

DANIEL RAUL SANTURIO BASILE

**MORFOLOGIA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E ASPECTOS
ULTRAESTRUTURAS DAS CÉLULAS IMUNORREATIVAS À INSULINA
NO INTESTINO DELGADO DO GAMBÁ *Didelphis aurita*
(WIED-NEUWIED, 1826) ADULTO**

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
2011

DANIEL RAUL SANTURIO BASILE

**MORFOLOGIA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E ASPECTOS
ULTRAESTRUTURAIS DAS CÉLULAS IMUNORREATIVAS À INSULINA
NO INTESTINO DELGADO DO GAMBÁ *Didelphis aurita*
(WIED-NEUWIED, 1826) ADULTO**

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: 15 de agosto de 2011.

Prof. Carlos Alberto Mourão Junior

Prof^a Ita de Oliveira e Silva

Prof^a Sirlene Souza Rodrigues Sartori

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta

Prof. Cláudio César Fonseca
(Orientador)

Senhor,
Faça que eu partilhe esta vitória com
meus pais, filhos, esposa e amigos;
que eu possa ser exemplo para cada
um deles. Que a todos dê minha
amizade, meu carinho, minha
solidariedade e minha atenção. Que
nosso amor floresça sempre como um
belo jardim...

*A adversidade desperta em nós
capacidades que, em circunstâncias
favoráveis, teriam ficado adormecidas.*
Horácio Quiroga (1878-1938)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

À nossa querida secretária Beth, sempre disposta em ajudar com as suas palavras: – “tudo vai dar certo”.

Ao meu orientador Professor Dr. Cláudio César Fonseca, por ter acreditado em mim, pelos ensinamentos e pela oportunidade concedida.

Aos Professores Clóvis Andrade Neves e Tânia Toledo de Oliveira, pela coorientação.

Aos Professores Sérgio Luís Pinto da Matta, Ita de Oliveira Silva e Carlos Alberto Mourão Júnior (Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF), por participarem da banca examinadora.

Às Professoras Priscila de Faria Pinto (UFJF) e Izabel Regina Santos Costa Maldonado, por terem aceitado ser suplentes.

À Professora Sirlene Souza Rodrigues Sartori, pelas sugestões, correções, pela disponibilidade e acolhida em todos os momentos.

Ao Professor José Eduardo Serrão, pelos materiais, pela amizade, pela ajuda na Microscopia Eletrônica, pela sua capacidade e pela sensibilidade nos momentos de maior dificuldade.

Ao técnico do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural do DBG/UFV Alex Behring, pela amizade, disposição em ajudar, competência e pelas brincadeiras nos momentos difíceis.

À Professora Sílvia Pompolo (UFV) e ao Departamento de Genética da UFJF, pela permissão do uso do fotomicroscópio.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, na pessoa de Cláudia Alencar Vanetti, pela valiosa contribuição.

Aos técnicos Adão, do Laboratório de Histopatologia; e Aécio, do Laboratório Clínico do DVT/UFV, pela contribuição.

Aos professores, estudantes de doutorado e meus amigos Rômulo, Kenner, Camilo, Madu, Vinicius, Daiane, Ana Teresa, Alípio, Lamara, Luciana, Karine, Rozimar, Rosana, Monteiro e Eliana, pela amizade, parceria e convivência.

Finalmente, aos meus pais, por terem me mostrado o caminho do estudo e feito de mim um indivíduo honesto e diferenciado.

BIOGRAFIA

DANIEL RAUL SANTURIO BASILE, filho de Raul Martin Santurio e Teresa Gloria Basile, nasceu em Montevideo, Uruguai. Fez o ensino fundamental no Colégio José Pedro Varela e o ensino médio no Colégio Militar José G. Artigas, na mesma cidade.

Em dezembro de 1992, graduou-se como Bacharel em Fisioterapia pela Universidade Gama Filho (UGF-RJ).

Em julho de 2002, concluiu o Mestrado em Meio Ambiente e Sustentabilidade pelo Centro Universitário de Caratinga, em Caratinga, Minas Gerais.

Ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa da tese em agosto de 2011.

Durante os últimos 10 anos, foi professor em diversas instituições particulares de ensino superior e Professor Substituto na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), onde atualmente desempenha suas funções na Faculdade de Fisioterapia.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS	4
2. OBJETIVOS.....	7
CAPÍTULO 1.....	8
ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS IMUNORREATIVAS À INSULINA NO INTESTINO DELGADO DO GAMBÁ <i>DIDELPHIS AURITA</i> (<i>WIED-NEUWIED</i> , 1826) ADULTO.....	8
RESUMO	8
ABSTRACT.....	10
IMMUNOHISTOCHEMISTRY ANALYSIS OF INSULINE IMMUNOREACTIVE CELLS IN THE SMALL INTESTINE OF OPOSSUMS <i>DIDELPHIS AURITA</i> (<i>WIED-NEUWIED</i> , 1826) ADULT	10
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1. Análise Estatística.....	18
3. RESULTADOS.....	19
4. DISCUSSÃO.....	22

	Página
5. CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 2.....	30
ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DOS GRÂNULOS SECRETORES DAS CÉLULAS IMUNORREATIVAS À INSULINA NO INTESTINO DELGADO DO GAMBÁ <i>DIDELPHIS AURITA</i> (WIED-NEUWIED, 1826) ADULTO	30
RESUMO	30
ABSTRACT.....	31
ULTRASTRUCTURAL STUDY OF SECRETOR GRANULES OF INSULINE IMMUNOREACTIVE CELLS IN THE SMALL INTESTINE OF OPOSSUM <i>DIDELPHIS AURITA</i> (WIED-NEUWIED, 1826) ADULT	31
1. INTRODUÇÃO.....	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1. Análise dos dados.....	38
3. RESULTADOS.....	39
4. DISCUSSÃO.....	42
5. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
CAPÍTULO 3.....	49
INSULINA PLASMÁTICA DO GAMBÁ <i>Didelphis aurita</i> (WIED- NEUWIED, 1826) ADULTO	49
RESUMO	49
ABSTRACT.....	50
PLASMATIC INSULIN OF OPOSSUM <i>Didelphis aurita</i> (WIED- NEUWIED, 1826) ADULT	50
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1. Análise Estatística.....	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4. CONCLUSÃO	58

	Página
REFERÊNCIAS	59
CAPÍTULO 4.....	61
ESTUDOS MORFOLÓGICOS E HISTOQUÍMICOS DO INTESTINO DELGADO DO GAMBÁ <i>Didelphis aurita</i> (WIED-NEUWIED, 1826) ADULTO, COM ÊNFASE NA DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS ENDÓCRINAS ARGIRÓFILAS E ARGENTAFINS	61
RESUMO	61
ABSTRACT.....	63
MORPHOLOGIC AND HISTOCHEMICAL STUDIES OF THE SMALL INTESTINE OF OPOSSUM <i>Didelphis aurita</i> (WIED- NEUWIED, 1826) ADULT, WIT ENPHASIS IN THE DISTRIBUTION OF ENDOCRINE ARGIROPHILE AND ARGENTAFINS CELLS.....	63
1. INTRODUÇÃO	65
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	67
2.1. Análise Estatística.....	70
3. RESULTADOS.....	72
4. DISCUSSÃO.....	78
5. CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS	81
3. CONCLUSÕES GERAIS	85

RESUMO

BASILE, Daniel Raul Santurio, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2011. **Morfologia, imuno-histoquímica e aspectos ultraestruturais das células imunorreativas à insulina no intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* (WIED-NEUWIED, 1826) adulto.** Orientador: Cláudio César Fonseca. Coorientadores: Clóvis Andrade Neves e Tânia Toledo de Oliveira.

Esta pesquisa teve como objetivo geral descrever os aspectos morfológicos, histoquímicos e imuno-histoquímicos do intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826) adulto, bem como as características ultraestruturais dos grânulos secretores de células imunorreativas à insulina nesse animal. A biogênese dos grânulos insulínicos e a sua classificação, bem como a atividade fisiológica em regiões produtoras de insulina, são áreas de investigação contínua no controle do diabetes e outras patologias. O material para estudo consistiu de sete exemplares de gambá *Didelphis aurita*, machos, com peso médio de $1,03 \pm 0,14$ kg. O número de células imunorreativas à insulina (IRI) por mm^2 no intestino delgado dos gambás *D. aurita* foi diferente em função do segmento analisado. De acordo com a comparação múltipla de médias ordenadas, o número de células IRI por mm^2 no duodeno e no jejuno foi maior do que no íleo ($p < 0,05$). O intestino delgado do gambá adulto *D. aurita*

apresentou diferenças na distribuição das células IRI, sendo elas difusas ao longo do epitélio intestinal e com maior concentração nas criptas e redução nas vilosidades. As células IRI caracterizaram-se pela presença de grânulos secretores, pela morfologia piramidal alongada e pela localização entre diferentes células. Adicionalmente, foi possível afirmar que apresentaram morfologia similar à das células beta do pâncreas, porém com diâmetro e volume granular maiores. Nos gambás *Didelphis aurita*, foram observados valores entre 2,7 e 3,5 $\mu\text{IU/mL}$ de insulina plasmática, valores esses inferiores aos verificados em outros mamíferos e humanos. Os resultados em relação à insulinemia, nesta espécie, sugerem a manutenção da homeostasia da glicose mediante a atividade secretora insulínica extrapancreática. Nos estudos morfológicos e histoquímicos das células argirófilas e argentafins no intestino delgado, foi demonstrado que as células argirófilas eram mais numerosas em relação às argentafins e que ambas se caracterizavam por terem conformação piramidal e núcleo ovoide, serem do tipo fechado ou aberto, apresentarem aspecto granular e serem mais frequentes nas glândulas intestinais. Foi quantificado maior número de células argirófilas por mm^2 do que de argentafins, e o íleo foi o segmento com menor número total de células endócrinas quantificadas. A altura e espessura das vilosidades intestinais, bem como a densidade da área de absorção do epitélio intestinal dos gambás *D. aurita* adultos, não variaram entre os segmentos. A espessura da camada muscular circular do jejuno foi maior do que a do íleo, e as demais comparações não apresentaram diferenças morfológicas significativas.

ABSTRACT

BASILE, Daniel Raul Santurio, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2011. **Morphology, immunohistochemistry and ultrastructural aspects of insuline immunoreactive cells in small intestine of the opossum *Didelphis aurita* (WIED-NEUWIED, 1826) adult.** Adviser: Claudio César Fonseca. Co-Advisers: Clóvis Andrade Neves and Tânia Toledo de Oliveira.

This research had as its objective to describe the morphologic, histochemical and immunohistochemical aspects of the small intestine of the opossum *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826) adult, as well as the ultrastructural characteristics of the secretory granules of insuline immunoreactive cells in this animal. The biogenesis of insulin granules and its classification, as well as physiological activity in insulin producer regions, are areas of continuous investigation in the control of diabetes and other pathologies. The material of study consisted of seven exemplars of opossum *Didelphis aurita*, males, with average weight of $1,03 \pm 0,14$ kg. The number of insulin immunoreactive cells (IRI) per mm^2 in the small intestine of opossum *D. aurita* was different due to the analyzed segment. According to the multiple comparison of ordered averages, the number of IRI cells per mm^2 in the duodenum and jejunum was larger than in the ileum ($p < 0,05$). The small intestine of the adult opossum *D. aurita* presented differences in the

distribution of IRI cells, being them difuses along the intestinal epithelium and with higher concentration in the crypts and reduction in the villus. The IRI cells are characterized by the presence of secretor granules, by stretchered pyramidal morphology and by the localization among different cells. Additionally, it was possible to affirm that they presented morphology similar to beta cells of pancreas, nevertheless with larger granular volume and diameter. In the opossum *Didelphis aurita*, were observed values between 2,7 and 2,5 5 μ IU/mL of plasmatic insuline, values which were inferior to the ones verified in other mammals and humans. The results related to insulinemia, in this specie, suggest the maintenance of homeostasis of glucose in face to extrapancreatic insulin secretor activity. In the morphologic and histochemical studies of the argirophile and argentafins in the small intestine, it was demonstrated that argirophile cells were more numerous related to argentafins and that both were characterized by having pyramidal conformation ovoid nucleus, being the type closed or open, presenting granular aspect and being more frequent in intestinal glands. It was quantified a greater number of argirophile cells per mm² than argentafins, and the ileum was the segment with the shortest number of quantified endocrinous cells. The height and thickness of intestinal villus, as well as the density of absorption area of the intestinal epithelium of adult opossums *D. aurita* did not vary among the segments. The thickness of the muscular layer of the jejunum was thicker than the ileum, and the other comparisons did not present significant morphological differences.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Pertencentes à Subclasse Theria, Infraclasse Metatheria e Ordem Marsupialia, os gambás da espécie *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826) fazem parte da família *Didelphidae*, que se encontra distribuída do Sul do Canadá ao Nordeste da Argentina (LUO *et al.*, 2003). Esse animal foi escolhido como objeto deste estudo visando dar suporte a pesquisas anteriores relacionadas à saúde humana (NOGUEIRA, 1989).

No Brasil, o gambá-de-orelha-preta, *Didelphis aurita*, e o gambá-de-orelha-branca, *D. albiventris*, são espécies de marsupiais didelfídeos extensamente distribuídas na Região Neotropical. Nessa região é possível observar pelo menos uma das duas espécies nos diversos biomas (EMMONS; FEER, 1990).

A espécie *D. aurita* possui um período gestacional de aproximadamente 12 dias, e os filhotes terminam seu desenvolvimento no marsúpio, período esse considerado como gestação externa, por cerca de 90 dias. Tal particularidade possibilita o estudo da ontogênese de diferentes sistemas e aspectos fisiológicos importantes da espécie, que se caracteriza por possuir boa capacidade termorreguladora, pouco volume de urina devido à reduzida ingestão de água, fácil perda de peso e boa adaptação em diferentes condições ambientais (SAMOTO *et al.*, 2006).

O gambá possui espectro alimentar importante, pois o seu tubo digestivo é tipicamente onívoro, contendo glândulas salivares grandes, com

exceção da parótida. O estômago do gambá apresenta-se como uma estrutura dilatada do tubo digestivo, cuja principal função é a liquefação do bolo alimentar e a digestão de determinados alimentos. A sua mucosa gástrica possui grande quantidade de glândulas fúndicas e células endócrinas gastrointestinais. Estas, juntamente com as células do pâncreas, contêm peptídeos específicos e aminas biogênicas que regulam a atividade digestiva (KRAUSE *et al.*, 1985; STEVENS; HUME, 1995; FONSECA *et al.*, 2002b).

Os estudos experimentais constituem passos essenciais para a aplicação dos ensaios clínicos no ser humano e dependem, sobretudo, da adequação experimental em animais. Vários autores têm realizado pesquisas com essas espécies (CLEBIS, 2006; ROMANO *et al.*, 2010; FREITAS-RIBEIRO, 2011), no intuito de estudar a morfofisiologia intestinal.

Diferentes estudos têm sido descritos sobre as células enteroendócrinas em mamíferos placentários. Entretanto, há poucas pesquisas em relação aos mamíferos marsupiais que apresentam placenta vitelínica transitória. Os marsupiais do gênero *Didelphis* reúnem várias vantagens para o estudo do aparelho digestório, entre as quais se destacam a sua origem ancestral, o curto período de gestação e dieta alimentar variada. Eles se apresentam como um bom modelo no estudo das células enteroendócrinas, tanto pela sua identificação quanto pela quantificação dos hormônios intestinais no animal adulto (KRAUSE *et al.*, 1985; BARBOSA *et al.*, 1987; TAKAGI *et al.*, 1990) e em desenvolvimento (KRAUSE *et al.*, 1989; FONSECA *et al.*, 2002b).

Segundo Rodrigues *et al.* (2005), os estudos morfológicos do aparelho digestório são importantes como ferramentas adicionais para os estudos fisiológicos, patológicos e filogenéticos. Particularmente, observa-se a importância de realizar estudos envolvendo as células enteroendócrinas, uma vez que o controle dos eventos secretores e motores envolvidos na digestão e absorção dos nutrientes dependem da ação do sistema endócrino.

Embora seja importante o estudo das células endócrinas difusamente presentes nos intestinos de mamíferos, ainda são poucas as pesquisas imuno-histoquímicas das células enteroendócrinas de gambás (BARBOSA *et*

al., 1984; KRAUSE *et al.*, 1985; KRAUSE *et al.*, 1989; TAKAGI *et al.*, 1990; FONSECA *et al.*, 2002a; BARBOSA *et al.*, 2006), principalmente as que abordam seus aspectos morfológicos no tubo digestivo de marsupiais (FONSECA *et al.*, 1998; TAKAGI *et al.*, 1990; FONSECA *et al.*, 2002a; CHRISTENSEN, 2003). Dessas, a maioria refere-se ao pâncreas e à mucosa gástrica (COUTINHO *et al.*, 1982; EDWIN, 1982; SOUZA *et al.*, 1982; COUTINHO *et al.*, 1984; KRAUSE *et al.*, 1986; EDWIN, 1987; BARBOSA *et al.*, 1987; KRAUSE *et al.*, 1989; FONSECA *et al.*, 2002b).

Nesse contexto, esta pesquisa foi delineada para descrever os aspectos morfológicos e histoquímicos e imuno-histoquímicos do intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826) adulto, bem como as características ultraestruturais dos grânulos secretores de células imunorreativas à insulina nesse animal

REFERÊNCIAS

BARBOSA, A. J. A.; CASTRO, L. P. F.; NOGUEIRA, A. M. F. A simple and economical modification of the Masson-Fontana method of staining melanin granules and enterochromaffin cells. **Stain Technology**, v. 59, p.193-196, 1984.

BARBOSA, A. J. A.; NOGUEIRA, J. C. Distribution of enteroglucagon - and polypeptide YY – Immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the white -belly opossum (*Didelphis albiventris*). **Histochemistry and Cell Biology**, v. 88, p. 37-40, 1987.

BARBOSA, A. J. A.; NOGUEIRA, J. C.; FONSECA, C. C. Células endócrinas (APUD) do sistema digestivo do gambá *Didelphis albiventris*. In: MONTEIRO-FILHO, E. L. A. (Eds.). **Os marsupiais do Brasil**. Cáceres, Campo Grande, MS: Ed. UFMS, 2006. p. 89-98.

CHRISTENSEN, J. The forms of argyrophilic ganglion cells in the myenteric plexus throughout the gastrointestinal tract of the opossum. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 24, n. 3, p. 251-260, 2003.

CLEBIS, N. K. **Influência da atividade física sobre o envelhecimento inicial do plexo mioentérico do jejuno em rato Wistar**. 2006. 96 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

COUTINHO, H. B.; BECK, F.; SANTIAGO, M. A. A.; PESSOA, R. G.; PINHEIRO, P. B. N.; COUTINHO, V. B. Some aspects of the development of the pancreas in the marsupial *Didelphis albiventris*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 42, p. 15-19, 1982.

