma das regiões (inicial, média e final) de cada segmento intestinal do animal. Estes foram fixados por 24 h em líquido de Bouin, para coloração H-E (Bancroft e Stevens, 1996), técnica de Grimelius (Grimelius, 1968) e técnica de imunoperoxidase direta (Sternberger, 1979), e em formol a 10% tamponado para técnica de Masson-Fontana modificada (Barbosa et al. 1984). Em seguida, os fragmentos foram desidratados, diafanizados, incluídos em parafina e seccionados na espessura de 5µm em micrótomo rotativo manual (modelo Leica,

RM2155). O intervalo entre os cortes foi de aproximadamente 50 μ m (10 cortes eram descartados). Após a remoção da parafina, as secções histológicas foram hidratadas e coradas. As técnicas de coloração utilizadas visaram a identificação e quantificação das células argirófilas (técnica de Grimelius), células argentafins (técnica de Masson-Fontana modificada), células imunorreativas à insulina (técnica da imunoperoxidase direta), camadas mucosa, submucosa e muscular (HE) e gânglios nervosos mioentéricos e submucosos (HE). Cortes de pâncreas de gambás foram utilizados como controle.

Os anticorpos monoclonais utilizados na técnica histoquímica foram produzidos pelo laboratório Bethyl, lote nº A90-117P-4, e como controle positivo foi utilizado pâncreas de gambás. O processamento do material foi realizado no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa.

As células argentafins, argirófilas e imunorreativas à insulina foram quantificadas em seis campos aleatórios do corte da mucosa, delimitados pela extensão da régua ocular micrométrica acoplada à ocular de 10X, equivalente a 300 μ m de extensão e objetiva de 40X. Para a quantificação dos gânglios nervosos submucosos e mioentéricos foi utilizada a objetiva de 10X, onde foram pesquisados cinco campos da camada submucosa e da muscular, sendo estes campos delimitados pela extensão da régua ocular micrométrica equivalente a 1000 μ m de extensão. Foi registrado o número médio das células endócrinas para cada mm² de área da camada mucosa. O mesmo procedimento foi realizado para o número médio de gânglios nervosos submucosos e mioentéricos por mm² de área das camadas submucosa e muscular, respectivamente. As áreas da mucosa, submucosa e muscular foram obtidas a partir da sua espessura média multiplicada pela extensão da régua micrométrica.

As descrições histológica e morfométrica dos segmentos do intestino delgado foram realizadas com o auxílio do programa Image Pro-Plus 4.0 (Media Cybernetics). As mensurações foram feitas em seis campos aleatórios de cada corte. As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio binocular Olympus BX 60 acoplado a câmera digital Qcolor.3 (Olympus), no Laboratório de Citogenética de Insetos do Departamento de Biologia Geral.

Para verificar diferenças na altura das vilosidades e espessura das camadas mucosa, submucosa e muscular entre os segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) e entre as regiões de cada segmento (inicial, média e final) foi empregado o teste de Kruskal-Wallis (*H*). Análises de correlação de Spearman foram realizadas para verificar possíveis correlações entre o número de células endócrinas e a morfometria das

camadas intestinais, e entre o número de gânglios nervosos submucosos e mioentéricos e a morfometria das respectivas camadas submucosas e musculares ($P < 0,05$). Para verificar possível relação entre o número de células endócrinas e os gânglios nervosos submucosos e mioentéricos foi aplicada análise de regressão ($P < 0,05$).

Resultados

As secções histológicas das camadas mucosa, submucosa e muscular do intestino delgado de *D. aurita* estão identificadas na figura 1.

A mucosa é constituída por vilosidades geralmente digitiformes, glândulas intestinais e muscular da mucosa. A camada submucosa formada por tecido conjuntivo frouxo apresentou um grande número de neurônios, assim como a camada muscular. A camada muscular esteve composta por duas camadas de músculo liso, uma circular interna e outra longitudinal externa.

As células mais freqüentes da túnica mucosa foram os enterócitos, as células caliciformes e as células endócrinas. Os enterócitos apresentaram uma condensação na região apical em função da borda estriada; as células caliciformes foram identificadas por seu citoplasma em imagem negativa e núcleo intensamente basófilo; as células endócrinas argirófilas apresentaram o citoplasma corado em negro pela técnica de Grimelius, as células argentafins em marrom escuro pela técnica de Masson Fontana modificada e as células imunorreativas à insulina em marrom claro pela técnica imunohistoquímica peroxidase anti-peroxidase. Todas as células endócrinas apareceram com a região infranuclear mais corada do que o restante do citoplasma e com o núcleo em imagem negativa.

Análises comparativas da morfometria das camadas do intestino delgado dos gambás da Classe 1 não revelaram diferenças entre os segmentos intestinais em relação aos parâmetros altura das vilosidades e espessura das camadas mucosa e submucosa (ver Tabs. 1, 2, 3, 4) ($P > 0,05$). Para esta classe, apenas a camada muscular foi mais espessa no íleo (160,61 μm) quando comparada ao jejuno (88,81 μm) ($H = 12,57$; $gl = 2$; $P = 0,0019$) (Tab. 4).

Nos gambás da Classe 2, a espessura da camada mucosa não variou entre os segmentos (Tab. 1) ($P > 0,05$). Todavia, a altura das vilosidades foi maior no jejuno (486,49 μm) quando comparada ao íleo (378,09 μm) ($H = 10,44$; $gl = 2$; $P = 0,0054$) (Tab. 2), e a camada muscular foi menor no jejuno em relação aos outros segmentos ($H = 12,19$; $gl = 2$; $P = 0,0022$) (Tab. 4).

Nenhuma diferença morfométrica foi observada entre as regiões inicial, média e final do duodeno, jejuno e íleo em relação aos parâmetros analisados (altura das vilosidades, e espessuras da mucosa, submucosa e muscular) dos gambás das Classes 1 e 2. As vilosidades ($H = 5,54$; $gl = 2$; $P = 0,06$) e a submucosa ($H = 5,84$; $gl = 2$; $P =$

0,05) dos animais da classe 1 foram os parâmetros que mais se aproximaram da significância.

Tabela 1: Espessuras da camada mucosa (média ± desvio-padrão) nos segmentos do intestino delgado e respectivas regiões de gambás *D. aurita* das Classes 1 (n=5) e 2 (n=5).

