

**EDUARDO FRANÇA CASTRO**

**ESTUDOS HISTOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E HISTOQUANTITATIVO  
DE CÉLULAS ENDÓCRINAS DO ESTÔMAGO E INTESTINO MÉDIO DE  
PEIXES (Teleostei) DE ÁGUA DOCE, COM DIFERENTES HÁBITOS  
ALIMENTARES**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, para  
obtenção do título de “Magister  
Scientiae”.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2002**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C355e  
2002

Castro, Eduardo França, 1974-

Estudos histológico, histoquímico e histoquantitativo de células endócrinas do estômago e intestino médio de peixes ( Teleostei ) de água doce, com diferentes hábitos alimentares / Eduardo França Castro. – Viçosa : UFV, 2002. 103p. : il.

Orientador: Cláudio César Fonseca  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa

1. Peixe - Estômago - Células endócrinas. 2. Peixe - Intestino - Células endócrinas. 3. Peixe - Estômago - Histologia. 4. Peixe - Intestino - Histologia. 5. Hábitos alimentares. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 639.375

CDD 20.ed. 639.375

**EDUARDO FRANÇA CASTRO**

**ESTUDOS HISTOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E HISTOQUANTITATIVO  
DE CÉLULAS ENDÓCRINAS DO ESTÔMAGO E INTESTINO MÉDIO DE  
PEIXES (Teleostei) DE ÁGUA DOCE, COM DIFERENTES HÁBITOS  
ALIMENTARES**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, para  
obtenção do título de “Magister  
Scientiae”.

APROVADA em: 20 de fevereiro de 2002



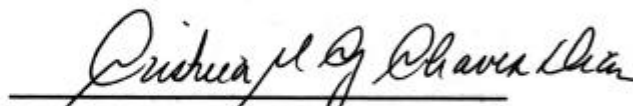
Prof<sup>ª</sup> Eliane Menin  
(Conselheira)



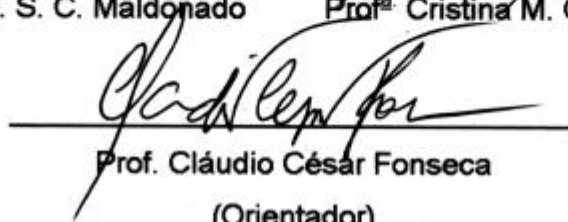
Prof. Tarcísio A. R. de Paula  
(Conselheiro)



Prof<sup>ª</sup> Izabel R. S. C. Maldonado



Prof<sup>ª</sup> Cristina M. G. Chaves Dias



Prof. Cláudio César Fonseca  
(Orientador)

À minha Mãe Jane França Castro  
e em memória de meu Pai José dos  
Santos Siqueira Castro.

À minha amada esposa Jane  
Cristina Lacerda P. França.

Em memória de minha avó Filó.

À energia positiva deste Universo.

“Se não morre aquele que escreve um livro ou planta uma árvore, com mais razão não morre o educador que semeia a vida e escreve na alma.”

“Não há duas ciências: há a ciência e as aplicações da ciência. O público e os governos crêem que a ciência aplicada é a única útil. É um erro profundo. É preciso que o povo saiba que a ciência que chamamos de teórica ou pura é que criou todos os conhecimentos que são a base da ciência aplicada. Quando as ciências teóricas se empobrecem, as aplicações também rareiam ou cessam. “ –

*B. A. Houssay*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Veterinária, pela oportunidade de realizar uma pós-graduação com base sólida.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado, essencial para o período de minha pós-graduação.

Ao Mestre Dr. Cláudio César Fonseca, pela amizade, dedicação e orientação durante todo o curso, bem como ao auxílio na confecção deste trabalho.

À Mestre Dr<sup>a</sup>. Eliane Menin, pela amizade, compreensão e aconselhamento durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Tarcísio A. R. de Paula, na qualidade de conselheiro, pelas sugestões e amizade.

Ao Dr. Yochi Sato, pesquisador da Estação de hidrobiologia e piscicultura de Três Marias, Minas Gerais, pela doação do material biológico e auxílio na coleta.

À Dr. Izabel R. dos Santos Maldonado, Dr. Sérgio P. da Matta, MS. Clóvis A. Neves e Dr. Silvia Pompolo do Departamento de Biologia Geral pela amizade, apoio e orientação para o uso do programa de análise de imagem.

À minha mãe Jane França Castro, ao meu pai José dos Santos Siqueira Castro (“in memoriam”) e minha esposa Jane Cristina Lacerda P. França pelo apoio inestimável, incentivo constante e pelo amor.

Aos amigos do Setor de Morfologia do Departamento de Veterinária da UFV: Prof. Marco Túlio, Prof. Laércio, Luciano, a mestrande e colega de trabalho Flaviana, ao colega doutorando Deyler, ao colega mestrando Prof. Juan Carlos.

Aos amigos da República Elo Perdido: Ney, Aécio e Natália, Jaime, Renè, Paulo, Webel, Mauro e Aurélia e Marco Aurélio.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho e concretamente para minha formação profissional.