COUTINHO, H. B.; SEWELL, H. F.; SMITH, D. I.; COUTINHO, V. B.; PINHEIRO, P. B. N. Demonstration of insulin in the pancreas of the *Didelphis albiventris* (opossum) by Immunocytochemical techniques. **Anatomischer Anzeiger**, v. 157, p. 167-175, 1984.

EDWIN, N. Quantitative estimation of islet tissue of pancreas in possums (*Trichosurus vulpecula*). **Journal of Zoology**, v. 197, p. 455-461, 1982.

EDWIN, N. Quantitative estimation of pancreatic polypeptide (PP) cells of islet tissue of pancreas in Australian mammals. **Journal of Zoology**, v. 213, p. 665-671, 1987.

EMMONS, L. H.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals a field guide**. Chicago: The University of Chicago Press, 1990.

FONSECA, C. C.; NOGUEIRA, J. C.; BARBOSA, A. J. A. Argrophilic and glucagon-immunoreactive cells in the ileum and colon of the developing opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). **Cells Tissues and Organs**, v. 170, p. 20-33, 2002a.

FONSECA, C. C.; NOGUEIRA, J. C.; BARBOSA, A. J. A. Diâmetro das ilhotas pancreáticas do gambá *Didelphis albiventris* em desenvolvimento intramarsupial. **Archives Veterinary Science**, v. 7, p. 129-134, 2002b.

FONSECA, C. C.; NOGUEIRA, J. C.; BARBOSA, A. J. A. Ultrastructural pattern of glucagon producing-cells in the gastric mucosa of the developing opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). **Annals of Anatomy**, v. 180, p. 477-480, 1998.

FREITAS-RIBEIRO, G. M.; FONSECA, C. C.; SARTORI, S., S.; LOURES-RIBEIRO, A.; NEVES, C. A. Quantificação das células argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina nos diferentes segmentos do intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). **Acta Scientiarum**, v. 33, n. 4, out./dez. 2011.

KRAUSE, W. J.; YAMADA, J.; CUTTS, H. Quantitative distribution of enteroendocrine cells in the gastrointestinal tract of adult opossum, *Didelphis virginiana*. **Journal of Anatomy**, v.140, p.591-605, 1985.

KRAUSE, W. J.; CUTTS, J. H.; CUTTS, J. H.; YAMADA, J. Immunohistochemical study of the developing endocrine pancreas of the opossum (*Didelphis virginiana*). **Acta Anatomica**, v. 135, p. 84-96, 1989.

KRAUSE, W. J.; YAMADA, J.; CUTTS, J. H. Enteroendocrine cells in the developing opossum stomach. **Journal of Anatomy**, v. 148, p. 47-56, 1986.

LUO, Z. X.; JI, Q.; WIBLE, J. R.; YUAN, C. An early cretaceous tribosphenic Mammal and Metatherian Evolution. **Science**, v. 302, p. 1934-1940, 2003.

NOGUEIRA, J. C. Reprodução do gambá *D. albiventris*. **Ciência Hoje**, n. 9, v. 53, p. 8-9, 1989.

RODRIGUES, S. S.; FONSECA, C. C.; NEVES, M. T. D. Células endócrinas do sistema gastroenteropancreático: conceitos, distribuição, secreções, ação e controle. **Arquivos de Ciência Veterinárias e Zoologia**, Unipar, Umuarama, v. 8, p. 171-180, 2005.

ROMANO, E. B.; NATALI, M. R. M.; LEITE, J. C.; CAMPOS, L. B.; BERARDI, E. J. Análise morfométrica dos neurônios nadh-diaforase positivos do jejuno de ratos Wistar em diferentes idades. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, p. 65-70, 2010.

SAMOTO, V. Y.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E.; PEREIRA, F. T. V.; LIMA, M. C.; CARVALHO, A. F. Opossum (*Didelphis* sp) mammary gland morphology associated to the marsupial model. **Biota Neotropica**, v. 6, n. 2. May/Aug. 2006.

SANTOS, G. C.; ZUCOLOTO, S. Células endócrinas gastrointestinais: breve histórico e principais métodos de identificação à microscopia óptica. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 33, p. 36-44, 1996.

STEVENS, C. E.; HUME, I. D. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. **Physical Review**, v. 78, p. 393-427, 1995.

TAKAGI, C.; YAMADA, J.; KRAUSE, W. J.; KITAMURA, N.; YAMASHITA, T. An immunohistochemical study of endocrine cells in the proximal duodenum of eight marsupial species. **Journal of Anatomy**, v. 168, p. 49-56, 1990.

2. OBJETIVOS

Esta pesquisa teve como objetivo geral descrever os aspectos morfológicos, histoquímicos e imuno-histoquímicos do intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826) adulto, bem como as características ultraestruturais dos grânulos secretores de células imunorreativas à insulina nesse animal.

Especificamente, pretendeu-se:

- a) Analisar e descrever a morfologia intestinal, bem como a distribuição de células enteroendócrinas argirófilas e argentafins nos três segmentos (duodeno, jejuno e íleo) do intestino delgado de gambás adultos *Didelphis aurita*.
- b) Quantificar as células imunorreativas à insulina no duodeno, jejuno e íleo entre os terços inicial e médio e entre os terços médio e final de cada um dos segmentos do intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* adulto.
- c) Obter dados ultraestruturais referentes às células imunorreativas à insulina no intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* adulto, atentando para a morfologia dos grânulos secretores de insulina.
- d) Estabelecer um valor de referência da insulina plasmática do gambá adulto *Didelphis aurita*.

CAPÍTULO 1

ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS IMUNORREATIVAS À INSULINA NO INTESTINO DELGADO DO GAMBÁ *DIDELPHIS AURITA* (*WIED-NEUWIED*, 1826) ADULTO

RESUMO

Na tentativa de preencher lacunas de informação quanto aos aspectos morfológicos das células imunorreativas à insulina no duodeno, jejuno e íleo, este trabalho foi conduzido com o objetivo de quantificar essas células entre os terços inicial e médio, e entre os terços médio e final de cada um dos segmentos do intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* adulto. O material para estudo consistiu de sete exemplares de gambás *Didelphis aurita*, machos, com peso médio de $1,03 \pm 0,14$ kg. O número de células imunorreativas à insulina (IRI) por mm^2 no intestino delgado dos gambás *D. aurita* foi diferente, em função do segmento analisado. De acordo com a comparação múltipla de médias ordenadas, o número de células IRI por mm^2 no duodeno e no jejuno foi maior que no íleo ($p < 0,05$), e o número das células IRI por mm^2 no duodeno e no jejuno não diferiu entre si ($p > 0,05$). O intestino delgado do gambá adulto *D. aurita* apresentou diferenças na distribuição das células IRI; sendo elas difusas ao longo do epitélio intestinal, com maior concentração nas criptas e redução nas vilosidades. As células

endócrinas caracterizaram-se pela presença de grânulos secretores, pela morfologia piramidal alongada e por sua localização entre diferentes células. Tais células provavelmente cumprem um papel na homeostasia da glicose durante a absorção de nutrientes.

Palavras-chave: Células imunorreativas, insulina, intestino delgado e gambá.

ABSTRACT

IMMUNOHISTOCHEMISTRY ANALYSIS OF INSULINE IMMUNOREACTIVE CELLS IN THE SMALL INTESTINE OF OPOSSUMS *DIDELPHIS AURITA* (WIED-NEUWIED, 1826) ADULT

Attempting to fulfill gaps of information concerning morphologic aspects of insulin immunoreactive cells in the duodenum, jejunum and ileum, this work was conducted with the aim to quantify these cells among the initial and medium thirds, and among the medium and final thirds of each one of the segments of small intestine of opossums *Didelphis aurita* adult. The material to study consisted of seven exemplars of opossums *Didelphis aurita*, males, with average weight of $1,03 \pm 0,14$ kg. The number of insulin immunoreactive cells (IRI) per mm^2 in the small intestine of opossums *D. aurita* was different, due to the analyzed segment. According to the multiple comparison of ordered averages, the number of IRI cells per mm^2 in the duodenum and jejunum was greater than in the ileum ($p < 0,05$), and the number of IRI cells per mm^2 in the duodenum and jejunum did not differ among themselves ($p > 0,05$). The small intestine of the adult opossum *D. aurita* presented differences in the distribution of IRI cells; being them diffuses along the intestinal epithelium, with higher concentration in the crypts and reduction in the villus. The endocrine cells are characterized by the presence of secretor granules, by the stretched pyramidal morphology and

by its localization among different cells. Such cells probably fulfill role in the homeostasis of glucose during the nutrient absorption.

Keywords: Immunoreactive cells, insulin, small intestine and opossum.

1. INTRODUÇÃO

Foram localizadas no estômago e nos intestinos dos vertebrados as células enteroendócrinas, que correspondem a 1% do total das que estão no epitélio intestinal, assim como representam a maior população das células produtoras de hormônios do corpo (REFHELD, 1998).

A coordenação das atividades dos vários componentes do sistema endócrino gastroenteropancreático está diretamente relacionada com as atividades de todas as células endócrinas dispersas ao longo do tubo digestivo e do pâncreas. Hormônios peptídicos controlam a secreção, absorção, motilidade e proliferação dessas células de maneira sincronizada. Alguns desses hormônios são chamados de “candidatos”, pelo fato de sua função hormonal ainda não ter sido totalmente estabelecida (RINDI *et al.*, 2004).

Drucker (2007) observou que a região gastrointestinal possui papel crucial no controle da absorção e ingestão de nutrientes e que as células enteroendócrinas desenvolvem importante mecanismo regulador, sintetizando hormônios e ativando e inibindo circuitos neurais. Os hormônios gastrointestinais são secretados em resposta a estímulos específicos através de um sistema difuso de células especializadas que podem ser encontradas esparsas na mucosa do tubo digestivo (SANTOS; ZUCOLOTO, 1996).

Quanto aos aspectos morfológicos, Volsky *et al.* (1999) observaram que as células enteroendócrinas se localizam predominantemente no terço basal das glândulas intestinais e das vilosidades, assim como possuem forma piramidal e um núcleo esférico que, além de se encontrar envolvido por grânulos secretores, está localizado na base da célula. Elas células apresentam imunorreatividade à serotonina, somatostatina, colecistoquinina, gastrina, secretina, glucagon, motilina, histamina, peptídeos inibitórios gástricos (KRAUSE *et al.*, 1989) ou à insulina (FREITAS-RIBEIRO *et al.*, 2011a).

O hormônio insulina é produzido principalmente pelo pâncreas, mas, em decorrência de estudos realizados com técnicas imuno-histoquímicas, foi detectado também na próstata (STAHLER *et al.*, 1988), no néfron (COUTINHO, 1985), no sistema nervoso central (DEVASKAR *et al.*, 2002), na retina (MEIMARIDIS *et al.*, 2003) e nos intestinos (COUTINHO *et al.*, 1984; BENDAYAN; PARK, 1991; KENDZIERSKI *et al.*, 2000).

Segundo Steiner *et al.* (1967), o estudo da origem e evolução dos hormônios, quanto à sua biossíntese e secreção, pode ser aplicado ao pâncreas. É possível presumir que, assim como em outros órgãos, no pâncreas proteínas sem função hormonal durante o processo evolutivo foram selecionadas para atuar como hormônios. Podem ser citados como exemplos os hormônios com características antigênicas, que também têm sido localizados em células de vertebrados ancestrais, similares, em muitos aspectos, às células de vertebrados mais evoluídos (FALKMER, 1968).

Segundo estudo de Kendzierski *et al.* (2000), não há dúvidas quanto à biossíntese de glucagon e de outros peptídeos pancreáticos no intestino. Entretanto, a confirmação da produção de insulina intestinal ainda necessita de estudos. Esses autores, utilizando soro anti-insulina de porco, verificaram imunorreatividade à insulina em células do epitélio do cólon e de células glandulares do intestino grosso de ratos. As células beta localizam-se também na mucosa intestinal e apresentam grânulos secretores especializados, estando envolvidas na síntese e estoque de pró-insulina (*Proinsulin-Likeprotein*), com possível atividade parácrina (STEINER *et al.*, 1967).

Embora os efeitos da insulina sobre o metabolismo dos carboidratos tenham sido o maior alvo de pesquisadores, sabe-se que a insulina influencia na velocidade de outros processos, independentemente de seu papel quanto à utilização da glicose. Segundo Kendzierski *et al.* (2000), a insulina intestinal possui funções parácrinas – ou mesmo autócrinas – de grande importância no controle da divisão celular, na secreção de peptídeos, na absorção e na motilidade intestinal. De acordo com Smith e Hill (1983), essa insulina foi identificada como capaz de reduzir a hiperglicemia de cães pancreatectomizados e do homem diabético. Contudo, a ação hipoglicemiante da insulina representa apenas um dos seus vários efeitos biológicos.

Sabe-se que a insulina é produzida principalmente no pâncreas, mas, segundo Kühl *et al.* (1976), suínos pancreatectomizados apresentavam níveis plasmáticos de insulina, fato esse que os levou a acreditar na presença de insulina em regiões extrapancreáticas. Segundo esses autores, isso pode ser associado a diferenças entre as espécies ou na sensibilidade e especificidade das técnicas experimentais.

Mediante estudos imuno-histoquímicos, foram identificadas células imunorreativas à insulina no intestino delgado de gambás *D. aurita* púberes e adultos, verificando-se maior concentração na região basal da mucosa intestinal (FREITAS-RIBEIRO *et al.*, 2011a; FREITAS-RIBEIRO *et al.*, 2011b). A insulina do gambá exibe considerável grau de conservação da sua estrutura primária, em comparação com a insulina de animais eutérios (YU *et al.*, 1989). De acordo com Seino *et al.* (1987), a insulina de marsupiais difere da insulina de porcos e de macacos em somente três aminoácidos.

No estudo do sistema endócrino, os gambás didelfídeos vêm-se destacando como bom 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.*, 2002). Além disso, como seu nascimento ocorre em estágio precoce de desenvolvimento, torna-se possível a realização de experimentos sem a exigência de procedimentos cirúrgicos (COUTINHO, 1985; PAIVA *et al.*, 1992).

Embora seja importante o estudo das células endócrinas difusamente presentes nos intestinos de mamíferos, ainda são poucas as pesquisas imuno-histoquímicas das células enteroendócrinas de gambás (BARBOSA *et al.*, 1984; KRAUSE *et al.*, 1985; KRAUSE *et al.*, 1989; TAKAGI *et al.*, 1990; FONSECA *et al.*, 2002a; BARBOSA *et al.*, 2006), principalmente as que abordem seus aspectos morfológicos no tubo digestivo de marsupiais (FONSECA *et al.*, 1998; TAKAGI *et al.*, 1990; FONSECA *et al.*, 2002a; CHRISTENSEN, 2003). Dessas, a maioria refere-se ao pâncreas e à mucosa gástrica (COUTINHO *et al.*, 1982; EDWIN, 1982; SOUZA *et al.*, 1982; COUTINHO *et al.*, 1984; KRAUSE *et al.*, 1986; EDWIN, 1987; BARBOSA *et al.*, 1987; KRAUSE *et al.*, 1989; FONSECA *et al.*, 2002b).

Na tentativa de preencher lacunas de informação quanto aos aspectos morfológicos das células imunorreativas à insulina no duodeno, jejuno e íleo, procurou-se identificar e quantificar essas células entre os terços inicial e médio e entre os terços médio e final de cada um dos segmentos do intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* adulto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O material para estudo consistiu de sete exemplares de gambás *Didelphis aurita*, machos, com peso médio de $1,03 \pm 0,14$ kg e comprimento *snout-rump* $39,0 \pm 3,62$ cm. Os animais foram considerados adultos por possuírem dentição completa, de acordo com a classificação de Macedo *et al.* (2006), e devido ao seu peso corporal (DEZONNE *et al.*, 1984).

Para sua captura foram usadas armadilhas tipo gancho, de 75x31x31 cm, utilizando como iscas banana e óleo de fígado de bacalhau. Os animais permaneceram em cativeiro por um período de 24 a 48 h, recebendo água, banana e ovo, dieta semelhante à da sua alimentação natural (CARVALHO *et al.*, 2005), até o dia da eutanásia. As capturas foram autorizadas pelo IBAMA (Licença nº. 19555-1) e realizadas entre julho de 2009 e outubro de 2010, em pequena região de mata situada no Museu de Zoologia João Moojen – Vila Gianetti, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram submetidos à avaliação da Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFV, sendo aprovado sob o Protocolo nº. 39/2009.

Após a captura, ainda no interior da armadilha, os animais foram anestesiados com Tiopental sódico a 30 mg/mL, na dose de 60 mg/kg, por via intraperitoneal. Depois de retirados da gaiola, foram feitas a pesagem e a

mensuração do comprimento *snout-rump*, ou ápice caudal, compreendido entre o ápice do focinho e a base da cauda.

Os animais, sob anestesia, tiveram a cavidade abdominal aberta na sua linha alba e os segmentos intestinais – duodeno, jejuno e íleo –, identificados e delimitados por amarraduras com barbantes. A eutanásia foi, então, feita por meio de administração intracardíaca de cloreto de potássio a 0,25%, em função do peso corporal. Os intestinos foram retirados e colocados sobre uma calha, o que possibilitou a sua mensuração real por paquímetro sem que houvesse distensão dos segmentos.

Para o estudo histológico foram coletados dois fragmentos de 1 cm de comprimento (um entre o terço inicial e o médio e outro entre o terço médio e o final) do duodeno, do jejuno e do íleo de cada animal, totalizando seis fragmentos. Estes foram fixados em formol 10% tamponado, desidratados em série etílica crescente, diafanizados, incluídos em parafina e seccionados com espessura de 4 μm em micrótomo rotativo manual (modelo Leica, RM2155).

O intervalo entre os cortes foi de aproximadamente 40 μm . Após a retirada da parafina, as secções histológicas foram hidratadas e coradas, segundo a técnica de Peroxidase Direta (STERNBERGER, 1979). Cortes de pâncreas de gambás foram utilizados como controle positivo nas mesmas condições.

Os anticorpos monoclonais utilizados na técnica imuno-histoquímica foram produzidos pelo Laboratório Bethyl, Lote nº. A90-117P-4, sendo o processamento do material realizado no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV.

As células endócrinas foram quantificadas em 10 campos aleatórios da túnica mucosa, utilizando ocular de 10X e objetiva de 40X. A contagem de células positivas foi estabelecida por uma unidade de área em μm^2 , utilizando-se o software Image Pro-plus. A densidade final foi convertida matematicamente em número de células por milímetro quadrado.

Os processamentos dos fragmentos avaliados por microscopia de luz foram realizados nos Laboratórios de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral e de Histopatologia Veterinária do Departamento de Veterinária.