Regiões dos segmentos (*)	Espessura da mucosa Classe 1	Espessura da mucosa Classe 2	Segmento (*)	Espessura da mucosa Classe 1	Espessura da mucosa Classe 2
D _i	520,52±179,96 ^a	524,10±174,77 ^a	D	501,86±191,53 ^a	529,87±179,75 ^a
D _m	451,25±145,81 ^a	553,81±170,12 ^a			
D _f	533,81±234,23 ^a	511,70±196,73 ^a			
J _i	530,61±179,86 ^a	566,25±201,42 ^a	J	553,49±201,17 ^a	573,45±177,35 ^a
J _m	534,71±202,13 ^a	632,32±186,71 ^a			
J _f	595,15±219,76 ^a	521,55±122,42 ^a			
I _i	448,05±100,04 ^a	472,08±101,34 ^a	I	425,77±121,01 ^a	445,11±141,29 ^a
I _m	430,50±115,89 ^a	421,06±157,96 ^a			
I _f	398,76±142,17 ^a	442,09±157,65 ^a			

(*) **D**, **J** e **I** representam os segmentos duodeno, jejuno e íleo, respectivamente. Letras subscritas **i**, **m** e **f** representam, na ordem, regiões inicial, média e final de cada segmento. Valores seguidos por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

Ao serem comparadas as espessuras das camadas intestinais entre as duas classes de animais, todos os valores foram aparentemente maiores nos segmentos intestinais dos gambás da Classe 2, exceto a submucosa do duodeno (Tabs. 1, 2, 3 e 4). Entretanto, somente a espessura da camada muscular do duodeno e jejuno foi maior nos gambás da Classe 2 considerando um nível de significância de 5%. Notadamente, quando os níveis de significância de 7% e 10% foram estabelecidos, a espessura das camadas submucosas do jejuno e íleo foram, respectivamente, maiores nos animais da Classe 2.

O número médio de células endócrinas argirófilas (82,44%), argentafins (16,26%) e imunorreativas à insulina (1,30%) no intestino delgado de *D. aurita* estão discriminados na tabela 5. Variações no número destas células ao longo do intestino delgado não se mostraram correlacionadas com variações na espessura das camadas mucosa, submucosa e muscular ($P > 0,05$). As maiores correlações encontradas foram entre as células argirófilas e a espessura da camada submucosa ($r_s = 0,33$; $P = 0,06$) e entre as células IR insulina e a espessura da camada muscular ($r_s = 0,31$; $P = 0,08$). Ainda, nenhuma correlação foi observada entre a espessura da camada submucosa e o número de gânglios nervosos submucosos ($r_s = -0,23$; $P = 0,21$) e entre a espessura da camada muscular e o número de gânglios nervosos mioentéricos ($r_s = -0,11$; $P = 0,54$) (Tab. 6).

Foi verificada a ausência de relação entre o número de gânglios nervosos submucosos e mioentéricos e as células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina nos diferentes segmentos do intestino delgado de *D. aurita* ($P > 0,05$).

Tabela 2: Altura das vilosidades (média \pm desvio-padrão) nos segmentos do intestino delgado e respectivas regiões de gambás *D. aurita* das Classes 1 (n=5) e 2 (n=5).

Regiões dos segmentos (*)	Altura da vilosidade Classe 1	Altura da vilosidade Classe 2	Segmento (*)	Altura da vilosidade Classe 1	Altura da vilosidade Classe 2
D _i	424,52 \pm 163,01 ^a	396,51 \pm 164,76 ^a	D	414,62 \pm 135,11 ^a	438,30 \pm 104,74 ^{abc}
D _m	318,59 \pm 120,87 ^a	431,13 \pm 156,23 ^a			
D _f	500,74 \pm 234,72 ^a	391,59 \pm 169,63 ^a			
J _i	362,85 \pm 151,97 ^a	459,91 \pm 190,74 ^a	J	428,89 \pm 168,6 ^a	486,49 \pm 101,20 ^{ab}
J _m	445,47 \pm 174,81 ^a	514,16 \pm 173,41 ^a			
J _f	478,36 \pm 206,71 ^a	391,41 \pm 144,95 ^a			
I _i	381,23 \pm 145,12 ^a	334,03 \pm 98,07 ^a	I	330,96 \pm 95,89 ^a	378,09 \pm 67,14 ^c
I _m	317,37 \pm 103,14 ^a	340,51 \pm 155,91 ^a			
I _f	294,28 \pm 117,42 ^a	343,67 \pm 148,40 ^a			

(*) **D**, **J** e **I** representam os segmentos duodeno, jejuno e íleo, respectivamente. Letras subscritas **i**, **m** e **f** representam, na ordem, regiões inicial, média e final de cada segmento. Valores seguidos por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 3: Espessuras da camada submucosa (média \pm desvio-padrão) nos segmentos do intestino delgado e respectivas regiões de gambás *D. aurita* das Classes 1 (n=5) e 2 (n=5).

Regiões dos segmentos (*)	Espessura da submucosa Classe 1	Espessura da submucosa Classe 2	Segmento (*)	Espessura da submucosa Classe 1	Espessura da submucosa Classe 2
D _i	105,39 \pm 20,08 ^a	133,73 \pm 35,60 ^a	D	110,78 \pm 28,8 ^a	136,96 \pm 46,37 ^a
D _m	96,33 \pm 35,51 ^a	128,90 \pm 63,51 ^a			
D _f	68,40 \pm 17,62 ^a	18,25 \pm 44,22 ^a			
J _i	134,90 \pm 16,9 ^a	94,13 \pm 22,03 ^a	J	91,05 \pm 100,39 ^a	99,46 \pm 33,63 ^a
J _m	52,08 \pm 25,08 ^a	93,59 \pm 26,96 ^a			
J _f	86,16 \pm 41,51 ^a	110,66 \pm 50,10 ^a			
I _i	77,49 \pm 27,90 ^a	93,80 \pm 44,49 ^a	I	82,69 \pm 28,28 ^a	105,25 \pm 42,68 ^a
I _m	83,33 \pm 42,51 ^a	114,81 \pm 52,14 ^a			
I _f	87,25 \pm 12,39 ^a	107,16 \pm 37,23 ^a			

(*) **D**, **J** e **I** representam os segmentos duodeno, jejuno e íleo, respectivamente. Letras subscritas **i**, **m** e **f** representam, na ordem, regiões inicial, média e final de cada segmento. Valores seguidos por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 4: Espessuras da camada muscular (média ± desvio-padrão) nos segmentos do intestino delgado e respectivas regiões de gambás *D. aurita* das Classes 1 (n=5) e 2 (n=5).