Para a observação e documentação fotográfica das secções e quantificação de células imunorreativas à insulina (IRI), foi utilizado fotomicroscópio de luz binocular marca OLYMPUS BX 60, com câmara digital Qcolor.3 (Olympus) acoplada, no Laboratório de Citogenética de Insetos do Departamento de Biologia Geral da UFV.

2.1. Análise Estatística

Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade dos dados foram analisados pelo teste Shapiro-Wilk e pelo teste de Levene, respectivamente. Uma vez não atendidos esses pressupostos e considerando o tamanho amostral, optou-se pela utilização de testes não paramétricos para a análise das medidas de tendência central e da correlação entre as variáveis. Foi, então, utilizado o teste Wilcoxon – Mann-Whitney, para testar a diferença do número de células IRI por mm² nas regiões 1 (entre o terço inicial e o médio) e 2 (entre o terço médio e o final) de cada segmento do intestino (duodeno, jejuno e íleo). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para testar a diferença entre o número de células por mm² nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), seguido da comparação múltipla das médias dos valores ordenados.

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados a 5% de significância ($p < 0,05$), através do **Statistical Package for the Social Sciences** software 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os dados da análise estatística descritiva foram expressos como média \pm desvio-padrão.

3. RESULTADOS

Células imunorreativas à insulina (IRI) foram observadas difusas ao longo do epitélio intestinal com maior concentração nas criptas (Figura 1) e redução nas vilosidades. Essas células se caracterizam pela presença de grânulos secretores (mais bem distintos na Figura 1C) e pela morfologia piramidal a alongada.

Não foram observadas diferenças significativas no número de células IRI por mm² em função da região (terço inicial médio x terço médio final), dentro de cada segmento intestinal de gambás *D. aurita* adulto ($p > 0,05$) (Tabela 1).

O número de células IRI por mm² no intestino delgado dos gambás *D. aurita* foi diferente em função do segmento analisado – ($\chi^2_{GL=2} = 9,618$; $p = 0,008$; $n = 7$). De acordo com a comparação múltipla de médias ordenadas, o número de células IRI por mm² no duodeno e no jejuno foi maior do que no íleo ($p < 0,05$). O número de células IRI por mm² no duodeno e no jejuno não diferiu entre si ($p > 0,05$). (Tabela 2).

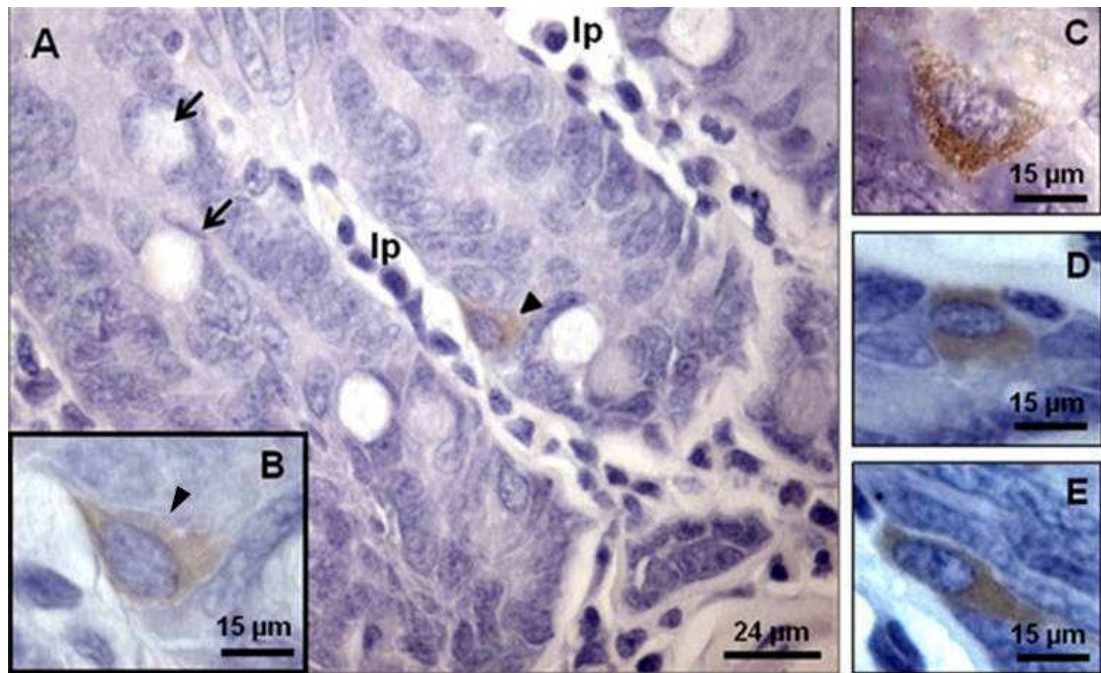


Figura 1 – Mucosa duodenal entre os terços inicial e médio do gambá *Didelphis aurita*. A – lp: lâmina própria; setas: células caliciformes; cabeça de seta: célula imunorreativa à insulina; B, C, D e E: detalhe de células endócrinas imunorreativas à insulina. Imunoperoxidase – Direta.

Tabela 1 – Número de células imunorreativas à insulina por mm² das regiões proximal e distal da camada mucosa do duodeno, jejuno e íleo de gambás *D. aurita* (n = 7)

Segmento Intestinal	Região	IR Insulina
Duodeno	Terço Inicial Médio	3,4 ± 2,1 ^a
	Terço Médio Final	3,4 ± 2,8 ^a
Jejuno	Terço Inicial Médio	2,0 ± 1,3 ^a
	Terço Médio Final	3,3 ± 1,4 ^a
Íleo	Terço Inicial Médio	1,4 ± 0,7 ^a
	Terço Médio Final	1,2 ± 0,9 ^a

Os dados são apresentados como média e desvio-padrão. ^aMédias seguidas por letras iguais na mesma coluna, dentro de cada segmento, não diferem entre si, pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney a 5%..

Tabela 2 – Número de células imunorreativas à insulina (IRI) por mm² em diferentes segmentos do intestino delgado de gambás *D. aurita* (n = 7)

Células Endócrinas	Duodeno	Jejuno	Íleo
IRI	3,4 ± 2,4 ^a	2,6 ± 1,4 ^a	1,3 ± 0,8 ^b

Os dados são apresentados como média e desvio-padrão. ^{a,b}Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%.

4. DISCUSSÃO

Os marsupiais utilizados são mamíferos de origem primitiva, considerados fósseis vivos por não terem sofrido significativas mudanças evolutivas ao longo dos anos (ANTUNES, 2005). Tal fato os coloca em uma posição de destaque em relação ao seu desenvolvimento, justificando, assim, a escolha do gambá *Didelphis aurita* para este experimento.

Esses animais possuem hábitos crepusculares e noturnos, alimentando-se de frutos, insetos, pequenos répteis e anfíbios, filhotes de aves, pequenos mamíferos e ovos (CARVALHO *et al.*, 2005). Neste estudo, foram preservados os hábitos alimentares dos gambás (água, banana e ovo), para evitar bruscas mudanças morfofuncionais no aparelho digestório. Carvalho *et al.* (2009) afirmaram que resultados experimentais podem ser influenciados pelas condições ambientais.

O padrão de distribuição das células enteroendócrinas apresentado pelos gambás *Didelphis aurita* foi coerente em relação ao encontrado por Takagi *et al.* (1990) em um estudo do intestino delgado de oito espécies de marsupiais e por Freitas-Ribeiro (2011a) no seu estudo com gambás *Didelphis aurita* púberes e adultos em segmentos do intestino delgado distintos dos pesquisados neste estudo.

As células imunorreativas à insulina (IRI) observadas neste trabalho caracterizavam-se por possuírem conformação de alongada a piramidal, serem do tipo fechado, apresentarem aspecto granular, serem de pouca

frequência e se localizarem preferencialmente nas glândulas intestinais (de Lieberkühn). Tais características são compartilhadas com as de Coutinho *et al.* (1984), Krause *et al.* (1986), Bendayan e Park (1991) e Freitas-Ribeiro (2011a).

Segundo Santos e Zucoloto (1996), uma das principais funções das células enteroendócrinas relaciona-se com o controle local dos tecidos e órgãos, regulando a secreção e a motilidade do aparelho digestório, o que reafirma a ideia de que as células IRI, no tubo digestivo, possam ter mecanismo parácrino. De acordo com Kendzierski *et al.* (2000), a atividade parácrina é importante no controle da divisão celular, na secreção de peptídeos e no controle da motilidade intestinal.

Segundo Krause *et al.* (1986), o intestino do gambá apresenta características semelhantes às do pâncreas, no que diz respeito à presença de células imunorreativas à insulina e células imunorreativas ao glucagon. No intestino delgado do gambá *D. aurita*, de fato, foi identificada insulina armazenada em grânulos citoplasmáticos; porém, seu mecanismo de liberação provavelmente seja parácrino, a fim de influenciar a função e o metabolismo de células contíguas, sendo desconhecida a sua atuação no controle da glicose.

Os peptídeos intestinais candidatos a hormônios, como a insulina, possuem grande variedade de efeitos sobre o tubo digestivo, mas faz-se necessário elucidar a sua participação na regulação da função gastrointestinal. Segundo Bendayan e Park (1991), as células produtoras de insulina detectadas entre a camada muscular da mucosa e as glândulas intestinais (de Lieberkühn), próximas à junção do ducto pancreático com o ducto colédoco, podem ter papel importante na homeostasia da glicose intersticial, particularmente durante a absorção de nutrientes.

5. CONCLUSÃO

O intestino delgado do gambá adulto *D. aurita* apresentou diferenças na distribuição das células IRI, sendo elas difusas ao longo do epitélio intestinal, com maior concentração nas criptas de Lieberkühn. Verificou-se que o número de células IRI por mm² no duodeno e no jejuno foi maior que no íleo. As células endócrinas IRI caracterizaram-se pela presença de grânulos secretores e pela morfologia piramidal a alongada.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, G. M. **Diversidade e potencial zoonótico de parasitas *Didelphis albiventris* Lund 1841 (Marsupialia: Didelphidae)**. 2005. 122 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2005.
- BARBOSA, A. J. A.; NOGUEIRA, J. C. Distribution of enteroglucagon- and polypeptide YY - immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the white-belly opossum (*Didelphis albiventris*). **Histochemistry and Cell Biology**, v. 88, p. 37-40, 1987.
- BARBOSA, A. J. A.; NOGUEIRA, J. C.; FONSECA, C. C. Células endócrinas (APUD) do sistema digestivo do gambá *Didelphis albiventris*. In: MONTEIRO-FILHO, E. L. A. (Eds.). **Os marsupiais do Brasil**. Cáceres, Campo Grande: Ed. UFMS, 2006. p. 89-98.
- BARBOSA, A. J. A.; CASTRO, L. P. F.; NOGUEIRA, A. M. F. A simple and economical modification of the Masson-Fontana method of staining melanin granules and enterochromaffin cells. **Stain Technology**, v. 59, p. 193-196, 1984.
- BENDAYAN, M.; PARK, I. S. Presence of extrapancreatic islets of Langerhans in the duodenal wall of the rat. **Diabetologia**, v. 34, p. 604-606, 1991.
- CARVALHO, F. M. V.; FERNANDEZ, F. A. S.; NESSIMIAN, J. L. Food habits of sympatric opossums coexisting in small Atlantic Forest fragments in Brazil. **Mammalian Biology**, v. 70, n. 6, p. 366-375, 2005.

CARVALHO, G. D.; MASSENO, A. P. B.; ZANINI, M. S.; ZANINI, S. F.; PORFÍRIO, L. D.; MACHADO, J. P.; MAUAD, H. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 1, p. 51-57, 2009.

COUTINHO, H. B. Insulina de gambá. **Ciência Hoje**, v. 3, n. 18, p. 57-60, 1985.

COUTINHO, H. B.; SEWEL, H. F.; COUTINHO, V. B. Immunocytochemical demonstration of insulin in the mesonephros and metanephros of the brazilian opossum *Didelphis albiventris*. **Anatomischer Anzeiger**, v.159, p. 97-103, 1985.

COUTINHO, H. B.; BECK, F.; SANTIAGO, M. A. A.; PESSOA, R. G.; PINHEIRO, P. B. N.; COUTINHO, V. B. Some aspects of the development of the pancreas in the marsupial *Didelphis albiventris*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 42, p. 15-19, 1982.

COUTINHO, H. B.; SEWELL, H. F.; SMITH, D. I.; COUTINHO, V. B.; PINHEIRO, P. B. N. Demonstration of insulin in the pancreas of the *Didelphis albiventris* (opossum) by Immunocytochemical techniques. **Anatomischer Anzeiger**, v. 157, p. 167-175, 1984.

CHRISTENSEN, J. The forms of argyrophilic ganglion cells in the myenteric plexus throughout the gastrointestinal tract of the opossum. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 24, n. 3, p. 251-260, 2003.

DEVASKAR, S. U.; SINGH, B. S.; CARNAGHI L, R.; RAJAKUMAR, P. A.; GIDDINGS, S. J. Insulin II gene expression in rat central nervous system. **Regulatory Peptides**, v. 48, p. 55-63, 2002.

DEZONNE, M. F. M.; CARREIRA, J. C. A.; FRANCO, A. M. R. Estudo do desenvolvimento extrauterino de *Didelphis marsupialis* e estabelecimento de uma tabela de classe etária. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 11., 1994, Belém. **Resumos...** Belém, 1984. p. 363-364.

DRUCKER, D. J. The role of gut hormones on glucose homeostasis. **Journal Clinical Investigation**, v. 1, n. 117, p. 24-32, 2007.

EDWIN, N. Quantitative estimation of islet tissue of pancreas in possums (*Trichosurus vulpecula*). **Journal of Zoology**, v.197, p. 455-461, 1982.

EDWIN, N. Quantitative estimation of pancreatic polypeptide (PP) cells of islet tissue of pancreas in Australian mammals. **Journal of Zoology**, v. 213, p. 665-671, 1987.

FALKMER, J. In: CONGRESS INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, EXCERTA MED. FOUND, 6., 1968, Amsterdam. **Proceedings...** Amsterdam, 1968.

FONSECA, C. C.; NOGUEIRA, J. C.; BARBOSA, A. J. A. Argrophilic and glucagon-immunoreactive cells in the ileum and colon of the developing opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). **Cells Tissues and Organs**, v. 170, p. 20-33, 2002a.

FONSECA, C. C.; NOGUEIRA, J. C.; BARBOSA, A. J. A. Diâmetro das ilhotas pancreáticas do gambá *Didelphis albiventris* em desenvolvimento intramarsupial. **Archives Veterinary Science**, v. 7, p. 129-134, 2002b.

FONSECA, C. C.; NOGUEIRA, J. C.; BARBOSA, A. J. A. Ultrastructural pattern of glucagon producing-cells in the gastric mucosa of the developing opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). **Annals of Anatomy**, v. 180, p. 477-480, 1998.

FREITAS-RIBEIRO, G. M.; FONSECA, C., C.; SARTORI, S., S.; LOURES-RIBEIRO, A.; NEVES, C. A. Quantificação das células argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina nos diferentes segmentos do intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). **Acta Scientiarum**, v. 33, n. 4, out./dez. 2011a.

FREITAS-RIBEIRO, G. M.; FONSECA, C. C.; SARTORI, S. S.; LOURES-RIBEIRO, A.; NEVES, C. A. Endocrine cells and nerve ganglia of the small intestine of the Opossum *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 2011b. In press.

ITO, H.; HASHIMOTO, Y.; KITAGAWA, H.; KON, Y.; KUDO, N. Ontogeny of gastroenteropancreatic (GEP) endocrine cells in mouse and porcine embryos. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 50, p. 99-110, 1988.

KENDZIERSKI, S. K.; PANSKY, B.; BUDD, G. C.; SAFFRAN, M. Evidence for biosynthesis of preproinsulin in gut of rat. **Endocrine**, v. 13, n. 3, p. 353-359, 2000.

KRAUSE, W. J.; YAMADA, J.; CUTTS, H. Quantitative distribution of enteroendocrine cells in the gastrointestinal tract of adult opossum, *Didelphis virginiana*. **Journal of Anatomy**, v.140, p.591-605, 1985.

KRAUSE, W. J.; CUTTS III. J. H.; CUTTS, J. H.; YAMADA, J. Immunohistochemical study of the developing endocrine pancreas of the opossum (*Didelphis virginiana*). **Acta Anatomica**, v.135, p. 84-96, 1989.

KRAUSE, W. J.; YAMADA, J.; CUTTS, J. H. Enteroendocrine cells in the developing opossum stomach. **Journal of Anatomy**, v.148, p. 47-56, 1986.

KÜHL, C.; JENSEN, S. L.; NIELSEN, O.V. Porcine gastric insulin. **Endocrinology**, v. 99, n. 6, p. 1667-1669, 1976.

MACEDO, J.; LORETTO, D.; VIEIRA, M.; CERQUEIRA, R. Classes de desenvolvimento em marsupiais: um método para animais vivos - Mastozoologia Neotropical. **Journal of Neotropical Mammalogy**, v.13, n. 1, p.133-136, 2006.

MEIMARIDIS, D. G.; MORSE, D. E.; PANSKY, B.; BUDD, G. C. Insulin immunoreactivity in the fetal and neonatal rat retina. **Neuroscience Letters**, v. 118, p. 116-119, 2003.

PAIVA, M. G. S.; CHAPLIN EL, STOBBE, N. S.; ARAÚJO, F. A. P.; SILVA, N. R. S. Utilização de *Didelphis marsupialis* como animal de laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 213-216, 1992.

REHFELD, J. F. The new biology of gastrointestinal hormones. **Physical Review**, n. 78, p. 1087-1108, 1998.

RINDI, G.; LEITER, A. B.; KOPIN, A. S.; BORDI, C.; SOLCIA, E. The normal endocrine cell the gut. Changing concepts and new evidences. **Annual New York Academy of Science**, n. 1014, p. 1-12, 2004.

SANTOS, G. C.; ZUCOLOTO, S. Células endócrinas gastrointestinais: breve histórico e principais métodos de identificação à microscopia óptica. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 33, p. 36-44, 1996.

SEINO, S.; STEINER, D. F.; BELL, G. I. Sequence of a new world primate insulin having low biological potency and immunoreactivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, p. 7423-7427, 1987.

SOUZA, A. M. F.; COUTINHO, H. B.; HUNTER, R. L.; CARVALHO JR., L. B.; PESSOA, R. G. Insulin-like proteins during the development of the pancreas in the Brazilian opossum *Didelphis albiventris*. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 72B, p. 149-151, 1982.

STAHLER, M. S.; PANSKY, B.; BUDD, G. C. Immunocytochemical demonstration of insulin-like immunoreactivity in the rat prostate gland. **The Prostate**, v. 13, p. 189-198, 1988.

STEINER, D.; SPIGELMAN, L.; ATEN, B. Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. **Science**, v. 157, n. 3789, p. 697-700, 1967.

STERNBERGER, L. A. **Immunocytochemistry**. New York, USA: Ed. John Wiley, Sons, 1979.

SMITH, E. L.; HILL, R. L. **Bioquímica de mamíferos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 271-342.

TAKAGI, C.; YAMADA, J.; KRAUSE, W. J.; KITAMURA, N.; YAMASHITA, T. An immunohistochemical study of endocrine cells in the proximal duodenum of eight marsupial species. **Journal of Anatomy**, v.168, p. 49-56, 1990.

VOLSKY, T.; MELLO, E. V. S. T.; MARÇAL-NATALI, M. R. Morfologia do epitélio intestinal de ratos adultos utilizando-se como meio de inclusão o Paraplast e o Glicometacrilato. **Arquivos Ciência Saúde**, Unipar, v. 3, n. 2, p. 111-115, 1999.

YU, J. H.; ENG, J.; RATTAN, S.; YALOW, R. S. Opossum insulin, glucagons and pancreatic polypeptide: amino acid sequences. **Peptides**, v. 10, p. 1195-1197, 1989.

CAPÍTULO 2

ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DOS GRÂNULOS SECRETORES DAS CÉLULAS IMUNORREATIVAS À INSULINA NO INTESTINO DELGADO DO GAMBÁ *DIDELPHIS AURITA* (WIED-NEUWIED, 1826) ADULTO

RESUMO

Para se obterem dados ultraestruturais indicativos de células imunorreativas à insulina no intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* adulto, é relevante a condução de estudos que visem ampliar dados da literatura a respeito desse órgão, observando a morfologia dos grânulos secretores de insulina. Foram investigados sete exemplares de gambás *Didelphis aurita*, machos, com peso médio de $1,03 \pm 0,14$ kg. Por meio das técnicas de desplastificação, imunocitoquímica e MET, foi possível caracterizar a morfologia granular das células imunorreativas à insulina (IRI) no intestino delgado do gambá *D. aurita* adulto. Os grânulos investigados apresentaram morfologia similar à das células beta do pâncreas, diâmetro e volume granular maiores nessas células se comparadas às do pâncreas e eletrodensidade diferente em relação às outras células enteroendócrinas. A biogênese dos grânulos insulínicos e a sua classificação, bem como a atividade fisiológica em regiões produtoras de insulina, são áreas de investigação contínua no controle do diabetes e outras patologias.

Palavras-chave: Dados ultraestruturais, insulina, intestino delgado, gambá.

ABSTRACT

ULTRASTRUCUTRAL STUDY OF SECRETOR GRANULES OF INSULINE IMMUNOREACTIVE CELLS IN THE SMALL INTESTINE OF OPOSSUM *DIDELPHIS AURITA* (WIED-NEUWIED, 1826) ADULT

In order to obtain indicative ultrastructural data of insulin immunoreactive cells in the small intestine of opossum *Didelphis aurita* adult, it is relevant that the studies conduction view to widen data of literature concerning this organ, observing the morphology of insulin secretor granules. Were investigated seven exemplars of opossums *Didephis aurita*, males, with average weight of $1,03 \pm 0,14$ kg. By means of dislamination, immunocitochemistry and MET, it was possible to characterize the granular morphology of insulin immunoreactive cells (IRI) in the small intestine of the opossum *D. aurita* adult. The investigated granules presented morphology similar to the beta cells of the pancreas, granular volume and diameter larger in these cells if compared to the pancreas ones and different eletrodensity related to other enteroencrine cells. The biogenesis of the insulin granules and its classification, as well as the physiologic activity in insulin producer regions, are areas of continuous investigation in the diabetes and other pathologies control.

Keywords: Ultrastructural data, insulin, small intestine, opossum.

1. INTRODUÇÃO

Diferentes estudos têm sido descritos sobre as células enteroendócrinas em mamíferos placentários, porém poucas pesquisas foram conduzidas focando os mamíferos marsupiais, que apresentam placenta vitelínica transitória. Os marsupiais do gênero *Didelphis* reúnem muitas vantagens para o estudo do aparelho digestório, entre as quais se destacam a sua origem ancestral, o curto período de gestação e a dieta alimentar variada. Eles se apresentam como um bom modelo no estudo das células enteroendócrinas, tanto por sua identificação quanto pela quantificação dos hormônios intestinais no animal adulto (KRAUSE *et al.*, 1985; BARBOSA *et al.*, 1987; TAKAGI *et al.*, 1990) e em desenvolvimento (KRAUSE *et al.*, 1989; FONSECA *et al.*, 2002b).

Rehfeld (1998) constatou que, tanto em número de células endócrinas quanto em número de tipos hormonais, o aparelho digestório supera qualquer outro órgão. Com o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas histoquímicas e imunocitoquímicas, foi possível identificar diferentes tipos de células endócrinas no aparelho digestório de diferentes espécies. Isso permitiu caracterizá-las conforme a natureza de seus grânulos, além de contribuir para a compreensão de sua participação em processos fisiológicos e patológicos (SANTOS; ZUCOLOTO, 1996).

Na mucosa gástrica de *D. albiventris* em desenvolvimento foi observado, pela técnica da imunoperoxidase, aumento no número de células

imunorreativas ao glucagon durante o período de permanência dos indivíduos no marsúpio, destacando-se, ainda, a diminuição delas no animal desmamado, bem como nos adultos. As células tinham formato piramidal e se localizavam na metade basal das glândulas gástricas, exceto em animais no marsúpio, onde foram observadas, principalmente, no terço superficial da glândula (FONSECA *et al.*, 1998).

Segundo esses mesmos autores, as células imunorreativas ao glucagon apresentaram numerosos grânulos citoplasmáticos eletrodensos, circulares e envoltos por membrana. A região central dos grânulos mostrou-se separada da membrana por um halo elétron-lúcido. As características ultraestruturais das células produtoras de glucagon na mucosa oxíntica do gambá *D. albiventris* são similares àquelas produtoras de glucagon das ilhotas pancreáticas, apesar de o diâmetro dos grânulos ter sido menor que o observado em cães, gatos e ratos (SOLCIA *et al.*, 1975; GRIMELIUS *et al.*, 1976).

Barbosa *et al.* (1987), estudando a distribuição de células imunorreativas ao enteroglucagon e polipeptídeo YY no tubo digestivo e pâncreas de *D. albiventris*, observaram a sua localização, principalmente, nas criptas dos intestinos delgado e grosso. Em todas as regiões do intestino, observou-se imunorreatividade positiva do glucagon e polipeptídeo YY, embora tenha sido verificado pequeno número dessas células. A maioria das células imunorreativas exibiu núcleo circular circundado por vários grânulos.

As células imunorreativas à insulina foram identificadas por Freitas-Ribeiro *et al.* (2011a) no intestino delgado do gambá *Didelphis aurita*. Coutinho *et al.* (1984) também registraram essas células na região proximal do intestino delgado imaturo de marsupiais lactentes, enquanto Kendzierski *et al.* (2000) evidenciaram a biossíntese de preproinsulina nas células das criptas intestinais epiteliais do cólon e em algumas células glandulares do estômago de ratos machos e fêmeas.

A insulina, produzida principalmente pelo pâncreas, também foi detectada por técnicas imuno-histoquímicas em órgãos de diferentes mamíferos. Assim, pode ser localizada na próstata (STAHLER *et al.*, 1988), no néfron (COUTINHO *et al.*, 1985), no cérebro (DEVASKAR *et al.*, 1993),

na retina (MEIMARIDIS *et al.*, 2003) e no intestino (STACHURA *et al.*, 1981; COUTINHO *et al.*, 1984; BENDAYAN; PARK, 1991; KENDZIERSKI *et al.*, 2000; FREITAS-RIBEIRO *et al.*, 2011)

Segundo Steiner *et al.* (1967), células beta localizadas na mucosa intestinal apresentam grânulos secretores especializados, envolvidos na síntese e armazenamento de proinsulina (proinsulin-like protein) com possível atividade parácrina.

Bendayan e Park (1991) identificaram ilhotas de Langerhans na parede intestinal de ratos, observando que as características morfológicas dos grânulos insulínicos são semelhantes às aquelas encontradas no pâncreas. Segundo Guest *et al.* (1991), há duas formas de grânulos de insulina: grânulos maduros com núcleo elétron-denso, que são visivelmente cristalinos em algumas espécies e apresentam membrana limitante que se ajusta frouxamente ao grânulo, dando a aparência de um halo espaçoso; e grânulos imaturos com pouco ou nenhum halo e conteúdo moderadamente elétron-denso. Foi demonstrado que os grânulos imaturos são o principal sítio, se não o único, da conversão da proinsulina em insulina.

Para a obtenção de dados ultraestruturais referentes às células imunorreativas à insulina no intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* adulto, são relevantes estudos, entre os quais a combinação de desplastificação e imunocitoquímica, que visem ampliar o número de informações a respeito desse órgão, atentando para a morfologia dos grânulos secretores de insulina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O material para estudo consistiu em três exemplares de gambás *Didelphis aurita*, machos, com peso médio de $1,03 \pm 0,14$ kg e comprimento *snout-rump* de $39,0 \pm 3,62$ cm. Os animais foram considerados adultos por possuírem dentição completa, segundo a classificação de Macedo *et al.* (2006), e devido ao seu peso, de acordo com Dezonne *et al.* (1984).

Para a sua captura foram usadas armadilhas tipo gancho, de 75x31x31 cm, tendo como iscas banana e óleo de fígado de bacalhau. Os animais permaneceram em cativeiro por um período de 24 a 48 h recebendo dieta composta por água, banana e ovo, à semelhança de seus hábitos alimentares (CARVALHO *et al.*, 2005), até o dia da eutanásia. As capturas foram autorizadas pelo IBAMA (Licença nº. 19555-1) e realizadas entre julho de 2009 e outubro de 2010, em pequena região de mata situada no Museu de Zoologia João Moojen – Vila Gianetti, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram submetidos à avaliação da Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFV, sendo aprovado sob o Protocolo nº. 39/2009, em 15/07/2009.

Após a captura, ainda no interior da armadilha, os animais foram anestesiados com Tiopental sódico a 30 mg/mL, na dose de 60 mg/kg, por via intraperitoneal. Depois de serem retirados da gaiola, os animais foram

pesados e medidos em comprimento *snout-rump*, ou ápice caudal médio, compreendido entre o ápice do focinho e a base da cauda.

Ainda anestesiados, a cavidade abdominal dos gambás foi aberta na sua linha alba e os segmentos intestinais – duodeno, jejuno e íleo –, identificados e delimitados por amarraduras com barbantes.

Para o estudo histológico e ultraestrutural, foram coletados dois fragmentos de 1 cm de comprimento, um entre o terço inicial e médio e outro entre o terço médio e distal do duodeno de três animais. O material foi fixado em glutaraldeído 5%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,3, pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%, no mesmo tampão-fosfato, desidratado em série crescente de alcoóis, pré-infiltrado em mistura de acetona P. A. com mistura de Epon-812, DDSA (DODECENYLSUCCINIC ABHYDRE) e NMA (NADIC METHYL ANHYDRIDE) (1:2), por uma noite. Seguiu-se a infiltração na mistura plena Epon-812, DDSA, NMA e DMP-30 (DIMETHYLAMINOMETHYLPHE-NOL), por 6 h, sendo feita a transferência dos fragmentos para cápsulas de inclusão, sendo polimerizados em estufa a 40 °C por 1 h e, a seguir, a 60 °C por 72 h.

Secções semifinais, com cerca de 400 nm de espessura, foram obtidas em ultramicrotomo Marca Reichert-Leica, com navalha de vidro, coradas com azul de toluidina 1% em borato de sódio 0,5% (BANCROFT; STEVENS, 1996), com a finalidade de identificação histológica da mucosa do duodeno.

Lâminas de vidro foram cobertas com gelatina 2% em formol 4% e permaneceram *overnight* a 37 °C. Secções sequenciais semifinas (cerca de 10) foram coletadas nessas lâminas e submetidas à técnica de desplastificação, segundo Lane e Europa (1965), com ligeiras modificações, a saber:

- As lâminas foram secas em platina aquecedora a 60 °C, por aproximadamente 30 s.
- Em seguida, foram instiladas gotas de solução de 13 g de hidróxido de sódio em lentilhas, dissolvidas em 100 mL de álcool absoluto P. A. sobre os cortes, por 18 min.

- Lavagem dos cortes com álcool absoluto P.A. em três banhos de 10 min cada.
- Hidratação dos cortes em série decrescente de álcoois 95%, 80%, 70% e em água destilada (3 min em cada).
- Procedeu-se à técnica imunocitoquímica de Peroxidase Direta (STERNBERGER, 1979) sobre os cortes desplastificados, para identificação das células produtoras de insulina, utilizando os anticorpos monoclonais produzidos pelo Laboratório Bethyl, Lote nº. A90-117P-4. O material foi processado no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

Após a identificação das células imunorreativas à insulina, foi delimitada no bloco a área que apresentou imunorreação, sendo o fragmento seccionado a partir desse ponto.

As secções ultrafinas foram obtidas com navalha de diamante e coletadas em telas de Ni/Cu de 300 “mesh”. Essas secções foram contrastadas com acetato de uranila (WATSON, 1958) e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). Subsequentemente, foram examinadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão, Marca *Zeiss*, modelo EM 109, para identificar e caracterizar ultraestruturalmente as mesmas células imunorreativas à insulina observadas nos fragmentos do duodeno submetidos à técnica de desplastificação.

Para observação e documentação fotográfica das secções e dos grânulos das células imunorreativas à insulina, foi utilizado o mesmo microscópio eletrônico de transmissão com câmara digital Q color.3 (Olympus) acoplada, no Laboratório do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV.

Nas eletromicrografias obtidas dos cortes ultrafinos de fragmentos de duodeno do gambá *D. aurita*, foi feito o estudo morfométrico dos grânulos secretores (SALA *et al.*, 1994). A partir de uma escala calibrada de um eixo maior (D) e um eixo menor (d) do grânulo, foram calculados:

- O diâmetro médio dos grânulos $M = (D \times d)^{1/2}$ (μm).
- A área de grânulos $A = \pi \times M^2/4$ (μm^2).
- O volume dos grânulos $V = \pi/6 \times M^3$ (μm^3).

Por fim, a contagem dos grânulos foi estabelecida por unidade de área em μm^2 , verificando-se a percentagem de grânulos maduros e imaturos em função da sua eletrodensidade. Toda a análise da imagem foi realizada no software *Image Pro-plus* 4.5.

2.1. Análise dos dados

Os dados foram expressos de forma descritiva e apresentados como valores percentuais, média e desvio-padrão (média \pm S.D.).

3. RESULTADOS

Células imunorreativas à insulina estão presentes na mucosa duodenal, em maior concentração nas criptas intestinais (de Lieberkühn). Elas se mostraram semelhantes na sua ultraestrutura, apresentando acúmulo de grânulos secretores maduros e imaturos e morfologia com aspecto piramidal, sendo do tipo fechado (Figura 1), uma vez que não estabelecem contato com o lúmen duodenal. Seu núcleo, localizado na região basal da célula, possui forma oval e apresenta grande quantidade de heterocromatina, distribuída de forma heterogênea (Figura 1ACE).

Os grânulos apresentaram formatos arredondados, de tamanhos variados, conteúdo central eletrodense de intenso a moderado, região periférica caracterizada por amplo halo eletrolúcido, majoritariamente distribuídos no citoplasma marginal e envolvidos por membrana plasmática (Figura 1BDF).

Quanto aos grânulos de secreção maduros, as medidas morfométricas indicam a área granular média de $0,54 \pm 0,18 \mu\text{m}^2$ e o volume granular médio de $1,09 \pm 0,46 \mu\text{m}^3$ (Tabela 1).

Os grânulos secretores maduros representaram 67% ($1,51 \pm 0,42 \text{ N}/\mu\text{m}^2$) do total, com um diâmetro médio de $0,82 \pm 0,13 \text{ nm}$. Assim, os grânulos imaturos corresponderam a 33% ($0,75 \pm 0,36 \text{ N}/\mu\text{m}^2$), tendo um diâmetro médio e $0,76 \pm 0,10 \text{ nm}$ (Tabela 1).

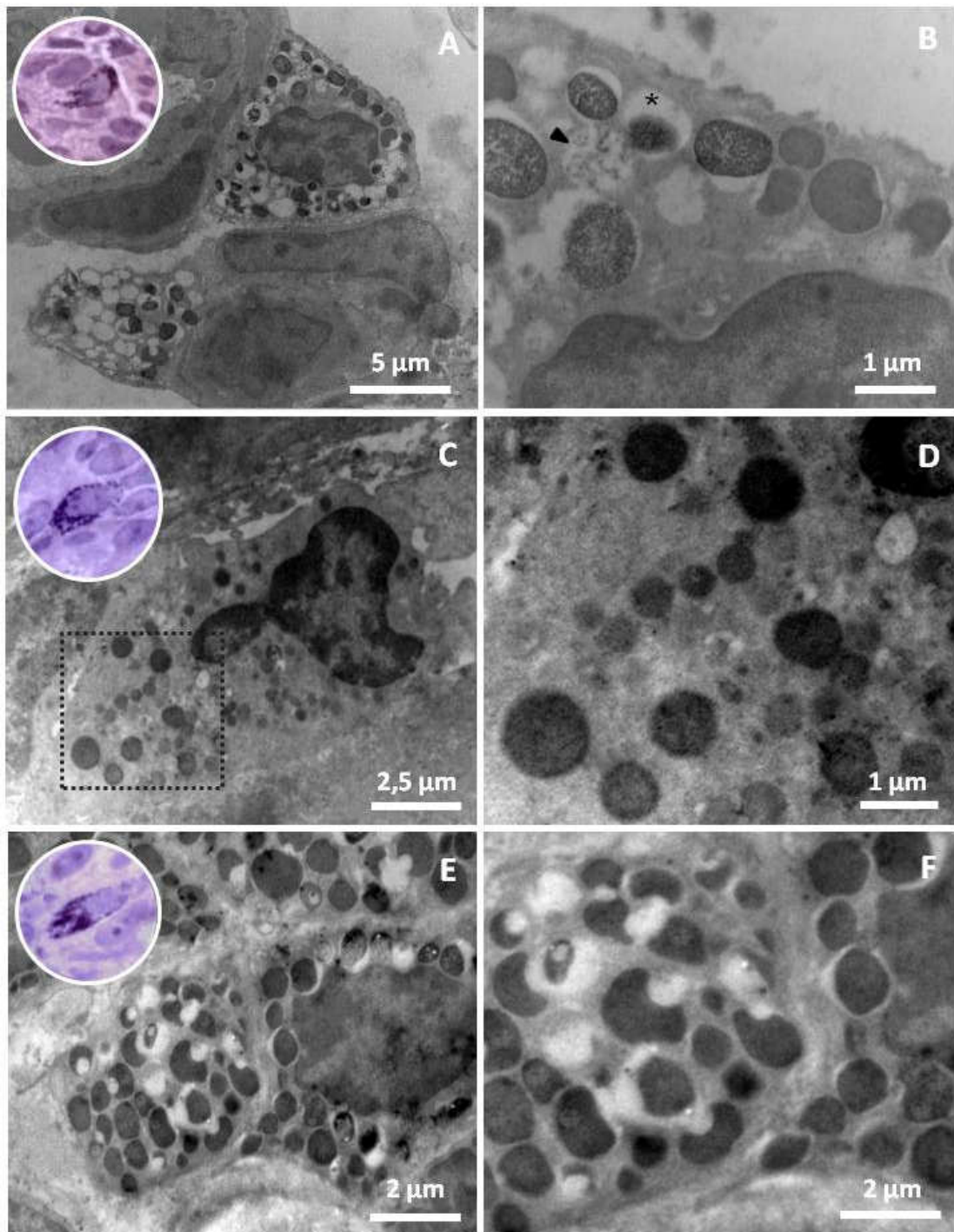


Figura 1 – Ultraestrutura de células imunorreativas à insulina no duodeno de *Didelphis aurita*. Nos círculos, destaque para células IRI identificadas por imuno-histoquímica após a desplastificação, em microscopia de luz (A, C e E), e grânulos secretores de insulina (B, D e F). Em B: grânulos imaturos (◄) e maduros (*). Grânulos de insulina apresentam morfologia típica, mostrando um halo eletrolúcido e um centro eletrodenso.