Regiões dos segmentos (*)	Espessura da muscular Classe 1	Espessura da muscular Classe 2	Segmento (*)	Espessura da muscular Classe 1	Espessura da muscular Classe 2
D _i	104,65±34,43 ^a	201,74±61,33 ^a	D	137,91±118,15 ^{abc}	190,6±55,53 ^a
D _m	209,91±180,13 ^a	173,21±60,66 ^a			
D _f	99,17±32,06 ^a	197,06±52,61 ^a			
J _i	88,45±22,55 ^a	141,71±86,63 ^a	J	88,81± 32,15 ^{ab}	124,55±52,72 ^b
J _m	79,08±41,95 ^a	110,76±23,77 ^a			
J _f	98,92±33,23 ^a	121,19±32,22 ^a			
I _i	161,55±77,41 ^a	172,47±57,65 ^a	I	160,61± 54,85 ^c	177,59±50,03 ^a
I _m	146,03±40,21 ^a	196,70±66,07 ^a			
I _f	174,24±49,2 ^a	163,62±18,45 ^a			

(*) **D**, **J** e **I** representam os segmentos duodeno, jejuno e íleo, respectivamente. Letras subscritas **i**, **m** e **f** representam, na ordem, regiões inicial, média e final de cada segmento. Valores seguidos por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 5: Número de células endócrinas por mm² (média ± desvio-padrão) da camada mucosa dos segmentos de gambás *D. aurita* adultos e pós-púberes (n=10).

Células endócrinas	Duodeno	Jejuno	Íleo
Argirófilas	64,98±13,91 ^a	47,77±12,31 ^b	50,35±15,42 ^b
Argentafins	15,93±6,67 ^a	9,38±4,30 ^b	6,83±3,70 ^b
IR insulina	0,71±0,54 ^a	0,61±0,57 ^a	1,25±1,24 ^a

Médias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 6: Correlação entre o número de gânglios nervosos submucosos e a espessura da camada submucosa, e entre o número de gânglios nervosos mioentéricos e a espessura da camada muscular nos segmentos do intestino delgado de gambás *D. aurita* adultos e pós-púberes (n=10).

Segmentos (*)	Gânglios submucosos	Espessura submucosa	Gânglios mioentéricos	Espessura muscular
D	5,49±2,60	113,50±38,92	5,79±1,42	164,29±67,14
J	5,21±2,19	95,25±54,04	8,03±3,13	106,68±37,48
I	6,59±3,80	93,97±31,65	9,95±5,54	169,10±33,21

(*) **D**, **J** e **I** representam os segmentos duodeno, jejuno e íleo, respectivamente. Os valores representam a média seguida pelo desvio-padrão. Os grupos comparados não diferiram entre si ($P > 0,05$) pelo teste de correlação de Spearman.

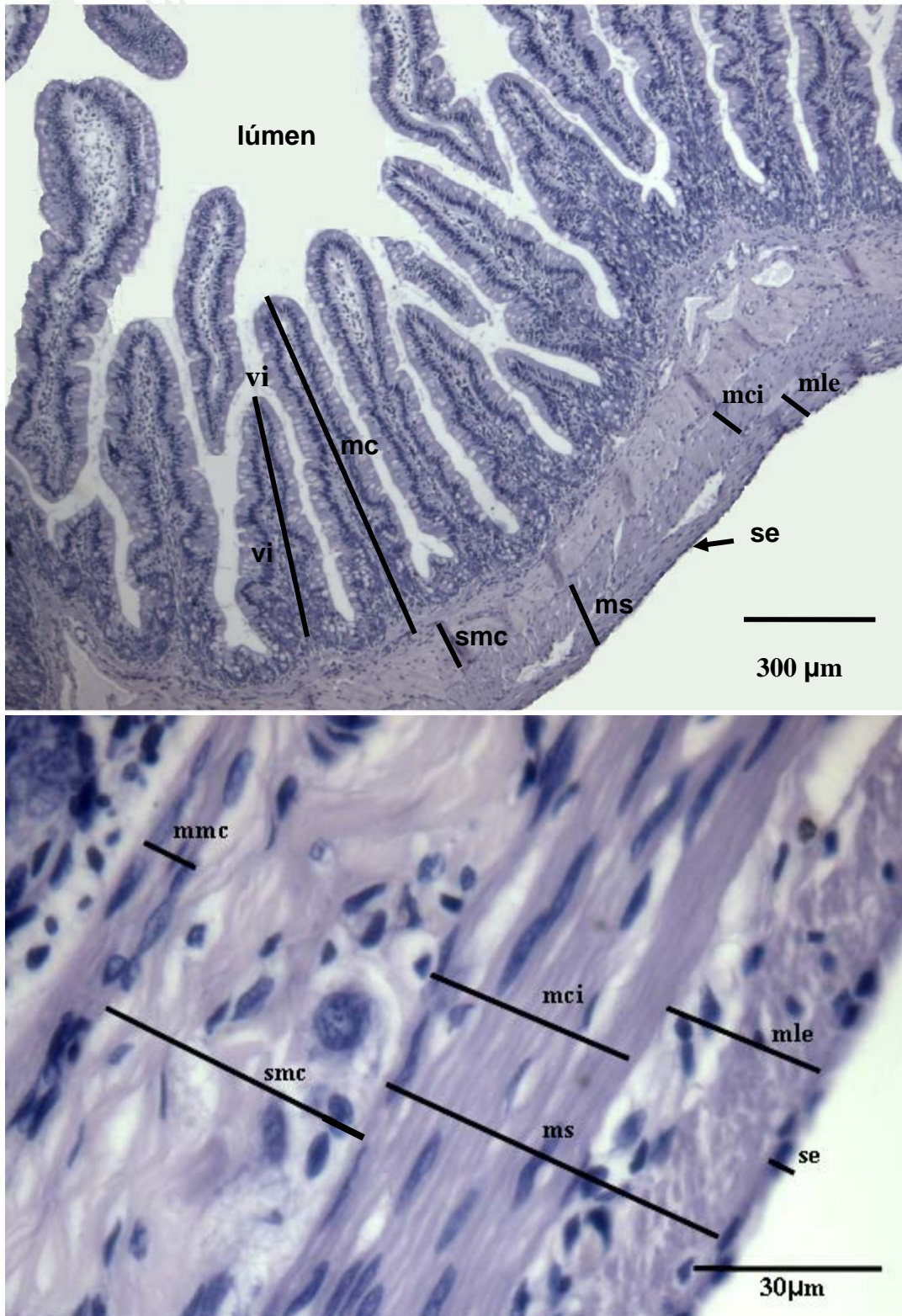


Figura 1: Parede do intestino delgado do gambá *D. aurita*. H-E. vi-vilosidade; mc-mucosa; mmc-muscular da mucosa; smc-submucosa; ms-muscular; mci-muscular circular interna; mle-muscular longitudinal externa; se-serosa.

Discussão

Santori et al. (2004) estabeleceram alguns itens alimentares para *D. aurita*, classificando-os como onívoros. Esta espécie apresenta um intestino grosso bastante desenvolvido, em concordância com seu hábito onívoro, e um longo intestino delgado, quando comparado a outras espécies de marsupiais, apesar de serem bastante eficientes na digestão de conteúdos ricos em proteínas e gorduras (Santori et al. 2004).

O duodeno foi o menor segmento do intestino delgado, cuja distinção histológica em relação aos demais destacou-se pela presença de glândulas duodenais (de Brünner) na submucosa. Estas glândulas não foram observadas na submucosa do jejuno e íleo. O íleo foi identificado pela presença de nódulos linfóides associados (placas de Peyer) que se estenderam por toda a lâmina própria e também pela submucosa. A distinção entre os segmentos intestinais de *D. aurita* foi similar ao descrito para roedores (Allogninouwa et al. 1996; Altmann & Leblond, 1970), porcos (Mitjans & Ferrer, 2004) e capivaras (Velásquez et al. 2003; Rodrigues, 2005).

A mucosa foi constituída por vilosidades, glândulas intestinais (criptas de Lieberkühn) e muscular da mucosa. Esta não apresentou variação significativa em sua espessura entre as regiões inicial, média e final de cada segmento do intestino, sendo constante até mesmo entre os segmentos, assim como descrito por Rodrigues (2005) para o intestino delgado de capivaras.

As vilosidades presentes na mucosa caracterizam-se como projeções alongadas, responsáveis por ampliar a sua área de superfície de absorção. Além das vilosidades, as pregas semi-circulares, as glândulas intestinais e as microvilosidades também aumentam a superfície total da mucosa (Kierszenbaum, 2004; Junqueira & Carneiro, 2004; Telser et al. 2007). Fatores de ampliação da vilosidade variam com a localização intestinal, desenvolvimento, tratamento experimental e doenças (Mayhew e Middleton, 1985). A maioria das vilosidades intestinais dos gambás apresentou-se digitiforme nos três segmentos, embora no duodeno algumas apresentassem forma de folha, com a base mais larga que o ápice. Em todos os segmentos foram observadas algumas vilosidades multicipitais, ou seja, com várias cabeças. Barry (1976) analisando a morfologia das vilosidades do intestino delgado de pequenos mamíferos herbívoros, carnívoros e onívoros também encontrou a forma de dedos afilados para a maioria das vilosidades. Rodrigues (2005), estudando aspectos anátomo-histológicos do intestino delgado da capivara *Hydrochoerus hydrochaeris*, encontrou na maioria dos segmentos vilosidades digitiformes, algumas piramidais, com base mais larga, estreitando-se em direção ao

ápice. Também foram encontradas vilosidades em forma de língua, com a base e a porção média pouco mais largas que o ápice, e em forma de morro, com a base e o ápice largos.

A morfologia das vilosidades intestinais de *D. aurita* concordaram com a descrição realizada por Barry (1976). Alguns aspectos anatômicos notáveis podem ser observados entre animais de diferentes categorias tróficas. Por exemplo, para carnívoros e onívoros (como os gambás), podem ser observadas vilosidades altas e com base fina, já que o alimento muitas vezes é transportado rapidamente, encontrando-se, em geral, melhor preparado para as atividades gástrica e enzimática. Por outro lado, os herbívoros possuem vilosidades robustas e mais largas, visando principalmente suportar alimento rico em celulose e com baixa ação digestiva (Barry, 1976).

Não foi observada diferença significativa na altura das vilosidades entre os segmentos proximais e distais do intestino delgado de *D. aurita*, apesar de os valores terem sido aparentemente menores no íleo das duas classes de gambás. Velásquez et al. (2003) também observaram que a altura das vilosidades do intestino delgado de capivaras adultas diminuem em direção ao íleo. Segundo Mayhew & Middleton (1985), fatores que aumentam a vilosidade, tanto no volume quanto na área de superfície, predominam no início do intestino delgado, e fatores que a reduzem são observados na porção final deste órgão. Estes fatores poderiam ser nutrientes no lúmen e hormônios.

Resultado semelhante a este estudo para a altura das vilosidades foi observado por Rodrigues (2005), onde a altura da vilosidade diminuiu aparentemente em sentido caudal, embora não tivesse encontrado diferenças estatísticas quanto a este parâmetro. A química intestinal contém fatores que influenciam o tamanho das vilosidades e mantém gradientes próximo-distais. Não somente nutrientes luminais podem influenciar na anatomia da mucosa, como, indiretamente, nervos e hormônios também podem contribuir para a arquitetura desta camada (Altmann & Leblond, 1970; Karasov & Diamond, 1983).

Além das diferenças na arquitetura externa, as vilosidades também exibem variações internamente. Segundo Abbas et al. (1989), variações na morfologia da vilosidade não devem ser confundidas com aquelas induzidas por patologias. Existem evidências fisiológicas de que as vilosidades não funcionam como uma unidade uniforme, principalmente em função de várias enzimas da borda estriada atuarem em diferentes níveis da vilosidade. Os autores citados anteriormente observaram um aumento ápico-basal na área estromal e no número de células estromais por secção do

jejuno de camundongos, confirmando que a estrutura interna da vilosidade muda gradualmente da base ao ápice.

Observou-se, nos cortes corados por H-E, que o epitélio da camada mucosa era constituído principalmente por células altas, os enterócitos, e células com citoplasma em imagem negativa, as caliciformes. Já pela impregnação por prata, células menos numerosas, as células enteroendócrinas, foram notadas. Apenas estas últimas foram quantificadas e correlacionadas com a espessura das camadas mucosa, submucosa e muscular. Nenhuma correlação foi observada entre o número de células enteroendócrinas e a espessura das camadas, embora uma premissa básica apontasse para o aumento deste número com o aumento da espessura, considerando a necessidade de um controle endócrino mais complexo naquela região. Este controle endócrino regula a secreção, absorção, motilidade e proliferação das células intestinais (Rindi et al. 2004).

A camada submucosa do intestino delgado de *D. aurita* é constituída por tecido conjuntivo frouxo, semelhante à camada submucosa do intestino delgado de capivaras (Rodrigues, 2005). Entretanto, Kierzenbaum (2004) descreveu a submucosa como um tecido conjuntivo denso irregular, com grandes vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos que se ramificam na mucosa e na camada muscular. Quanto à espessura desta camada, nenhuma variação foi verificada entre os segmentos intestinais nos animais das duas classes e entre animais da mesma classe. Segundo Penzes e Skala (1977), mudanças nas áreas das camadas intestinais podem aparecer com a idade como, por exemplo, o espessamento desta camada em decorrência de fibroses.