Tabela 1 – Morfometria dos grânulos secretores nas células imunorreativas à insulina no duodeno do gambá *D. aurita* (média ± desvio-padrão)

Grânulos	%	Diâmetro	Área (μm^2)	Volume (μm^3)	N / μm^2
Imaturos	33,33	0,76 ± 0,10	0,46 ± 0,11	1,30 ± 0,49	0,75 ± 0,36
Maduros	66,66	0,82 ± 0,13	0,54 ± 0,18	1,09 ± 0,46	1,51 ± 0,42

Os grânulos de secreção maduros e imaturos das células produtoras de insulina localizadas na mucosa duodenal do intestino delgado do gambá *D. aurita* adulto apresentaram padrões similares aos das células beta do pâncreas, porém diferentes dos de outras células enteroendócrinas.

4. DISCUSSÃO

A metodologia de Lane e Europa (1965) utilizada neste trabalho possibilitou melhor caracterização da morfologia granular das células imunorreativas à insulina (IRI) no intestino delgado do gambá *D. aurita* adulto, porque permitiu a preservação da morfologia dos grânulos secretores localizados nas células produtoras de insulina no duodeno.

Entre as células estudadas até hoje no intestino dos mamíferos, as células IRI são as menos numerosas (FREITAS-RIBEIRO *et al.*, 2011; KENDZIERSKI *et al.*, 2000). Os resultados aqui obtidos apresentaram células IRI localizadas na mucosa intestinal e de forma isolada, como observado em ratos por Bendayan e Park (1991).

Steiner *et al.* (1967) consideraram que, provavelmente, as células produtoras de insulina intestinal estão envolvidas na síntese e estoque de proinsulina (*proinsulin-like protein*), com possível atividade parácrina. Além disso, apresentaram grânulos secretores com diferentes periodicidades e tamanhos, como observado neste estudo.

Fukuma (1974) considerou que variações ultraestruturais podem ser observadas em relação à maturidade dos grânulos. Tal fato pode ser confirmado nos achados deste estudo, pela diferença de eletrodensidade e configuração variada do núcleo central denso, acompanhado por uma zona periférica eletrólúcida, provavelmente em função de uma transformação intragranular continuada dos peptídeos.

O padrão morfológico de outras células enteroendócrinas, quanto à sua eletrodensidade granular, apresentou-se diferente, em comparação aos grânulos secretores de insulina no duodeno do gambá. Segundo Fonseca *et al.* (1998), os grânulos secretores de glucagon na mucosa gástrica de gambás têm núcleo amplo eletrodenso e região periférica eletrolúcida estreita. Por sua vez, Forssmann *et al.* (1969) descreveram, em intestino de ratos, células com grânulos secretores de serotonina totalmente eletrodensos no intestino desses animais.

Uma das principais características morfológicas das células IRI observadas neste estudo foi a presença de grânulos de diâmetro médio maior (690 nm), em comparação com o das células beta pancreáticas em ratos, cujos valores foram de 330 nm (EL-NAGGAR, 2000) e 450 nm (DEAN, 1973).

Em relação à porcentagem dos grânulos maduros e imaturos identificados nas células IRI do duodeno do gambá *D. aurita* adulto, foram encontrados valores diferentes daqueles de El-Naggar (2000), em seu estudo ultraestrutural de ilhotas pancreáticas de ratos, em que esse autor identificou 44% de grânulos maduros e 56% de imaturos. Essas variações provavelmente ocorrem devido à grande extensão da cadeia peptídica da proinsulina nas diferentes espécies de mamíferos.

Os grânulos secretores de insulina foram observados, em geral, por todo o citoplasma, mas, por não estarem aparentemente polarizados, apresentavam inversamente ao descrito por Solcia *et al.* (1975), que caracterizavam a polarização de grânulos secretores na região basal de células endócrinas. Os resultados deste estudo foram semelhantes ao escrito por Dean (1973).

Os achados ultraestruturais deste estudo foram similares aos resultados encontrados por Bendayan e Park (1991), que observaram a mesma localização e morfologia granular das células imunorreativas à insulina do intestino delgado de ratos, caracterizando a presença de células extrapancreáticas produtoras de insulina, as quais têm uma provável atividade parácrina, como indicado por Steiner *et al.* (1967) e Kendzierski *et al.* (2000).

5. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que as técnicas de desplastificação e imunocitoquímica podem ser consideradas ferramentas importantes no estudo ultraestrutural das células produtoras de insulina no intestino delgado do gambá *D. aurita* adulto, especialmente para melhor caracterização da morfologia dos grânulos secretores. Adicionalmente, foi possível afirmar que as células IRI apresentaram morfologia similar às células beta do pâncreas, diâmetro e volume granular maior que essas e eletrodensidade diferente da de outras células enteroendócrinas.

REFERÊNCIAS

- BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. New York: Churchill livingstone, 1996. 776 p.
- BARBOSA, A. J. A.; NOGUEIRA, J. C. Distribution of enteroglucagon- and polypeptide YY - immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the white-belly opossum (*Didelphis albiventris*). **Histochemistry and Cell Biology**, v. 88, p. 37-40, 1987.
- BENDAYAN, M.; PARK, I. S. Presence of extrapancreatic islets of Langerhans in the duodenal wall of the rat. **Diabetologia**, v. 34, p. 604-606, 1991.
- CARVALHO, F. M. V.; FERNANDEZ, F. A. S.; NESSIMIAN, J. L. Food habits of sympatric opossums coexisting in small Atlantic Forest fragments in Brazil. **Mammalian Biology**, v. 70, n. 6, p. 366-375, 2005.
- COUTINHO, H. B.; SEWELL, H. F.; SMITH, D. I.; COUTINHO, V. B.; PINHEIRO, P. B. N. Demonstration of insulin in the pancreas of the *Didelphis albiventris* (opossum) by Immunocytochemical techniques. **Anatomischer Anzeiger**, v. 157, p. 167-175, 1984.
- COUTINHO, H. B.; SEWEL, H. F.; COUTINHO, V. B. Immunocytochemical demonstration of insulin in the mesonephros and metanephros of the brazilian opossum *Didelphis albiventris*. **Anatomischer Anzeiger**, v.159, p. 97-103, 1985.
- DEAN, P. M. Ultrastructural morphometry of the pancreatic β -cell. **Diabetologia**, v. 9, p. 115-119, 1973.

DEVASKAR, S. U.; SINGH, B. S.; CARNAGHI L, R.; RAJAKUMAR, P. A.; GIDDINGS, S. J. Insulin II gene expression in rat central nervous system. **Regulatory Peptides**, v. 48, p. 55-63, 1993.

DEZONNE, M. F. M.; CARREIRA, J. C. A.; FRANCO, A. M. R. Estudo do desenvolvimento extrauterino de *Didelphis marsupialis* e estabelecimento de uma tabela de classe etária. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 11., 1994, Belém. **Resumos...** Belém, 1984. p. 363-364.

EL-NAGGAR, M. M. Ultrastructural immunogold study on the various cell types of cultured pancreatic islets of adult rats. **Folia Morphology**, v. 59, n. 4, p. 253-262, 2000.

FONSECA, C. C.; NOGUEIRA, J. C.; BARBOSA, A. J. A. Argyrophilic and glucagon-immunoreactive cells in the ileum and colon of the developing opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). **Cells Tissues and Organs**, v. 170, p. 20-33, 2002a.

FONSECA, C. C.; NOGUEIRA, J. C.; BARBOSA, A. J. A. Diâmetro das ilhotas pancreáticas do gambá *Didelphis albiventris* em desenvolvimento intramarsupial. **Archives Veterinary Science**, v. 7, p. 129-134, 2002b.

FONSECA, C. C.; NOGUEIRA, J. C.; BARBOSA, A. J. A. Ultrastructural pattern of glucagon producing-cells in the gastric mucosa of the developing opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). **Annals of Anatomy**, v. 180, p. 477-480, 1998.

FORSSMANN, W. G.; ORCI, L.; PICTET, R.; RENOLD, E.; ROUILLER, C. The endocrine cells in the epithelium of the gastrointestinal mucosa of the rat. An Electron Microscope Study. **The Journal of Cell Biology**, v. 40, p. 692-715, 1969.

FREITAS-RIBEIRO, G. M.; FONSECA, C., C.; SARTORI, S., S.; LOURES-RIBEIRO, A.; NEVES, C. A. Quantificação das células argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina nos diferentes segmentos do intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). **Acta Scientiarum**, v. 33, n. 4, out./dez. 2011.

FUKUMA, M. Electron microscopic studies on the granule release from the rat pancreatic B-cells in organculture. **Journal Electron Microscopy**, v. 23, p. 167-183, 1974.

GRIMELIUS, L.; WILANDER, E. Silver stains in the study of endocrine cells of the gut and pancreas. **Investigative and Cell Pathology**, v. 3, p. 3-12, 1980.

GUEST, P. C.; BAILYES, E. M.; RUTHERFORD, N. G.; HUTTON, J. C. Insulin secretory granule biogenesis. **Biochemistry Journal**, v. 274, p. 73-78, 1991.

HOWELL, S. L.; KOSTIANOVSKY, M.; LACY, P. E. Beta granule formation in isolated islets of Langerhans. A Study By Electron Microscopic Radioautography. **The Journal of Cell Biology**, v. 42, p. 695-705, 1969.

KENDZIERSKI, S. K.; PANSKY, B.; BUDD, G. C.; SAFFRAN, M. Evidence for biosynthesis of preproinsulin in gut of rat. **Endocrine**, v.13, n. 3, p. 353-359, 2000.

KRAUSE, W. J.; YAMADA, J.; CUTTS, H. Quantitative distribution of enteroendocrine cells in the gastrointestinal tract of adult opossum, *Didelphis virginiana*. **Journal of Anatomy**, v.140, p. 591-605, 1985.

KRAUSE, W. J.; CUTTS, J. H.; CUTTS, J. H.; YAMADA, J. Immunohistochemical study of the developing endocrine pancreas of the opossum (*Didelphis virginiana*). **Acta Anatomica**, v. 135, p. 84-96, 1989.

LANE, B. P.; EUROPA, D. L. Differential staining of ultrathin sections of epon-embedded tissues for light microscopy. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 13, n. 7, p. 579-582, 1965.

MEIMARIDIS, D. G.; MORSE, D. E.; PANSKY, B.; BUDD, G. C. Insulin immunoreactivity in the fetal and neonatal rat retina. **Neuroscience Letters**, v. 118, p. 116-119, 2003.

POLAK, J. M.; BISHOP, A. E.; BARBOSA, A. J. A.; BLOOM, S. R. Hormônios gastrointestinais. In: DANI, R.; CASTRO, L. P. (Eds.), **Gastroenterologia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1993. p. 1446-1465.

REHFELD, J. F. The new biology of gastrointestinal hormones. **Physical Review**, n. 78, p. 1087-1108, 1998.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal Cell of Biology**, n. 17, p. 208-212, 1963.

SANTOS, G. C.; ZUCOLOTO, S. Células endócrinas gastrointestinais: breve histórico e principais métodos de identificação à microscopia óptica. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 33, p. 36-44, 1996.

SALA, M. A.; KOMESU, M.C.; LOPES, R. A.; MAIA, G.C. Karyometric study of basal cell carcinoma. **Brazilian Dental Journal**, v. 5, n. 1, p.11-14, 1994.

SOLCIA, E.; CAPELLA, C.; VASSALLO, G.; BUFFA, R. Endocrine cells of the gastric mucosa. **International Review Cytology**, v. 42, p. 223-286, 1975.

STACHURA, J.; KRAUSE, W. J.; IVEYT, K. J. Ultrastructure of endocrine-like cells in lamina propria of human gastric mucosa. **Gut**, n. 22, p. 534-541, 1981.

STAHLER, M. S.; PANSKY, B.; BUDD, G. C. Immunocytochemical demonstration of insulin-like immunoreactivity in the rat prostate gland. **The Prostate**, v. 13, p. 189-198, 1988.

STEINER, D.; SPIGELMAN, L.; ATEN, B. Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. **Science**, v. 157, n. 3789, p. 697-700, 1967.

STERNBERGER, L. A. **Immunocytochemistry**. New York, USA: Ed. John Wiley, Sons, 1979.

TAKAGI, C.; YAMADA, J.; KRAUSE, W. J.; KITAMURA, N.; YAMASHITA, T. An immunohistochemical study of endocrine cells in the proximal duodenum of eight marsupial species. **Journal of Anatomy**, v. 168, p. 49-56, 1990.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysics and Biochemistry Cytology**, n. 4, v. 4, p. 475-478, 1958.

CAPÍTULO 3

INSULINA PLASMÁTICA DO GAMBÁ *Didelphis aurita* (WIED-NEUWIED, 1826) ADULTO

RESUMO

Objetivando ampliar as informações a respeito de hormônios peptídicos, torna-se relevante estabelecer um valor de referência da insulina plasmática do gambá adulto *Didelphis aurita*, na tentativa de se comparar esse com os de outros mamíferos. O material para estudo consistiu de sete exemplares de gambás *Didelphis aurita*, machos, com peso médio de $1,03 \pm 0,14$ kg. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para testar a diferença entre os níveis de insulina da veia cava e da veia porta, não sendo observadas diferenças significativas nas suas dosagens. Os gambás *D. aurita* utilizados neste estudo permaneceram em cativeiro por curto período de tempo e tiveram seus hábitos alimentares preservados para se evitarem desequilíbrios metabólicos. Nos gambás *Didelphis aurita*, foram observados valores entre 2,7 e 3,5 $\mu\text{IU/mL}$ de insulina plasmática. Desse modo, concluiu-se que os níveis de insulina encontrados nos gambás *D. aurita* foram inferiores aos observados em outros mamíferos, inclusive humanos.

Palavras-chave: Insulina, insulina extrapancreática, radioimunoensaio, gambá.

ABSTRACT

PLASMATIC INSULIN OF OPOSSUM *Didelphis aurita* (WIED-NEUWIED, 1826) ADULT

Objectifying to widen the information concerning peptide hormones, it becomes relevant to establish a reference value of plasmatic insulin in the adult opossum *Didelphis aurita*, attempting to compare this with other mammals. The material to study consisted in seven exemplars of opossums *Didelphis aurita*, males, with average weight of $1,03 \pm 0,14$ kg. The Kruskal-Wallis test was utilized to test the difference among the levels of insulin of the cava vein and portal vein, not being observed significant differences in their dosages. The opossums *D. aurita* utilized in this study remained in captivity for a short period of time and had their food habits preserved due to avoid metabolic disequilibrium. In the opossums *Didelphis aurita*, were observed values among 2.7 and 3.5 $\mu\text{IU/mL}$ of plasmatic insulin. This way, it was concluded that the levels of insulin found in the opossums *D. aurita* were smaller than the ones observed in other mammals, including humans.

Keywords: Insulin, extrapancreatic insulin, radioimmunoexperiment, opossum.

1. INTRODUÇÃO

Pertencentes à subclasse Theria, infraclasse Metatheria e ordem Marsupialia, os marsupiais da espécie *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied 1826) fazem parte da família *Didelphidae* e encontram-se distribuídos do Sul do Canadá ao Nordeste da Argentina (LUO *et al.*, 2003). Em razão do curto período de gestação e da elevada permanência no marsúpio (cerca de 90 dias), é possível estudar a ontogênese de diferentes sistemas e aspectos fisiológicos importantes da espécie. Por isso, esse animal faz-se objeto de pesquisas que buscam soluções para questões relacionadas à saúde humana (NOGUEIRA, 1989). Os marsupiais são mamíferos de origem primitiva, considerados fósseis vivos, por não terem sofrido significativas mudanças evolutivas ao longo dos anos (ANTUNES, 2005).

Esses gambás possuem hábitos crepusculares e noturnos, alimentando-se de frutos, insetos, pequenos répteis e anfíbios, filhotes de aves e pequenos mamíferos (CARVALHO *et al.*, 2005).

A insulina é um hormônio que promove a entrada da glicose nas células e que também atua no metabolismo de lipídios e proteínas. Por ter sido o primeiro dos hormônios a serem purificados, cristalizados e sintetizados por técnicas de biologia molecular, a insulina é considerada modelo de hormônio peptídico (RANG, 2003).

As técnicas de produção de insulina sofreram grandes transformações no decorrer das últimas décadas. As apresentações comerciais de insulina

tinham proinsulina, substâncias semelhantes ao glucagon, polipeptídeos pancreáticos, somatostatina e peptídeos intestinais vasoativos. Esses contaminantes foram retirados com a introdução de insulinas suínas monocomponentes (DAVIS, 2005).

Recentes avanços tecnológicos da engenharia genética, combinados com análises computacionais, têm permitido a elucidação de vários mecanismos da fisiologia celular e são um dos pontos-chave para a produção industrial de medicamentos, como a insulina, que utilizam técnicas da biologia molecular (JIANZHONG, 2009).

As insulinas apresentadas no mercado são seguras e eficazes, principalmente para o tratamento do diabetes, mas ainda existem grandes descobertas a serem feitas, como a produção de um análogo igual ao secretado endogenamente em indivíduos saudáveis.