A submucosa também apresenta um grande número de neurônios, constituindo o plexo submucoso ou de Meissner (Furness & Costa, 1980). Neurônios deste plexo regulam a secreção de muco, água e NaCl pela mucosa intestinal (Hudson et al. 2000). Na submucosa do intestino dos gambás estes gânglios estavam evidentes, possuindo grandes corpos de neurônios, assim como relatado para capivaras (Velásquez et al. 2003; Rodrigues, 2005). Acreditava-se que os gânglios nervosos submucosos, de alguma forma, pudessem influenciar na arquitetura da camada submucosa. Contrariamente ao esperado, nenhuma relação foi encontrada entre o número destes gânglios e a espessura da camada submucosa no intestino delgado de *D. aurita*.

A camada muscular do intestino delgado de *D. aurita* foi semelhante ao relatado para outros mamíferos (Kierszenbaum, 2004; Junqueira & Carneiro, 2004; Telser et al. 2007), contendo duas camadas de músculo liso. A mais interna, organizada ao redor do lúmen do tubo digestivo, foi caracterizada como circular, e a mais externa esteve

disposta ao longo do tubo, caracterizada como longitudinal. Os movimentos peristálticos e de segmentação do intestino são realizados pela ação coordenada destas duas camadas. A camada circular interna constribe e dilata o intestino, e a longitudinal externa encurta ao se contrair (Kent & Miller, 1997). Neste trabalho não foi analisada a morfometria de cada camada individualmente, sendo apenas considerada a camada muscular como uma única unidade, ou seja, a camada externa e interna foram mensuradas juntas. Entre os segmentos intestinais dos indivíduos das duas classes, a camada muscular do jejuno mostrou-se como a de menor espessura. Rodrigues (2005) também observou uma menor espessura aparente desta camada no jejuno de capivaras, seguida do íleo e duodeno, apesar de estatisticamente esta diferença não ter sido confirmada. A camada muscular do duodeno e jejuno de *D. aurita* da Classe 2 (adultos) foi mais espessa quando comparada aos animais da Classe 1 (pós-púberes).

A camada muscular também apresentou um grande número de neurônios, constituindo os gânglios mioentéricos. O conjunto destes gânglios, localizados entre a camada muscular circular interna e a longitudinal externa, constitui o plexo mioentérico, conhecido como plexo de Auerbach (Furness & Costa, 1980). Esperava-se que estes gânglios, ao controlar os movimentos peristálticos do intestino através de peptídeos reguladores (Polak et al. 1993), pudessem estar relacionados quantitativamente com as células musculares; assim, um maior número destes gânglios em um dado segmento intestinal seria acompanhado por uma maior espessura da camada muscular naquele segmento. Entretanto, o teste de Wilcoxon não exibiu relação significativa entre o número de gânglios nervosos mioentéricos e a espessura da camada muscular. Por outro lado, Bressan et al. (2004) demonstraram que os gânglios mioentéricos do intestino de capivaras foram mais numerosos onde a túnica muscular apresentou-se estruturalmente mais desenvolvida, ou seja, na região de transição ileocecal e na ténia. Aparentemente, o número de gânglios mioentéricos foi maior no íleo quando comparado aos outros segmentos e, da mesma forma, a espessura da camada muscular foi aparentemente mais espessa também no íleo.

Polak et al. (1993) relataram algumas similaridades entre as células nervosas entéricas e as células endócrinas, tais como a presença de grânulos de secreção morfológicamente semelhantes, a presença de uma parte sensorial e transmissora que libera grânulos para a área sináptica e pólo vascular. Contudo, os peptídeos liberados pelas células nervosas não atendem integralmente aos critérios para conceituar hormônio, sendo então empregado o termo peptídeo-regulador. Grande parte destes peptídeos apresentam efeito parácrino, estimulando localmente células vizinhas, embora

possam interagir com receptores e transformar os sinais intracelulares em outros semelhantes aos produzidos por hormônios circulantes (Santos & Zucoloto, 1996). No intestino, os peptídeos reguladores podem ser encontrados nas células ganglionares, nas fibras nervosas e nas células endócrinas.

Estudos imunohistoquímicos e de biologia molecular tem revelado interações funcionais entre neurônios e células endócrinas (Delellis & Dayal, 1992). No entanto, o presente trabalho não demonstrou esta relação no campo morfométrico, pois não foi identificada relação quantitativa entre o número de gânglios nervosos submucosos e mioentéricos e o número de células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina no intestino delgado de *D. aurita*. Bressan (2004) também não encontrou relação entre o número de células endócrinas e os gânglios nervosos submucosos e mioentéricos do ceco de capivaras. Várias técnicas podem ser utilizadas na identificação das células endócrinas e ganglionares, incluindo as histoquímicas (Masson-Fontana, Grimelius, Servier-Munger, Hellerstrom-Hellman) e imunocitoquímicas utilizando marcadores humorais e não-humorais (proteínas de membrana, enzimas, glicoproteínas ácidas). Então, provavelmente outras técnicas devem ser empregadas para confirmar a interrelação quantitativa entre as células endócrinas e nervosas pesquisadas neste trabalho.

Não foi realizada a morfometria da camada serosa do intestino delgado de *D. aurita* em função da sua perda em alguns cortes. Nos cortes em que ela ficou preservada, foi possível observar que ela foi composta por tecido conjuntivo frouxo revestido por mesotélio, similar aos mamíferos eutérios (George et al. 1998).

Este trabalho demonstrou que gambás adultos possuem as camadas submucosas e musculares mais espessas que gambás pós-púberes. Diferenças foram notadas na espessura das camadas intestinais entre o duodeno, jejuno e íleo dos animais de ambas as classes. Entretanto, entre as regiões inicial, média e final dentro de cada segmento a morfometria das camadas foi similar. Nenhuma correlação existiu entre o número de células enteroendócrinas e a espessura das camadas do intestino delgado; entre a espessura da camada submucosa e o número de gânglios nervosos submucosos e entre a espessura da camada muscular e o número de gânglios nervosos mioentéricos. De modo semelhante, não foi verificada nenhuma relação numérica entre as células endócrinas e os gânglios nervosos submucosos e mioentéricos, embora fisiologicamente os resultados aqui encontrados possam ser importantes. Quanto à composição das camadas da parede intestinal de *D. aurita*, nenhuma particularidade foi encontrada para este grupo de animais quando comparado aos mamíferos placentários.

Referências Bibliográficas:

Abbas B, Hayes TL, Wilson DJ, Carr KE (1989) Internal structure of the intestinal villus: morphological and morphometric observations at different levels of the mouse villus. *J Anat* 162, 263-273.

Allogninouwa T, Agba KC, Agossou E, Kpodekon M (1996) Anatomical, histological and functional specificities of the digestive tract in the male Grasscutter (*Thryonomys swinderianus*, Temminck 1827). *Anat Histol Embryol* 25, 15-21.

Altmann GG, Leblond CP (1970) Factors influencing villus size in the small intestine of adult rats as revealed by transposition of intestinal segments. *Am J Anat* 127, 15-36.

Bancroft JD, Stevens A (1996) *Theory and practice of histological techniques*. 4 ed. New York: Churchill Livingstone. 766 p.

Barbosa AJA, Castro LPF, Nogueira AMF (1984) A simple and economical modification of the Masson-Fontana method of staining melanin granules and enterochromaffin cells. *Stain Tech* 59, 193-196.

Barry Jr (1976) Mucosal surface areas and villous morphology of the small intestine of small mammals: functional interpretation. *J Mammal* 57, 273-290.

Bressan MS, Fonseca CC, Menin E, Paula TAR (2004) Identificação e quantificação de gânglios nervosos, células argentafins, argirófilas e imunorreativas à serotonina no ceco de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Rev Ceres* 51, 729-739.

Cáceres NC (2005) Comparative lengths of digestive tracts of seven didelphid marsupials (Mammalia) in relation to diet. *Rev Bras Zool* 22, 181-185.

Dezonne M. F. M., Carreira, J. C. A., Franco, A. M. R. 1984b. Estudo do desenvolvimento extra-uterino de *Didelphis marsupialis* e estabelecimento de uma tabela de classes etárias (Marsupialia, Didelphidae). Anais do XI Congresso Brasileiro de Zoologia. Belém, Pará.

Dyce KM, Sack WO, Wensing CJ (1997) *Tratado de Anatomia Veterinária*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan.

Eisenberg JF, Redford KH (1999). *Mammals of the Neotropics: The Central Neotropics, Vol 3*. The University of Chicago Press. Chicago, USA. 609 p.

Furness JB, Costa M (1980) Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* 5, 1-20.

Ganong WF (1998) *Fisiologia médica*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 578 p.

George LL, Alves CER, Castro RRL (1998) *Histologia comparada*. 2ed. São Paulo: Ed. Roca. 286 p.

Grimelius L, Wilander E (1980) Silver stains in the study of endocrine cells of the gut and pancreas. *Invest Cell Path* 3, 3-12.

Grimelius L (1968) A silver nitrate for $\alpha 2$ cells in human pancreatic islets. *Acta Soc Medical Upsal* 73, 243-270.

Hudson NPH, Pearson GT, Mayhew IG (2000) Tissue culture of the enteric nervous system from Equine Ileum. *Vet Res Commun* 24, 299-307.

Junqueira LC, Carneiro J (2004) *Histologia básica*. 10ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan.

Karasov WH, Diamond JM (1983) Adaptive regulation of sugar and amino acid transport by vertebrate intestine. *Am J Physiol* 245, 443-462.

Kent GC, Miller L (1997) *Comparative anatomy of the vertebrates*. 8ed. Dubuque: The MacGraw-Hill Companies, Inc. 487p.

Kierszenbaum AL (2004) *Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à Patologia*. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier. 654p.

Kimble DP (1997) Didelphid behavior. *Neurosci Biobeh Rev* 21, 361-369.

Mayhew TM, Middleton C (1985) Crypts, villi and microvilli in the small intestine of the rat. A stereological study of their variability within and between animals. *J Anat* 141, 1-17.

Mitjans M, Ferrer R (2004) Morphometric study of the guinea pig small intestine during development. *Microsc Res Tech* 63, 206-214.

Pérez L, Skála I (1977) Changes in the mucosal surface areas of the small gut of rats of different ages. *J Anat* 124, 217-222.

Polak JM, Bishop AE, Barbosa AJA, Bloom SR (1993) Hormônios gastrointestinais. In *Gastroenterologia Clínica* (eds. Dani R, Castro LP), pp 1446-1465. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara-Koogan.

Rindi G, Leiter AB, Kopin AS, Bordi C, Solcia E (2004) The “normal” endocrine cells of the gut changing concepts and new evidences. *Ann New York Acad Sci* 1014: 1-12.

Rodrigues SS (2005) Aspectos anátomo-histológicos e neuro-endócrinos do intestino delgado da capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766 (Mammalia, Rodentia, Hydrochaeridae). *Dissertação de Mestrado*. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa. 95 p.

Santori RT, Astua de Moraes D, Cerqueira R (1995) Diet composition of *Metachirus nudicaudatus* and *Didelphis aurita* (Marsupialia, Didelphoidea) in southeastern Brazil. *Mammalia* 59, 511-516.

Santori RT, Astua de Moraes D, Cerqueira R (2004) Comparative gross morphology of the digestive tract in ten Didelphidae marsupial species. *Mammalia* 68, 27-36.

Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB (2004) Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* 145, 2639-2644.

Sternberger LA (1979) *Immunocytochemistry*. New York: Ed. John Wiley & Sons. 104 p.

Telser AG, Young JK, Baldwin KM (2007) *Histologia*. Rio de Janeiro: Editora Elsevier.

Velásquez JCC, Fonseca CC, Menin E, Paula TAR (2003) Estudo histológico do intestino delgado de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Arq. Ciên. Vet. Zool.* 6, 21-25.

Conclusões gerais e Perspectivas

Os movimentos peristálticos do intestino delgado não devem variar entre o duodeno, jejuno e íleo em função da similaridade no número de gânglios nervosos mioentéricos nestes diferentes segmentos. Não existiram variações significativas no número de células endócrinas entre as regiões iniciais, médias e finais de cada segmento, exceto no número de células argirófilas do jejuno. A população de células endócrinas foi maior na porção inicial do intestino, o que reflete a importância do duodeno nas funções digestivas e absorptivas. Quanto aos dados morfométricos, as vilosidades altas do epitélio intestinal dos gambás sugerem um rápido transporte de alimento rico em frutas e invertebrados, compatível com seu hábito onívoro. Entretanto, verifica-se a necessidade de estudos que contemplem a biometria intestinal de marsupiais, tais como comprimento, volume e morfologia intestinal com o intuito de melhor compreender a sua atividade digestiva. Inesperadamente, nenhuma correlação foi observada entre a morfometria das camadas intestinais, as células endócrinas e os gânglios nervosos. As informações aqui contidas servem de base para as pesquisas ultraestruturais das células imunorreativas à insulina no intestino delgado como, por exemplo, a caracterização morfológica dos seus grânulos de secreção, podendo também contribuir para estudos no campo das patologias digestivas, em especial, a *diabetes mellitus*.