A técnica de radioimunoensaio permite medir níveis extremamente baixos de hormônios intestinais circulantes, que, por sua vez, associam sensibilidade e especificidade, permitindo a quantificação exata de grande variedade de compostos com importância biológica. Entre esses compostos, destacam-se os hormônios, as vitaminas e os medicamentos (POLAK *et al.*, 1993).

Com o objetivo de ampliar dados da literatura a respeito de hormônios peptídicos, torna-se relevante estabelecer um valor de referência da insulina plasmática do gambá adulto *Didelphis aurita*, para a obtenção de dados referentes à insulina de origem animal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O material para estudo consistiu de sete exemplares de gambás *Didelphis aurita*, machos, com peso médio de $1,03 \pm 0,14$ kg. Os animais foram considerados adultos por possuírem dentição completa, segundo a classificação de Macedo *et al.* (2006), e devido ao seu peso, de acordo com Dezonne *et al.* (1984).

Para sua captura foram usadas armadilhas tipo gancho, de 75x31x31 cm, utilizando como iscas banana e óleo de fígado de bacalhau. Os animais permaneceram em cativeiro por um período de 24 a 48 h recebendo água, banana e ovo, de modo semelhante aos seus hábitos alimentares naturais (CARVALHO *et al.*, 2005), até o dia da eutanásia. As capturas foram autorizadas pelo IBAMA (Licença nº. 19555-1) e realizadas entre julho de 2009 e outubro de 2010, em pequena região de mata situada no Museu de Zoologia João Moojen – Vila Gianetti, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram submetidos à avaliação da Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFV, sendo aprovados sob o Protocolo nº. 39/2009.

Depois de capturados, ainda no interior da armadilha os animais foram anestesiados com Tiopental sódico a 30 mg/mL, na dose de 60 mg/kg, por via intraperitoneal.

Ainda anestesiados, a cavidade abdominal dos gambás foi aberta na sua linha alba. No período matutino, foram coletadas amostras de 10 mL de sangue da veia cava caudal e da veia porta (Figura 1), para a dosagem dos níveis de insulina sanguínea sem o uso de anticoagulante e sem controle alimentar. A eutanásia, então, foi feita pela administração intracardíaca de cloreto de potássio 0,25%, em função do peso corporal.

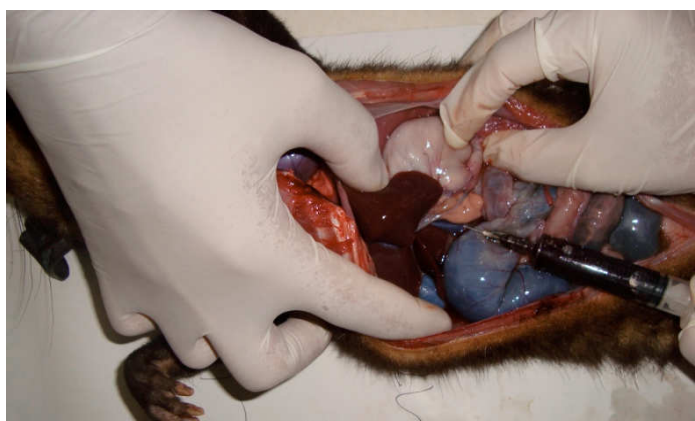


Figura 1 – Coleta da amostra de sangue na veia cava do gambá *Didelphis aurita*.

Para a medida da concentração hormonal no soro, foi feita análise com a técnica de radioimunoensaio (RIA), utilizando-se $\mu\text{IU/mL}$ como unidade-padrão e sensibilidade analítica de $2 \mu\text{IU/mL}$.

A dosagem de insulina plasmática foi feita no Laboratório de Biofármacos do DBB da UFV e no Laboratório Hermes Pardini, Belo Horizonte, MG.

2.1. Análise Estatística

Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade dos dados foram analisados pelos testes Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente. Uma vez não atendidos esses pressupostos e considerando o tamanho amostral, optou-se pela utilização de testes não paramétricos para a análise

das medidas de tendência central e da correlação entre as variáveis. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para testar a diferença entre os níveis de insulina da veia cava e da veia porta. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados a 5% de significância ($p < 0,05$), por meio do **Statistical Package for the Social Sciences** software 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os dados da análise estatística descritiva foram expressos como média \pm desvio-padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de insulina plasmática na veia porta e na veia cava caudal na amostra ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Nível de insulina de gambás *D. aurita* ($n = 7$) medidos no sangue obtido da veia cava caudal (VCC) e da veia porta (VP)

Insulina	Média \pm Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
VCC ($\mu\text{IU/mL}$)	$2,7 \pm 0,76^a$	2,0	3,5	2,5
VP ($\mu\text{IU/mL}$)	$2,9 \pm 0,79^a$	2,0	3,5	3,3

^aMédias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%.

Os níveis de insulina encontrados nos gambás *D. aurita* apresentaram-se inferiores aos observados em mamíferos, inclusive humanos (Figura 2). A concentração plasmática de insulina em ratos, por exemplo, apresenta valores oito vezes maiores do que nos gambás. Nos humanos, os valores de referência variam de 27 a 30 $\mu\text{IU/mL}$, sendo nove a 10 vezes maiores em relação aos níveis observados em gambás *D. aurita*.

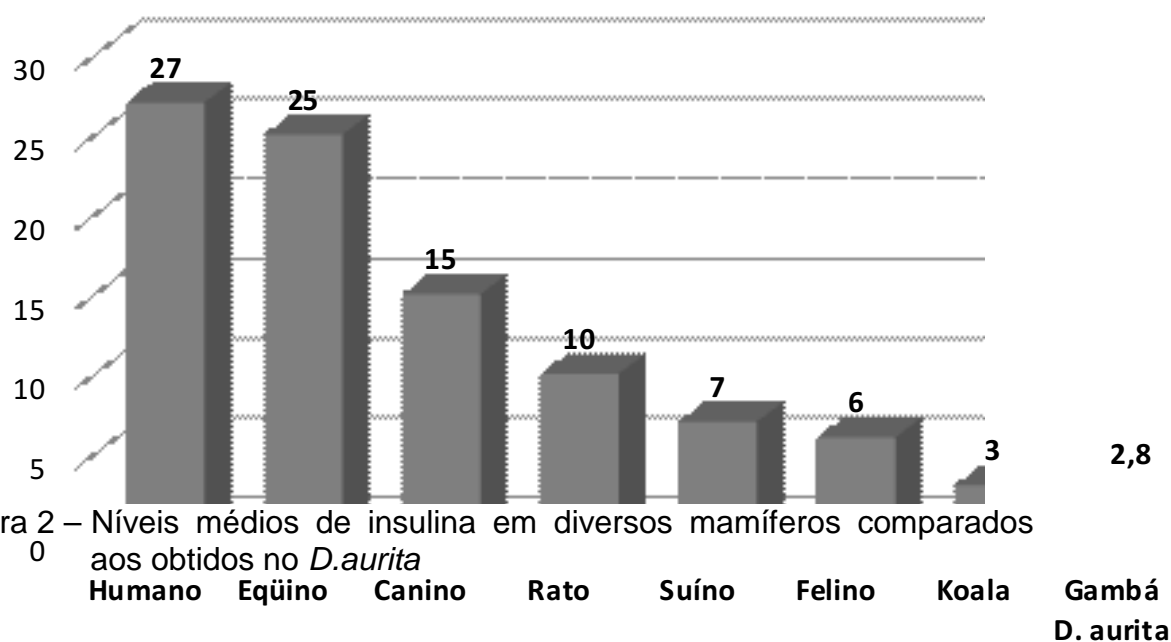


Figura 2 – Níveis médios de insulina em diversos mamíferos comparados aos obtidos no *D.aurita*

Geralmente, mamíferos silvestres estão submetidos ao estresse como períodos de privação alimentar, o que pode influenciar nos níveis de insulina. Os gambás utilizados neste estudo permaneceram em cativeiro por curto período de tempo e tiveram seus hábitos alimentares preservados para evitar desequilíbrios metabólicos. Segundo Carvalho *et al.* (2009), os resultados experimentais podem ser influenciados pelas condições ambientais.

Os resultados da insulinemia do gambá *D.aurita*, quando comparados com os de outros mamíferos, sugerem diferenciado controle homeostático da glicemia, com a possibilidade da disponibilização insulínica extrapancreática, como evidenciado por Rosenzweig *et al.* (1980), Bendayan e Park (1991) e Kojima *et al.* (2004).

Nos gambás *Didelphis aurita*, foram observados valores entre 2,7 e 3,5 $\mu\text{IU/mL}$ de insulina plasmática. Hemsley *et al.* (1998), em experimentos com Koalas (*Phascolarctos cinereus*) portadores de *Diabetes mellitus*, revelaram que a concentração de insulina foi de 0,5 $\mu\text{IU/mL}$ e a de Koalas não diabéticos, de 3,0 $\mu\text{IU/mL}$.

O resultado da insulinemia no gambá *D. aurita* verificado neste trabalho foi semelhante ao observado em Koala, que, embora tenha hábito alimentar muito diferente daquele do gambá, é também um marsupial.

4. CONCLUSÃO

Níveis de insulina encontrados nos gambás *D. aurita* foram inferiores aos observados nos humanos e na maioria dos mamíferos, sendo semelhantes aos dos Koalas.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, G. M. **Diversidade e potencial zoonótico de parasitas *Didelphis albiventris* Lund 1841 (Marsupialia: Didelphidae)**. 2005. 224 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- BENDAYAN, M.; PARK, I. S. Presence of extrapancreatic islets of Langerhans in the duodenal wall of the rat. **Diabetologia**, v. 34, p. 604-606, 1991.
- CARVALHO, F. M. V.; FERNANDEZ, F. A. S.; NESSIMIAN, J. L. Food habits of sympatric opossums coexisting in small Atlantic Forest fragments in Brazil. **Mammalian Biology**, v. 70, n. 6, p. 366-375, 2005.
- CARVALHO, G. D.; MASSENO, A. P. B.; ZANINI, M. S.; ZANINI, S. F.; PORFÍRIO, L. D.; MACHADO, J. P.; MAUAD, H. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 1, p. 51-57, 2009.
- DAVIS, S. N.; GRANNER, D. K. Insulina, hipoglicemiantes orais e a farmacologia do pâncreas endócrino. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. (Eds.). **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. cap. 61, p.1263-1290.
- DEZONNE, M. F. M.; CARREIRA, J. C. A.; FRANCO, A. M. R. Estudo do desenvolvimento extrauterino de *Didelphis marsupialis* e estabelecimento de uma tabela de classe etária. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 11., 1994, Belém. **Resumos...** Belém, 1984. p. 363-364.

FREITAS-RIBEIRO, G. M.; FONSECA, C. C.; SARTORI, S. S.; LOURES-RIBEIRO, A.; NEVES, C. A. Quantificação das células argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina nos diferentes segmentos do intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). **Acta Scientiarum**, v. 33, n. 4, out./dez. 2011.

HEMSLEY, S.; GOVENDIR, M.; CANFIELD, P. J.; CONNOLLY, J. H. Diabetes mellitus in a koala (*Phascolarctos cinereus*). **Australian Veterinary Journal**, v. 76, n. 3, p. 203-208, 1998.

JIANZHONG, L.; ZHIMING, W.; YUE, W.; HUI, C.; ZONGWAN, M. Metabolic engineering based on systems biology for chemical production. **Frontiers of Biology in China**, v. 4, n. 3, p. 260-265, 2009.

KOJIMA, H.; FUJIMIYA, M.; MATSUMURA, K.; NAKAHARA, T.; HARA, M.; CHAN, L. Extrapancreatic insulin - producing cells in multiple organs in diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, n. 8, p. 2458-2463, 2004.

LUO, Z. X.; JI, Q.; WIBLE, J. R.; YUAN, C. An early cretaceous tribosphenic mammal and metatherian evolution. **Science**, v. 302, p. 1934-1940, 2003.

MACEDO, J.; LORETTO, D.; VIEIRA, M.; CERQUEIRA, R. Classes de desenvolvimento em marsupiais: um método para animais vivos. **Journal of Neotropical Mammalogy**, v. 13, n. 1, p. 133-136, 2006.

NOGUEIRA, J. C. Reprodução do gambá *D. albiventris*. **Ciência Hoje**, n. 9, v. 53, p. 8-9, 1989.

POLAK, J. M.; BISHOP, A. E.; BARBOSA, A. J. A.; BLOOM, S. R. Hormônios gastrointestinais. In: DANI, R.; CASTRO, L. P. (Eds.). **Gastroenterologia clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1993. p.1446-1465.

RANG, H. P.; DALE, M. M. et al. **Farmacologia**. Pâncreas endócrino e o controle da glicemia. 5. ed. [S.l. : s.n.], 2003. p. 434-449.

ROSENZWEIG, J. L.; LESNIAK, M. A.; SAMUELS, B. E.; YIP, C. C.; ZIMMERMAN, A. E.; ROTH, J. Insulin is ubiquitous in extrapancreatic tissues of rats and humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 77, n. 1, p. 572-576, 1980.

CAPÍTULO 4

ESTUDOS MORFOLÓGICOS E HISTOQUÍMICOS DO INTESTINO DELGADO DO GAMBÁ *Didelphis aurita* (WIED-NEUWIED, 1826) ADULTO, COM ÊNFASE NA DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS ENDÓCRINAS ARGIRÓFILAS E ARGENTAFINS

RESUMO

Este estudo foi delineado para analisar e descrever a morfologia intestinal, bem como a distribuição de células enteroendócrinas, argirófilas e argentafins nos três segmentos (duodeno, jejuno e íleo) do intestino delgado de gambás adultos *Didelphis aurita*. O material para estudo consistiu de sete exemplares de gambás *Didelphis aurita*, machos, com peso médio de $1,03 \pm 0,14$ kg e comprimento *snout-rump* (ápice caudal) médio de $39,0 \pm 3,62$ cm. Foi detectado que as células argirófilas são mais numerosas em relação às argentafins e que ambas se caracterizam por possuírem conformação piramidal e núcleo ovoide, serem do tipo fechado ou aberto, apresentarem aspecto granular e serem mais frequentes nas glândulas intestinais. Foi quantificado maior número de células argirófilas por mm^2 do que argentafins no intestino delgado do gambá *D. aurita*, e o íleo foi o segmento com menor número total de células endócrinas quantificadas. A altura da vilosidade

intestinal no íleo foi menor quando comparada com as do duodeno e jejuno. Já a largura da vilosidade intestinal do jejuno apresentou valor maior do que a do duodeno e do íleo. A espessura da camada muscular circular do jejuno foi maior do que a do íleo, e as demais comparações não apresentaram diferenças morfológicas. Além disso, a espessura da camada muscular longitudinal foi semelhante entre os segmentos.

Palavras-chave: Morfologia, intestino delgado, células endócrinas, gambá.

ABSTRACT

MORPHOLOGIC AND HISTOCHEMICAL STUDIES OF THE SMALL INTESTINE OF OPOSSUM *Didelphis aurita* (WIED-NEUWIED, 1826) ADULT, WITH EMPHASIS IN THE DISTRIBUTION OF ENDOCRINE ARGIROPHILE AND ARGENTAFINS CELLS

This study was outlined to analyze and describe the intestinal morphology, as well as the distribution of enteroendocrine cells, argirophile and argentafins in the three segments (duodenum, jejunum and ileum) of small intestine of adult opossums *Didelphis aurita*. The material for study consisted of seven exemplars of opossums *Didelphis aurita*, males, with average weight of $1,03 \pm 0,14$ kg and snout-ramp (peel flow) length average of $39,0 \pm 3,62$ cm. It was detected that the argirophile cells are more numerous related to the argentafins ones and that both are characterized by having pyramidal conformation and ovoid nucleus, being the type closed or open, presenting granular aspect and being more frequent in intestinal gland. It was quantified a greater number of argirophile cells per mm^2 than argentafins in the small intestine of opossum *D. aurita*, and the ileum was the segment with the smallest total number of endocrine cells quantified. The height of intestinal villus in the ileum was smaller when compared to the ones in duodenum and jejunum. The width of intestinal villus in the jejunum presented greater value than the ones of duodenum and ileum. The

thickness of the muscular circular layer of the jejunum was larger than the ileum one, and the other comparisons did not present morphologic differences. Moreover, the thickness of the longitudinal muscular layer was likely among the segments.

Keywords: Morphology, small intestine, endocrine cells, opossum.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o gambá-de-orelha-preta, *Didelphis aurita*, e o gambá-de-orelha-branca, *D. albiventris*, são espécies de marsupiais didelfídeos, extensamente distribuídas na Região Neotropical (EMMONS; FEER, 1990).

A espécie *D. aurita* possui período gestacional que varia em torno de 12 dias, e os filhotes terminam seu desenvolvimento no marsúpio – período esse considerado como gestação externa de cerca de 90 dias (SAMOTO *et al.*, 2006).

O gambá possui espectro alimentar importante, pois o seu tubo digestivo é tipicamente onívoro, contendo glândulas salivares grandes, com exceção da parótida. O estômago do gambá apresenta-se como uma estrutura dilatada do tubo digestivo, cuja principal função é a liquefação do bolo alimentar e a digestão de determinados alimentos. A sua mucosa gástrica apresenta grande quantidade de glândulas fúndicas e células endócrinas. Estas últimas, juntamente com as células endócrinas intestinais e pancreáticas, contêm peptídeos específicos e aminas biogênicas que regulam a atividade digestiva (KRAUSE *et al.*, 1985; STEVENS; HUME, 1995; FONSECA *et al.*, 2002b).

Segundo Rodrigues *et al.* (2005), os estudos morfológicos do aparelho digestório são importantes como ferramentas adicionais para os estudos fisiológicos, patológicos e filogenéticos. Particularmente, observa-se a importância de estudos envolvendo as células enteroendócrinas, uma vez

que o controle dos eventos secretores e motores envolvidos na digestão e absorção dos nutrientes depende da ação do sistema endócrino.

Os estudos experimentais constituem passos essenciais para a aplicação dos ensaios clínicos no ser humano e dependem, sobretudo, da adequação experimental em animais. Vários autores têm realizado pesquisas com essas espécies (CLEBIS, 2006; ROMANO *et al.*, 2010; FREITAS-RIBEIRO, 2011), no intuito de estudar a morfofisiologia intestinal e ampliar o conhecimento sobre a adaptação e hábitos de vida desses animais.

Em vista da importância do intestino delgado quanto à sua função endócrina, ainda são poucos os trabalhos que abordam aspectos morfológicos do tubo digestivo de marsupiais (TAKAGI *et al.*, 1990; FONSECA *et al.*, 1998; FONSECA *et al.*, 2002a; CHRISTENSEN, 2003), sendo a maioria referente ao pâncreas e à mucosa gástrica (COUTINHO *et al.*, 1982; EDWIN, 1982; SOUZA *et al.*, 1982; COUTINHO *et al.*, 1984; BARBOSA *et al.*, 1984; KRAUSE *et al.*, 1986; EDWIN, 1987; KRAUSE *et al.*, 1989; FONSECA *et al.*, 2002b).

Há evidências de que a morfologia do intestino delgado e a distribuição de células enteroendócrinas podem variar em diferentes espécies de animais (PORTELA-GOMES *et al.*, 1984; VOLSKI *et al.*, 1999). Logo, o animal em estudo possui particular importância na evolução dos mamíferos por representar um elo de transição entre os Prototheria e os Eutheria, podendo ser utilizado como bom modelo para estudos comparativos entre as células enteroendócrinas e a morfologia intestinal.

Nesse contexto, este estudo foi delineado para analisar e descrever a morfologia intestinal, bem como a distribuição de células enteroendócrinas argirófilas e argentafins nos três segmentos (duodeno, jejuno e íleo) do intestino delgado de gambás adultos *Didelphis aurita*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O material para estudo consistiu de sete exemplares de gambás *Didelphis aurita*, machos, com peso médio de $1,03 \pm 0,14$ kg. Os animais foram considerados adultos (Figura 1) por possuírem dentição completa, segundo a classificação de Macedo *et al.* (2006), e devido ao seu peso, de acordo com Dezonne *et al.* (1984).



Figura 1 – Imagem representativa da dentição da arcada dentária superior do gambá *D. aurita*. A presença dos dentes molar e pré-molar indica um espécime adulto.

Para sua captura foram usadas armadilhas tipo gancho, de 75x31x31 cm, utilizando como iscas banana e óleo de fígado de bacalhau. Os animais permaneceram em cativeiro por um período de 24 a 48 h recebendo água, banana e ovo, de modo semelhante aos seus hábitos alimentares naturais (CARVALHO *et al.*, 2005), até o dia da eutanásia. As capturas foram autorizadas pelo IBAMA (Licença nº. 19555-1) e realizadas entre julho de 2009 e outubro de 2010, em pequena região de mata situada no Museu de Zoologia João Moojen – Vila Gianetti, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram submetidos à avaliação da Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFRV, sendo aprovado sob o Protocolo nº. 39/2009.

Após a captura, ainda no interior da armadilha os animais foram anestesiados com Tiopental sódico a 30 mg/mL, na dose de 60 mg/kg, por via intraperitoneal. Depois de os gambás terem sido retirados da gaiola, foi feita a mensuração do seu comprimento *snout-rump*, ou ápice caudal, compreendido entre o ápice do focinho e a base da cauda.

Os animais, sob anestesia, tiveram a cavidade abdominal aberta na sua linha alba e os segmentos intestinais duodeno, jejuno e íleo, identificados e delimitados por amarraduras com barbantes. A eutanásia foi feita pela administração intracardíaca de cloreto de potássio 0,25%, em função do peso corporal. Os intestinos foram retirados e colocados sobre uma calha, o que possibilitou sua mensuração real com paquímetro, sem que houvesse distensão dos segmentos.

Para o estudo histológico, foram coletados dois fragmentos de 1 cm de comprimento (um entre o terço inicial e o médio e outro entre o terço médio e o final) do duodeno, do jejuno e do íleo de cada animal, totalizando seis fragmentos. Estes foram fixados em formol 10% tamponado, desidratados em séries etílicas crescentes, diafanizados, incluídos em parafina e seccionados na espessura de 4 µm, em micrótomo rotativo manual (modelo Leica, RM2155), com intervalo entre os cortes de 40 µm.

Após a retirada da parafina, as secções histológicas foram hidratadas e coradas, segundo a técnica de Hematoxilina e Eosina (BANCROFT; STEVENS, 1996), de Acridina Orange (BANCROFT; STEVENS, 1996), de

Grimelius (GRIMELIUS, 1968) e de Masson-Fontana modificada (BARBOSA *et al.*, 1984). Cortes do pâncreas de gambás foram utilizados como controle positivo.

O processamento do material foi realizado no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV.

As células endócrinas argirófilas e argentafins foram quantificadas em 10 campos aleatórios da túnica mucosa corada com Grimelius e Masson Fontana, respectivamente, utilizando uma ocular de 10x e objetiva de 40x. A contagem de células positivas foi estabelecida por unidade de área em μm^2 , utilizando-se o software Image Pro-plus. A densidade final foi convertida matematicamente em número de células por milímetro quadrado.

A análise do comprimento e da largura das vilosidades intestinais foi realizada por meio de fotomicrografias de cortes histológicos corados com Acridina Orange e observação em microscopia de fluorescência, obtidas com objetiva de 4x. As fotomicrografias utilizadas na mensuração da espessura da camada submucosa e das camadas muscular longitudinal e circular foram obtidas de cortes corados pela técnica de Hematoxilina – Eosina, sob objetiva de 20x.

A estimativa da densidade de superfície do epitélio intestinal (Figura 2) foi realizada por meio de um sistema de teste (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003), composto por 72 arcos cicloides com comprimento conhecido (11,34 μm), contidos em uma área padronizada de $23 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. A densidade de superfície do epitélio foi definida por meio da relação $S_v = 2 \times I / LT$, conforme descrição a seguir:

- S_v = densidade de superfície do epitélio intestinal;
- I = arcos cicloides;
- LT = comprimento do arco; e
- \approx valor estimado.

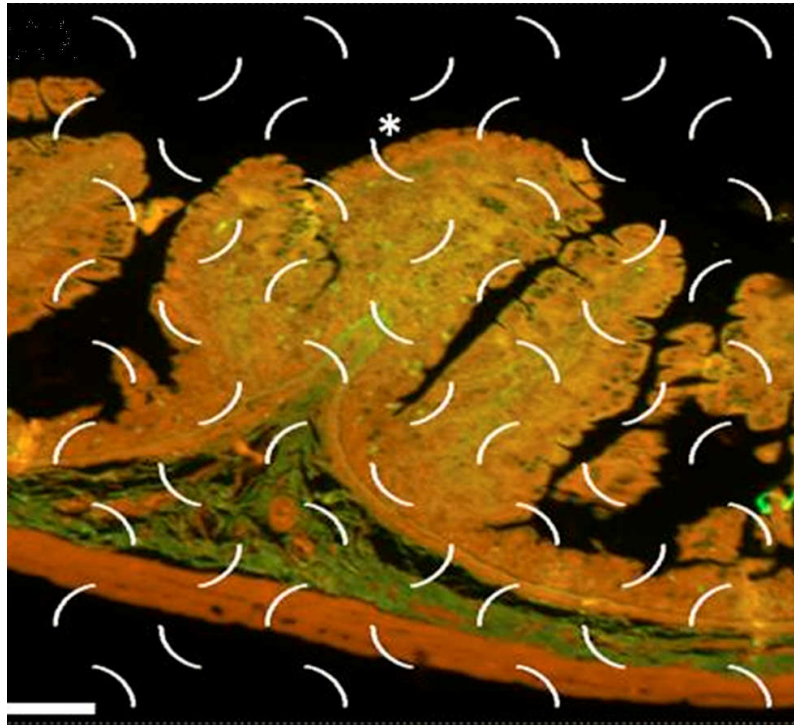


Figura 2 – Sistema de teste utilizado na estimativa da densidade de superfície do epitélio intestinal do gambá *Didelphis aurita*. O asterisco indica ponto de interseção entre o arco cicloide e a superfície do epitélio intestinal. Acridina Orange. Barra = 55 μ m.

Os processamentos dos fragmentos avaliados por microscopia de luz foram realizados nos Laboratórios de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral e de Histopatologia Veterinária do Departamento de Veterinária da UFV.

Para a observação e captura de imagens das secções e a quantificação de células endócrinas argentafins e argirófilas, foi utilizado o fotomicroscópio de luz binocular marca OLYMPUS BX 60, com câmara digital Qcolor.3 (Olympus) acoplada, no Laboratório de Citogenética de Insetos do Departamento de Biologia Geral da UFV.

2.1. Análise Estatística

Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade dos dados foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk e pelo teste de Levene, respectivamente. Uma vez não atendidos esses pressupostos e

considerando o tamanho amostral, optou-se pela utilização de testes não paramétricos para a análise das medidas de tendência central e da correlação entre as variáveis. Foi utilizado o teste Wilcoxon-Mann-Whitney para testar a diferença do número de células endócrinas argentafins e argirófilas por mm² nas regiões 1 (entre o terço inicial e o médio) e 2 (entre o terço médio e o final) de cada segmento do intestino (duodeno, jejuno e íleo). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para testar a diferença entre o número de células endócrinas argentafins e o de argirófilas por mm², nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), seguido da comparação múltipla das médias dos valores ordenados.

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados a 5% de significância ($p < 0,05$), por meio do **Statistical Package for the Social Sciences** software 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os dados da análise estatística descritiva foram expressos como média \pm desvio-padrão.

3. RESULTADOS

As vilosidades intestinais dos gambás têm três formas principais, com alargamento do ápice ou base, ou com espessura regular em toda a sua extensão. Uma característica marcante observada no duodeno do intestino delgado dos gambás foi a ocorrência de possíveis vilosidades secundárias, que se projetavam a partir de vilosidades primárias. De forma geral, essas vilosidades secundárias apresentavam-se mais curtas do que as primárias (Figura 3A).

Glândulas tubulares simples encontram-se dispostas na base da mucosa (Figura 3B); em destaque, a borda estriada (Figura 3E). Em relação aos aspectos histológicos, o intestino delgado apresentou em sua mucosa (Figura 3C) tecido epitelial simples prismático composto por células absortivas, mucossecretoras (Figura 3F), enteroendócrinas e indiferenciadas. A lâmina própria e a camada submucosa (Figura 3D) são formadas por tecido conjuntivo frouxo e tem grande quantidade de vasos sanguíneos e núcleos celulares típicos de linfócitos.

A muscular da mucosa apresenta-se delgada (Figura 3D), limitando a mucosa e a submucosa; a túnica muscular é formada por uma camada muscular lisa interna disposta circularmente e por uma camada muscular lisa externa disposta longitudinalmente (Figura 3D).

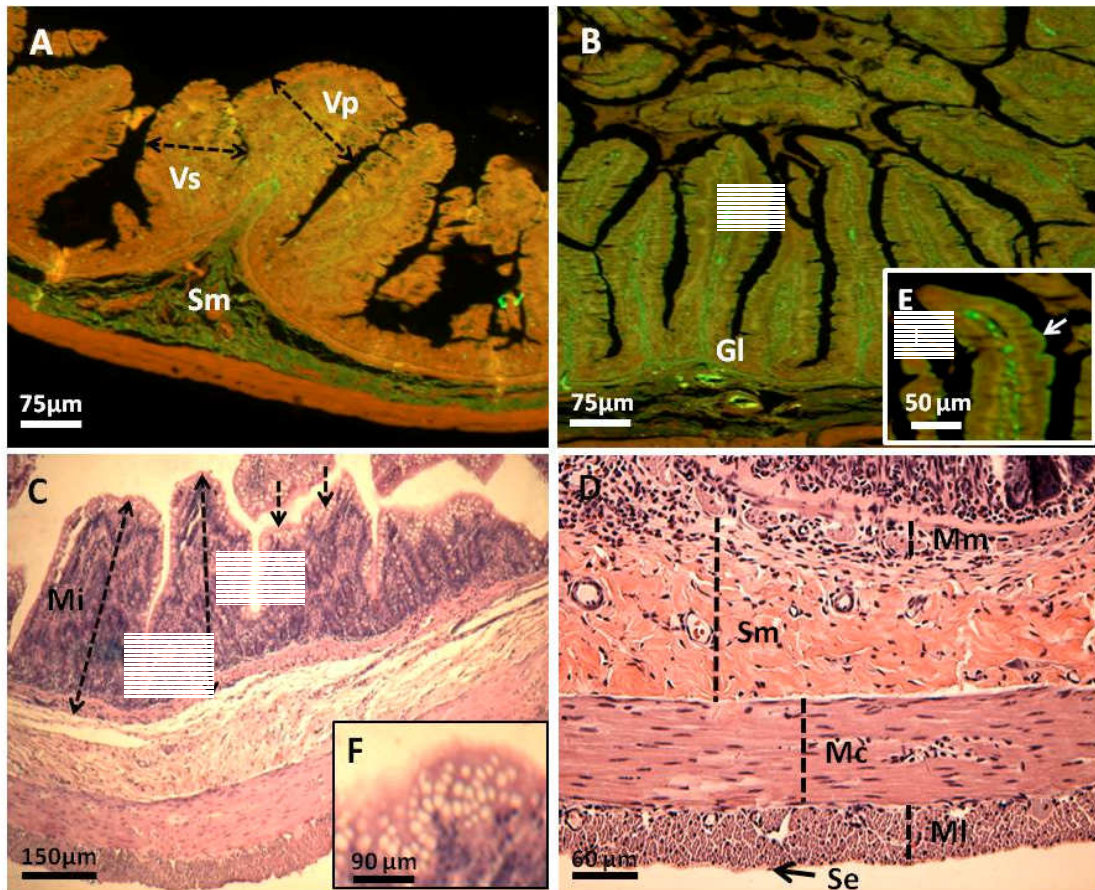


Figura 3 – Parede intestinal do duodeno do gambá *Didelphis aurita*. (A) Mucosa intestinal com vilosidades primárias (Vp) e secundárias (Vs), Submucosa (Sm) (Acridina Orange). (B) Mucosa intestinal com vilosidades e glândulas (Gl) (Acridina Orange). (C) Mucosa intestinal (dupla seta) e células calciformes (setas). (D) MM: muscular da mucosa; Sm: submucosa; Mc: muscular circular; MI: muscular longitudinal; Se: serosa (Hematoxilina-Eosina). (E) Seta: Detalhe da borda estriada (Acridina Orange). (F) Detalhe de células calciformes (Hematoxilina-Eosina).

A análise morfométrica da altura e largura das vilosidades intestinais dos gambás *D. aurita* evidenciou diferenças significativas em função dos segmentos intestinais analisados ($p < 0,05$) (Tabela 1). De acordo com a comparação múltipla de médias ordenadas, a altura da vilosidade intestinal no íleo foi menor que as do duodeno e jejuno. Já a largura da vilosidade intestinal do jejuno apresentou valor maior do que a do duodeno e do íleo. Quanto à densidade de superfície de absorção do epitélio intestinal, não foram observadas diferenças significativas entre os segmentos ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Altura e largura das vilosidades e densidade de superfície epitelial nos segmentos do intestino delgado de gambás *D. aurita* (n = 7)*

	Altura da Vilosidade (µm)	Largura da Vilosidade (µm)	Densidade de Superfície do Epitélio Intestinal (n / µm)
Duodeno	400,09 ± 31,15 ^a	216,25 ± 14,27 ^a	46,32 ± 5,81 ^a
Jejuno	403,85 ± 20,46 ^a	263,98 ± 10,42 ^b	49,18 ± 4,62 ^a
Íleo	341,77 ± 15,28 ^b	200,57 ± 11,96 ^a	40,11 ± 6,95 ^a

*Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%.

Na espessura da camada submucosa e da camada muscular longitudinal não foram observadas diferenças significativas entre os segmentos ($p > 0,05$) (Tabela 2). Quanto à espessura da camada muscular circular no intestino delgado dos gambás *D. aurita*, ela foi diferente em função dos segmentos analisados ($p < 0,05$). De acordo com a comparação múltipla de médias ordenadas, a espessura da camada muscular circular do jejuno foi maior que a do íleo.

Tabela 2 – Espessuras das camadas submucosa, muscular circular e muscular longitudinal nos segmentos intestinais do intestino delgado de gambás *D. aurita* (n = 7)*

	Espessura da Camada Submucosa (µm)	Espessura da Camada Muscular Circular (µm)	Espessura da Camada Muscular Longitudinal (µm)
Duodeno	96,58 ± 18,65 ^a	190,66 ± 20,32 ^{a,b}	196,71 ± 28,15 ^a
Jejuno	100,37 ± 20,15 ^a	219,40 ± 22,91 ^a	217,34 ± 25,18 ^a
Íleo	88,75 ± 13,70 ^a	174,20 ± 19,53 ^b	161,37 ± 30,46 ^a

*Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%.

Para investigar a distribuição das células enteroendócrinas no intestino delgado, optou-se pela quantificação do número total e do percentual de células por unidade de área (mm^2) em cada segmento intestinal. Foram quantificadas no duodeno dos gambás *D. aurita* adultos um total de 908 células endócrinas, sendo 36% argentafins e 64% argirófilas. Na amostra do jejuno, foram observadas 876 células endócrinas, sendo 37% argentafins e 63% argirófilas. O íleo foi o segmento com menor número total de células endócrinas quantificadas (756), sendo 33% argentafins e 67% argirófilas, na amostra analisada (Figura 4).

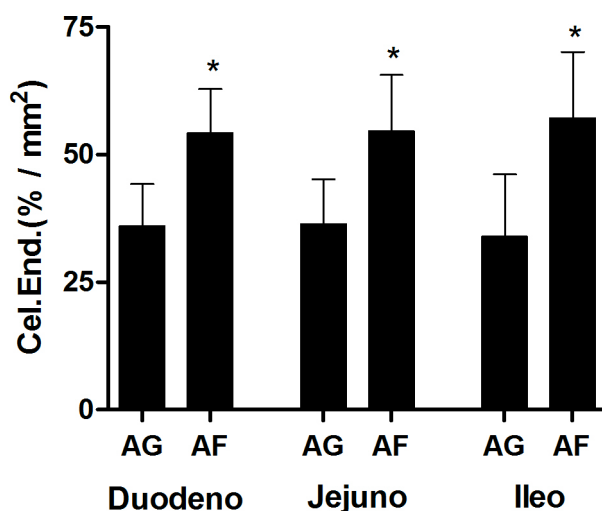


Figura 4 – Proporção de células argentafins (AG) e argirófilas (AF) observadas em diferentes segmentos do intestino delgado de gambás *D. aurita* ($n = 7$). Dados expressos em média e desvio-padrão. * Indica diferença estatística entre os tipos celulares do mesmo segmento intestinal, $p < 0,05$. Teste Wilcoxon-Mann-Whitney.

Células endócrinas argirófilas e argentafins (Figura 5) foram observadas difusamente ao longo do epitélio intestinal, com maior concentração nas criptas e redução nas vilosidades. Essas células se caracterizam pela presença de grânulos secretores e pela forma de alongada a piramidal.