Apêndice 1 Quantificação das células argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina e dos gânglios nervosos dos plexos submucosos e mioentéricos nos diferentes segmentos do intestino delgado do gambá *Didelphis aurita*.

1.1 Valores obtidos do teste de Kruskal-Wallis a partir de comparações do número de células endócrinas da camada mucosa dos três segmentos do intestino delgado de gambás da Classe 1 (400g \geq animal < 800g) (n = 5) e da Classe 2 (animal > 800g) (n = 5). O nível de significância adotado foi de 5%.

	Classe 1	Classe 2
Argirófilas	$H = 10,12; gl = 2; P = 0,0063$	$H = 12,5; gl = 2; P = 0,0001$
Argentafins	$H = 17,19; gl = 2; P = 0,0002$	$H = 7,76; gl = 2; P = 0,011$
IR à Insulina	$H = 8,89; gl = 2; P = 0,011$	$H = 3,02; gl = 2; P = 0,23$
Total de células endócrinas	$H = 16,98; gl = 2; P = 0,0002$	$H = 12,5; gl = 2; P = 0,0001$

1.2 Valores obtidos do teste de Wilcoxon quanto às comparações do número de células endócrinas entre os gambás Classe 1 (400g \geq animal < 800g) (n = 5) e Classe 2 (animal > 800g) (n = 5). O nível de significância adotado foi de 5%.

	Duodeno de gambás da classe 1 e classe 2	Jejuno de gambás da classe 1 e classe 2	Íleo de gambás da classe 1 e classe 2
Argirófilas	$t = 40, P = 0,25$	$t = 32, P = 0,11$	$t = 56, P = 0,22$
Argentafins	$t = 22, P = 0,03$	$t = 48, P = 0,49$	$t = 31, P = 0,09$
IR à Insulina	$t = 26, P = 0,05$	$t = 3, P = 0,001$	$t = 8, P = 0,003$
Total de células endócrinas	$t = 56, P = 0,82$	$t = 37, P = 0,19$	$t = 47, P = 0,46$

1.3 Análises comparativas do número de células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina entre as regiões inicial, média e final das camadas mucosas do duodeno, jejuno e íleo de gambás *D. aurita* acima de 400 g (adultos e pós-púberes, n = 10).

	Duodeno inicial, médio e final	Jejuno inicial, médio e final	Íleo inicial, médio e final
Argirófilas	$H = 1,0; gl = 2; P = 0,59$	$H = 6,82; gl = 2; P = 0,03$	$H = 1,40; gl = 2; P = 0,49$
Argentafins	$H = 0,96; gl = 2; P = 0,61$	$H = 3,83; gl = 2; P = 0,14$	$H = 1,89; gl = 2; P = 0,38$
IR à Insulina	$H = 2,04; gl = 2; P = 0,36$	$H = 0,23; gl = 2; P = 0,88$	$H = 0,95; gl = 2; P = 0,62$

O nível de significância adotado foi de 5%.

Apêndice 2 Morfometria das camadas do intestino delgado de *Didelphis aurita* e sua relação com as células endócrinas e gânglios nervosos.

2.1 Valores obtidos do teste de Kruskal-Wallis em relação ao cálculo das diferenças nas alturas da vilosidade e espessuras da mucosa, submucosa e muscular entre os segmentos do intestino delgado de gambás *D. aurita* das Classes 1 (n = 5) e 2 (n = 5).

	Classe 1	Classe 2
Vilosidade	$H = 4,60; gl = 2; P = 0,10$	$H = 10,44; gl = 2; P = 0,0054$
Mucosa	$H = 5,22; gl = 2; P = 0,07$	$H = 5,07; gl = 2; P = 0,07$
Submucosa	$H = 3,90; gl = 2; P = 0,14$	$H = 6,01; gl = 2; P = 0,04$
Muscular	$H = 12,57; gl = 2; P = 0,0019$	$H = 12,19; gl = 2; P = 0,0022$

O nível de significância adotado foi de 5%.

2.2 Valores obtidos do teste de Kruskal-Wallis levando-se em conta o cálculo das diferenças nas alturas da vilosidade e espessuras da mucosa, submucosa e muscular entre as regiões de cada segmento do intestino delgado de gambás *D. aurita* das Classes 1 (n = 5) e 2 (n = 5).

Classes		D_i, D_m e D_f	J_i, J_m e J_f	I_i, I_m e I_f
1	Vilosidade	$H = 5,46; gl = 2; P = 0,06$	$H = 1,46; gl = 2; P = 0,48$	$H = 1,46; gl = 2; P = 0,48$
	Mucosa	$H = 1,12; gl = 2; P = 0,56$	$H = 0,18; gl = 2; P = 0,91$	$H = 0,5; gl = 2; P = 0,77$
	Submucosa	$H = 5,84; gl = 2; P = 0,05$	$H = 1,82; gl = 2; P = 0,40$	$H = 1,5; gl = 2; P = 0,47$
	Muscular	$H = 2,18; gl = 2; P = 0,33$	$H = 1,22; gl = 2; P = 0,54$	$H = 0,62; gl = 2; P = 0,73$
2	Vilosidade	$H = 1,04; gl = 2; P = 0,59$	$H = 3,5; gl = 2; P = 0,17$	$H = 2,78; gl = 2; P = 0,24$
	Mucosa	$H = 0,26; gl = 2; P = 0,87$	$H = 2,06; gl = 2; P = 0,35$	$H = 0,18; gl = 2; P = 0,91$
	Submucosa	$H = 0,74; gl = 2; P = 0,69$	$H = 0,26; gl = 2; P = 0,87$	$H = 0,42; gl = 2; P = 0,81$
	Muscular	$H = 0,42; gl = 2; P = 0,81$	$H = 0,14; gl = 2; P = 0,93$	$H = 2,66; gl = 2; P = 0,26$

(*) **D**, **J** e **I** representam os segmentos duodeno, jejuno e íleo, respectivamente. Letras subscritas **i**, **m** e **f** representam, na ordem, regiões inicial, média e final de cada segmento. O nível de significância adotado foi de 5%.

2.3 Relação entre o número de células endócrinas e a espessura das camadas mucosa, submucosa e muscular do intestino delgado de gambás *D. aurita* adultos e pós-púberes (n = 10).