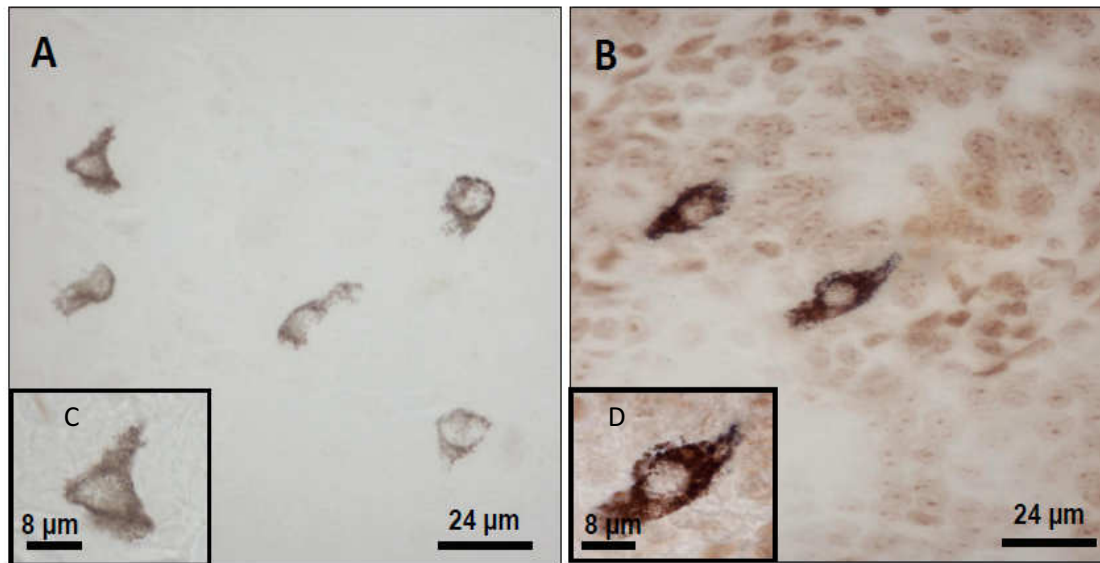


Figura 5 – Mucosa intestinal do gambá *Didelphis aurita*. A – Células endócrinas argentafins. Masson-Fontana. B – Células endócrinas argirófilas. Grimelius. C e D – Detalhe das células em A e B, respectivamente.

Não foram observadas diferenças significativas no número de células endócrinas argirófilas e argentafins por mm^2 (Tabela 3), em função da região (terço inicial-médio x terço médio-final) dentro de cada segmento intestinal de gambás *D. aurita* ($p > 0,05$).

No que diz respeito à distribuição do número de células argentafins e argirófilas por mm^2 (Tabela 4), não foram observadas diferenças significativas entre os três segmentos intestinais analisados ($p > 0,05$).

Tabela 3 – Número de células endócrinas argentafins e argirófilas por mm² das regiões proximal e distal da camada mucosa do duodeno, jejuno e íleo de gambás *D. aurita* (n = 7)

Segmento Intestinal	Região	Argentafins	Argirófilas
Duodeno	Terço Inicial-Médio	24,1 ± 5,9 ^a	25,6 ± 5,0 ^a
	Terço Médio-Final	23,3 ± 11,2 ^a	27,7 ± 7,4 ^a
Jejuno	Terço Inicial-Médio	23,8 ± 7,5 ^a	24,9 ± 6,4 ^a
	Terço Médio-Final	23,2 ± 8,0 ^a	29,1 ± 16,4 ^a
Íleo	Terço Inicial-Médio	19,1 ± 6,8 ^a	27,7 ± 24,1 ^a
	Terço Médio-Final	16,0 ± 7,2 ^a	24,5 ± 14,0 ^a

Dados expressos em média e desvio-padrão. ^aMédias seguidas por letras iguais na mesma coluna, dentro de cada segmento, não diferem entre si, pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney a 5%,

Tabela 4 – Número de células endócrinas argentafins e argirófilas por mm², em diferentes segmentos do intestino delgado de gambás *D. aurita* (n = 7)

Células Endócrinas	Duodeno	Jejuno	Íleo
Argentafins	23,7 ± 8,6 ^a	23,5 ± 7,4 ^a	17,6 ± 6,9 ^a
Argirófilas	26,7 ± 6,2 ^a	27,1 ± 12,1 ^a	26,1 ± 19,1 ^a

Dados expressos em média e desvio-padrão. ^aMédias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%,

4. DISCUSSÃO

Conforme os resultados, a camada muscular circular do jejuno apresenta-se mais espessa que a do íleo, provavelmente devido às diferenças dos padrões de contração durante o peristaltismo da região proximal para a distal do intestino delgado (JOHNSON, 2007).

A altura das vilosidades diminuiu no sentido caudal. Dados semelhantes foram observados por Velásquez *et al.* (2001) em capivaras adultas.

A medida da superfície absorptiva intestinal realizada no estudo atual por meio dos arcos cicloides não mostrou diferenças entre as regiões do intestino delgado do gambá *D. aurita*. Isso se deve, provavelmente, ao fato de que os animais tiveram mantidas as suas dietas alimentares, embora tenham ocorrido variações de formas, alturas e espessuras entre as vilosidades. Segundo Nascimento (2009), as mudanças nos padrões de composição da dieta alteram a área de superfície do órgão – associado ao jejum alimentar.

Ribeiro Jr. *et al.* (1987), em estudo experimental do epitélio do intestino delgado em ratos com desnutrição proteico-energética, constataram redução da superfície absorptiva jejunal, onde não havia alteração evidenciada da altura das vilosidades.

Neste trabalho, detectou-se que as células argirófilas são mais numerosas em relação às argentafins, em função de que a técnica de

Grimelius cora quase todas as células enteroendócrinas do trato gastrointestinal. Conforme Santos e Zucoloto (1996), as células produtoras de serotonina são argentafins e constituem a população predominante do sistema de células endócrinas do aparelho digestório.

O padrão de distribuição das células enteroendócrinas argirófilas e argentafins apresentado pelos gambás *Didelphis aurita* foi coerente em relação ao encontrado por Takagi *et al.* (1990) em um estudo do intestino delgado de oito espécies de marsupiais. Essas características são compartilhadas com as de Coutinho *et al.* (1984), Björn *et al.* (2006), Portela-Gomes *et al.* (1984) e Freitas-Ribeiro *et al.* (2011).

As células argirófilas e argentafins apresentadas nesta pesquisa se caracterizam por sua conformação piramidal e núcleo ovoide, por serem classificadas como dos tipos fechado ou aberto, apresentarem aspecto granular e terem concentração e localização preferencialmente nas glândulas intestinais (de Lieberkühn), como verificado por Krause e Yamada (1985).

Segundo Krause *et al.* (1986), o intestino do gambá apresenta características semelhantes às do pâncreas, no que diz respeito à presença de células produtoras de hormônios. No intestino delgado do gambá *D. aurita*, de fato, foram identificadas células argirófilas e argentafins que armazenam grânulos citoplasmáticos, podendo ter um possível mecanismo parácrino, autócrino e endócrino.

De acordo com Santos e Zucoloto (1996), uma das principais funções das células enteroendócrinas está relacionada com a regulação local dos tecidos e órgãos, que se adaptam à secreção e motilidade do aparelho digestório. Logo, a presença observada de células argentafins no duodeno de *D. aurita* está relacionada com a importância desse segmento para as funções gastrointestinais.

Uma das principais funções das células enteroendócrinas está relacionada com a regulação local dos tecidos e órgãos quanto à sua secreção e motilidade, provavelmente podendo ser influenciadas pela grande concentração de células argirófilas e argentafins no duodeno e no jejuno.

5. CONCLUSÃO

O intestino delgado do gambá *D. aurita* adulto apresentou grande concentração de células argentafins e argirófilas nas glândulas intestinais (de Liberkuhn). Essas células endócrinas se caracterizam pela presença de grânulos secretores, pela morfologia piramidal alongada e pelo núcleo ovoide. Foi quantificado o maior número de células argirófilas por mm² do que argentafins; e o íleo foi o segmento com menor número total de células endócrinas. A altura da vilosidade intestinal no íleo foi menor quando comparada com a do duodeno e jejuno. Já a largura da vilosidade intestinal do jejuno apresentou valor maior do que a do duodeno e do íleo. A densidade de área de absorção do epitélio intestinal dos gambás *D. aurita* adultos não variou entre os segmentos. A espessura da camada muscular circular do jejuno foi maior do que a do íleo, e as demais comparações não apresentaram diferenças morfológicas. Além disso, a espessura da camada muscular longitudinal foi semelhante entre os segmentos.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, G. M. **Diversidade e potencial zoonótico de parasitas *Didelphis albiventris* Lund 1841 (Marsupialia: Didelphidae)**. 2005. 224 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. 4. ed. New York: Churchill Livingstone, 1996. 766 p.
- BARBOSA, A. J. A.; CASTRO, L. P. F.; NOGUEIRA, A. M. F. A simple and economical modification of the Masson-Fontana method of staining melanin granules and enterochromaffin cells. **Stain Technology**, v. 59, p. 193-196, 1984.
- BJÖRN, G.; BAKKE, I.; TOMMERAS, K.; WALDUM, H. L. A new method for visualization of gut mucosal cells, describing the enterochromaffin cell in the rat gastrointestinal tract. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 41, n. 4, p. 390-395, 2006.
- CARUSO, M.; DEMONTE, A. Histomorfometria do intestino delgado de ratos submetidos a diferentes fontes proteicas. **Revista Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, p. 131-136, 2005.
- CARVALHO, F. M. V. et al. Food habits of sympatric opossums coexisting in small Atlantic Forest fragments in Brazil. **Mammalian Biology**, v. 70, n. 6, p. 366-375, 2005.
- CARVALHO, G. D.; MASSENO, A. P. B.; ZANINI, M. S.; ZANINI, S. F.; PORFÍRIO, L. D.; MACHADO, J. P.; MAUAD, H. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 1, p. 51-57, 2009.

CHRISTENSEN, J. The forms of argyrophilic ganglion cells in the myenteric plexus throughout the gastrointestinal tract of the opossum. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 24, n. 3, p. 251-260, 2003.

CLEBIS, N. K. **Influência da atividade física sobre o envelhecimento inicial do plexo mioentérico do jejuno em rato Wistar**. 2006. 96 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

COUTINHO, H. B.; BECK, F.; SANTIAGO, M. A. A.; PESSOA, R. G.; PINHEIRO, P. B. N.; COUTINHO, V. B. Some aspects of the development of the pancreas in the marsupial *Didelphis albiventris*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 42, p.15-19, 1982.

COUTINHO, H. B.; SEWELL, H. F.; SMITH, D. I.; COUTINHO, V. B.; PINHEIRO, P. B. N. Demonstration of insulin in the pancreas of the *Didelphis albiventris* (opossum) by Immunocytochemical techniques. **Anatomischer Anzeiger**, v. 157, p. 167-175, 1984.

DEZONNE, M. F. M.; CARREIRA, J. C. A.; FRANCO, A. M. R. Estudo do desenvolvimento extrauterino de *Didelphis marsupialis* e estabelecimento de uma tabela de classe etária. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 11., 1994, Belém. **Resumos...** Belém, 1984. p. 363-364.

EDWIN, N. Quantitative estimation of islet tissue of pancreas in possums (*Trichosurus vulpecula*). **Journal of Zoology**, v. 197, p. 455-461, 1982.

EDWIN, N. Quantitative estimation of pancreatic polypeptide (PP) cells of islet tissue of pancreas in Australian mammals. **Journal of Zoology**, v. 213, p. 665-671, 1987.

EMMONS, L. H.; FEER, F. Neotropical rainforest mammals a field guide. **The University of Chicago Press**, Chicago. 1990.

FREITAS-RIBEIRO, G. M.; FONSECA, C., C.; SARTORI, S., S.; LOURES-RIBEIRO, A.; NEVES, C. A. Quantificação das células argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina nos diferentes segmentos do intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). **Acta Cientiarium**, v. 33, n. 4, out./dez. 2011.

FONSECA, C. C.; NOGUEIRA, J. C.; BARBOSA, A. J. A. Argyrophilic and glucagon-immunoreactive cells in the ileum and colon of the developing opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). **Cells Tissues and Organs**, v. 170, p. 20-33, 2002a.

FONSECA, C. C.; NOGUEIRA, J. C.; BARBOSA, A. J. A. Diâmetro das ilhotas pancreáticas do gambá *Didelphis albiventris* em desenvolvimento intramarsupial. **Archives Veterinary Science**, v. 7, p. 129-134, 2002b.

FONSECA, C. C.; NOGUEIRA, J. C.; BARBOSA, A. J. A. Ultrastructural pattern of glucagon producing-cells in the gastric mucosa of the developing opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). **Annals of Anatomy**, v. 180, p. 477-480, 1998.

GRIMELIUS, L. A silver nitrate for α_2 cells in human pancreatic islets. **Acta Socio Medical Upsalience**, v. 73, p. 243-320, 1968.

JOHNSON, L. R. Gastrointestinal physiology. Philadelphia. **Elsevier**, p. 41-43, 2007.

KRAUSE, W. J.; YAMADA, J.; CUTTS, H. Quantitative distribution of enteroendocrine cells in the gastrointestinal tract of adult opossum, *Didelphis virginiana*. **Journal of Anatomy**, v. 140, p. 591-605, 1985.

KRAUSE, W. J.; CUTTS, J. H.; CUTTS, J. H.; YAMADA, J. Immunohistochemical study of the developing endocrine pancreas of the opossum (*Didelphis virginiana*). **Acta Anatomica**, v. 135, p. 84-96, 1989.

MACEDO, J.; LORETTO, D.; VIEIRA, M.; CERQUEIRA, R. Classes de desenvolvimento em marsupiais: um método para animais vivos. Mastozoologia Neotropical. **Journal of Neotropical Mammalogy**, v. 13, n. 1, p. 133-136, 2006.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 75, p. 469-486, 2003.

NASCIMENTO, F. L. R. **Reorganização estrutural e metabólica do intestino associada ao jejum e dormência sazonal em lagartos teiú *Tupinambis merianae***. 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2009.

PORTELA-GOMES, G. M.; GRIMELIUS, L.; PETERSSON, R.; BERGSTRÖM, R. Enterochromaffin cells in the rat gastrointestinal tract. Aspects of factors influencing quantification. **Uppsala Journal of Medical Science**, v. 89, n. 3, p. 189-203, 1984.

RIBEIRO JR., H. C.; TEICHBERG, S.; MCGARVEY, E., LIFSHITZ, F. Quantitative alterations in the structural development of jejunal absorptive epithelial cells and their subcellular organelles in protein-energy malnourished rats: a stereologic analysis. **Gastroenterology**, v. 93, p. 1381-1392, 1987.

RODRIGUES, S. S.; FONSECA, C. C.; NEVES, M. T. D. Células endócrinas do sistema gastroenteropancreático: conceitos, distribuição, secreções, ação e controle. **Arquivos de Ciência Veterinárias e Zoologia**, Unipar, Umuarama, v. 8, p. 171-180, 2005.

ROMANO, E. B.; NATALI, M. R. M.; LEITE, J. C.; CAMPOS, L. B.; BERARDI, E. J. Análise morfométrica dos neurônios nadh-diaforase positivos do jejuno de ratos Wistar em diferentes idades. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, p. 65-70, 2010.

SAMOTO, V. Y.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E.; PEREIRA, F. T. V.; LIMA, M. C.; CARVALHO, A. F. Opossum (*Didelphis* sp) mammary gland morphology associated to the marsupial model. **Biota Neotropical**, v. 6, n. 2. May/Aug. 2006.

SANTOS, G. C.; ZUCOLOTO, S. Células endócrinas gastrointestinais: breve histórico e principais métodos de identificação à microscopia óptica. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 33, p. 36-44, 1996.

SOUZA, A. M. F.; COUTINHO, H. B.; HUNTER, R. L.; CARVALHO JR., L. B.; PESSOA, R. G. Insulin-like proteins during the development of the pancreas in the Brazilian opossum *Didelphis albiventris*. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 72, n. B., p. 149-151, 1982.

STEVENS, C. E.; HUME, I. D. Contributions of Microbes in Vertebrate Gastrointestinal Tract to Production and Conservation of Nutrients. **Physiology Review**, v. 78, p. 393-427, 1995.

TAKAGI, C.; YAMADA, J.; KRAUSE, W. J.; KITAMURA, N.; YAMASHITA, T. An immunohistochemical study of endocrine cells in the proximal duodenum of eight marsupial species. **Journal of Anatomy**, v. 168, p. 49-56, 1990.

VELÁSQUEZ, J. C. C. **Estudos histológico e histoquímico dos órgãos do tubo digestivo, fígado e pâncreas de capivaras adultas *Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766 (*Mammalia, Rodentia, Hydrochaeridae*)**. 2001. 132 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

3. CONCLUSÕES GERAIS

- O intestino delgado do gambá adulto *D. aurita* apresentou diferenças na distribuição das células imunorreativas à insulina (IRI), sendo elas difusas ao longo do epitélio intestinal, com maior concentração nas criptas (de Lieberkühn). Verificou-se que o número de células IRI, por mm², no duodeno e no jejuno foi maior do que no íleo.
- Os resultados encontrados sugerem que as técnicas de desplastificação e imunocitoquímica podem ser consideradas ferramentas importantes no estudo ultraestrutural das células produtoras de insulina no intestino delgado do gambá *D. aurita* adulto. Isso especialmente para melhor caracterização da morfologia dos grânulos secretores e evitar a técnica de imunogold, que seria mais dispendiosa.
- Tais células apresentaram acúmulo de grânulos secretores maduros e imaturos, morfologia com aspecto piramidal e do tipo fechado. Os grânulos mostraram formatos arredondados, de tamanhos variados, conteúdo central eletrodense intenso a moderado, região periférica eletrolúcida, majoritariamente distribuídos no citoplasma marginal e envolvidos por membrana plasmática.
- Verificou-se morfologia similar às das células beta do pâncreas, assim como não houve dúvidas quanto à sua localização e possível atividade parácrina. A biogênese dos grânulos insulínicos e a sua classificação, bem como a atividade fisiológica em regiões produtoras de insulina, são

áreas de investigação contínua no controle do diabetes e de outras patologias.

- Os níveis de insulina encontrados nos gambás *D. aurita* foram inferiores aos observados em outros mamíferos e humanos. Os resultados em relação à insulinemia, na espécie estudada, sugerem a manutenção da homeostasia da glicose, mediante a atividade secretora insulínica extrapancreática.
- O intestino delgado do gambá *D. aurita* adulto apresentou grande concentração de células argentafins e argirófilas nas glândulas intestinais (de Liberkühn). Foi quantificado maior número de células argirófilas por mm^2 do que argentafins, e o íleo foi o segmento com menor número total de células endócrinas quantificadas. A morfologia no intestino delgado quanto à altura da vilosidade intestinal no íleo foi menor quando comparada com as do duodeno e do jejuno. Já a largura da vilosidade intestinal do jejuno apresentou valor maior do que a do duodeno e do íleo. A densidade de área de absorção do epitélio intestinal dos gambás *D. aurita* adultos não variou entre os segmentos. A espessura da camada muscular circular do jejuno foi maior do que a do íleo, e as demais comparações não apresentaram diferenças morfológicas.