Camadas	Células Argirófilas	Células Argentafins	Células IR à Insulina
Mucosa	$rs = -0,01, P = 0,95$	$rs = 0,07, P = 0,69$	$rs = 0,06, P = 0,70$
Submucosa	$rs = 0,33, P = 0,06$	$rs = 0,17, P = 0,33$	$rs = 0,27, P = 0,12$
Muscular	$rs = 0,24, P = 0,18$	$rs = 0,11, P = 0,53$	$rs = 0,31, P = 0,08$

O nível de significância adotado foi de 5%.

2.4 Valores obtidos do teste de Kruskal-Wallis a partir de comparações do número de células endócrinas da camada mucosa dos três segmentos do intestino delgado de gambás *D. aurita* adultos e pós-púberes (n = 10).

Células	Resultados
Argirófilas	$H = 23,89$; $gl = 2$; $P = 0,001$
Argentafins	$H = 30,90$; $gl = 2$; $P = 0,001$
IR à Insulina	$H = 5,26$; $g l= 2$; $P = 0,07$

O nível de significância adotado foi de 5%.

2.5 Relação entre o número de células enteroendócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina e o número de gânglios nervosos submucosos e mioentéricos das camadas mucosas do duodeno, jejuno e íleo de gambás *D. aurita* acima de 400 g (adultos e pós- púberes, n = 10).

Gânglios	Células Argirófilas	Células Argentafins	Células IR à Insulina
Submucoso	$rs = 0,12$; $P = 0,51$	$rs = 0,20$; $P = 0,27$	$rs = 0,19$; $P = 0,29$
Mioentérico	$rs = -0,34$; $P = 0,06$	$rs = -0,16$; $P = 0,37$	$rs = -0,19$; $P = 0,30$

O nível de significância adotado foi de 5%.

Apêndice 3 Técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas.

1. Técnica de Grimellius

1.1 Vidraria utilizada:

- 2 pipetas 100 ml
- 3 Erlenmeyers 250 ml
- 2 cubas “mantegueiras”
- 3 cubas de coloração

1.2 Lavar vidrarias:

- Em água corrente por 1 hora
- Em águas destilada 3 vezes

1.3 Pesar os reagentes:

- AgNO₃ ----- 80 mg
- Hidroquinona ----- 1 g
- Sulfito de sódio anidro ----- 5 g

1.4 Preparar solução de prata

- AgNO₃ ----- 80 mg
- Tampão acetato 0,2M (pH 5,6) ----- 10 ml
- Água dd ----- 90 ml

1.5 Preparar banho-maria (60°C)

- Colocar 2 cubas com solução de prata (sendo uma para uso e outra de reserva)
- Colocar uma cuba vazia para solução reveladora
- Ligar o banho-maria

1.6 Preparar as lâminas

- Desparafinizar (xilol I e II por 15 min) e hidratar (álcoois absoluto I e II, 95%, 80%, 70% por 3 min cada e água dd por 10 min)

1.7 Incubar as lâminas na solução de AgNO₃ a 60°C por 3 horas (controlar ao microscópio após este período).

1.8 Preparo da solução reveladora:

- Esta deve ser preparada +/- 30 min antes de usar e transferida para a cuba vazia no banho-maria.
- Hidroquinona ----- 1 g
- Sulfito de sódio anidro ----- 5 g
- Água dd em vidro ----- 100 ml

1.9 Após 3 h de incubação na solução de prata, mergulhar as lâminas na solução reveladora por 1 min e observar ao microscópio. Se estiver como o esperado, colocar as lâminas na água destilada para interromper a reação.

1.10 Montagem: desidratar e passar nos xilol I e II rapidamente. Em seguida, montar com bálsamo do Canadá.

2. Técnica Masson-Fontana modificada

2.1 Lavar vidrarias por uma hora em água corrente

- 2 pipetas 100 ml
- 3 Erlenmeyers 200 ml
- 2 cubas “mantegueiras”
- 2 cubas de coloração
- 2 conta-gotas

2.2 Preparar solução de nitrato de prata (AgNO_3)

- Dissolver 500 mg de nitrato de prata em 100 ml de água destilada
- Separar 10 ml desta solução
- Adicionar NH_4OH (hidróxido de amônio) gota a gota até que o precipitado marrom desapareça e a solução torne-se ligeiramente turva
- Caso passe do ponto de viragem, ou seja, se a cor ligeiramente curva ficar incolor, adicionar gota a gota a solução de nitrato de prata separada até que a solução fique ligeiramente turva
- Filtrar a solução em papel filtro
- Levar a solução em banho-maria a 60°C

2.3 Iniciar a desparafinização e a hidratação

2.4 Colocar as lâminas na solução a 60°C por 60 min

2.5 Interromper a coloração em água dd

2.6 Observar ao microscópio. Se houver muita precipitação e/ou o “background” estiver escuro, fazer uso do tiosulfato de sódio anidro 5% (5g para 100 ml de água dd) por poucos segundos

2.7 Desidratar e passar rapidamente no xilol I e II; montar as lâminas em bálsamo

3. Peroxidase anti-peroxidase (PAP)

3.1 Soros utilizados:

- Soro normal de coelho (soro normal) → 1:50
- Soro monoclonal de camundongo anti-serotonina (soro primário) → 1:50
- Soro de coelho anti-camundongo, conjugado com o complexo PAP (soro secundário) → 1:100

3.2 Protocolo:

- Desparafinizar e hidratar os cortes
- Banho em tampão PBS (10%, pH 7,2-7,4) por 5 min
- Bloqueio em peroxidase endógena: banho em solução de H_2O_2 30V a 3,5% em PBS (3,5 ml H_2O_2 30V para 100 ml de PBS/ 10 ml H_2O_2 30V para 250 ml PBS) por 20 – 30 min
- Três banhos em PBS por 5 min cada
- Bloqueio dos sítios de ligação antigênica inespecíficos
 - Enxugar em torno dos cortes. Pingar o soro normal (1:50)
 - Incubar em câmara úmida por 20-30 min à temperatura ambiente
- Enxugar o excesso – pingar o soro primário (1:50)

- Incubar em câmara úmida a 4°C por 16 h ou à temperatura ambiente por 2 h
- Três banhos em PBS por 5 min cada
- Enxugar o excesso – pingar o soro secundário (1:100) por 30 min à temperatura ambiente
- Dois banhos em PBS por 5 min cada
- Revelação: 25 mg DAB em 100 ml de PBS
 - Pesar na hora ou usar solução concentrada congelada (25 mg/ml)
 - Homogeneizar
 - Adicionar 200 µL de H₂O₂ 40V
 - Incubar por 5 min
 - Controlar ao microscópio
- Colocar as lâminas em PBS para interromper a revelação
- Contracorar com hematoxilina diluída 5X por 1 min
- Lavar, desidratar e montar