## **BIOGRAFIA**

Eduardo França Castro, filho de José dos Santos Siqueira Castro e Jane França Castro, nasceu em 26 de agosto de 1974, em Leopoldina, Minas Gerais.

Em 1994 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Morfologia, vindo a terminá-lo em março de 1999, obtendo os títulos de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

Em abril de 1999 iniciou o curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, na área de Morfologia, tendo como linha de pesquisa: “Estudos morfo-fisiológicos em diferentes espécies animais”.

## RESUMO

CASTRO, Eduardo França, M.S., M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2002. **Estudos histoquímico e histoquantitativo de células endócrinas do estômago e intestino médio de peixes (Teleostei) de água doce, com diferentes hábitos alimentares.** Orientador: Cláudio César Fonseca. Conselheiros: Eline Menin e Tarcízio Antônio Rego de Paula.

Células endócrinas do sistema neuroendócrino gastroenteropancreático desempenham diversas funções na fisiologia da digestão, no entanto estudos a respeito destes tipos celulares em peixes de água doce nativos são escassos, além de servirem como subsídios morfofisiológicos para pesquisas sobre nutrição, com conseqüente aumento da produção da piscicultura no Brasil. Foram utilizadas três espécies de Teleostei de água doce com diferentes hábitos alimentares os quais foram estudados a organização estrutural microscópica da parede de diferentes regiões do tubo digestivo, a presença, determinação da média e distribuição de células endócrinas nos diversos segmentos do tubo digestivo. Os espécimes foram coletados, identificados e submetidos aos procedimentos de rotina para obtenção dos constituintes do aparelho

digestório, processamento do material para inclusão e coloração em parafina. Os resultados obtidos evidenciaram que a estrutura da parede do estômago e intestino médio das espécies estudadas não apresentou diferenças significativas entre a quantidade de células argirófilas no estômago (0,0021 células/mm<sup>2</sup>) e intestino médio proximal (0,00045 células/mm<sup>2</sup>) e distal (0,0007 células/mm<sup>2</sup>) das espécies, nem entre as espécies estudadas. Contudo, há necessidade de mais estudos sobre o sistema neuroendócrino gastroenteropancreático, a fim de embasar futuras pesquisas na área da filogenia, fisiologia, morfologia, patologia e nutrição.

## ABSTRACT

CASTRO, Eduardo França, M.S., Universidade Federal de Viçosa, february of 2002. **Studies histochemistry and histoquantitativo of endocrine cells of the stomach and medium intestine of fish (Teleostei) of fresh water, with different alimentary habits.** Adviser: Cláudio César Fonseca. Committee members: Eliane Menin and Tarcízio Antônio Rego de Paula.

Endocrine cells of the gastroenteropancreatic neuroendocrine system carry out several functions in the physiology of the digestion, however studies regarding these cellular types in fish of fresh water native are scarce, besides they serve as morpho-physiological subsidies for researches about nutrition, with consequent increase of the production of the fish farming in Brazil. Three species of Teleostei of fresh water were used with different alimentary habits which they were studied the microscopic structural organization of the wall of different areas of the alimentary canal, the presence, determination of the average and distribution of endocrine cells in the several segments of the alimentary canal. The specimens were collected, identified and submitted to the

routine procedures for obtaining of the digestory apparatus constitutives, processing of the material for imbedding in paraffin and coloration. The obtained results evidenced that the structure of the wall of the stomach and medium intestine of the studied species didn't present significant differences with the amount of argirophil cells in the stomach (0,0021 cells/mm<sup>2</sup>) and proximal medium intestine (0,00045 cells/mm<sup>2</sup>) and distal medium intestine (0,0007 cells/mm<sup>2</sup>) of the species, nor enter the studied species. However, there is need of more studies on the system neuroendocryne gastroenteropancreatyc, in order to base future researches in the area of the phylogenia, physiology, morphology, pathology and nutrition.

## ÍNDICE

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. <u>INTRODUÇÃO</u> .....	1
2. <u>REVISÃO DE LITERATURA</u> .....	4
2.1. MORFOLOGIA DO APARELHO DIGESTÓRIO DE PEIXES .	4
2.2. RELAÇÃO ENTRE OS HÁBITOS ALIMENTARES E A ESTRUTURA DO APARELHO DIGESTÓRIO DE PISCES – TELEOSTEI .....	6
2.3. SISTEMA NEUROENDÓCRINO .....	9
2.3.1. <u>Considerações gerais</u> .....	9
2.3.2. <u>Origem embriológica</u> .....	13
2.3.3. <u>Filogenia das células neuroendócrinas</u> <u>gastroenteropancreáticas</u> .....	13

2.3.4. <u>Células endócrinas gastroenteropancreáticas</u> .....	13
2.3.5. <u>Mediadores químicos do sistema neuroendócrino gastroenteropancreático</u> .....	15
2.3.6. <u>Patologia e o sistema neuroendócrino</u> .....	18
2.4. <b>CÉLULAS ENDÓCRINAS GASTROENTERO PANCREÁTICAS DE PEIXES</b> .....	20
2.4.1. <u>Distribuição no aparelho digestório de Peixes</u> .....	20
2.4.1.1. Células endócrinas presentes no intestino cefálico .....	20
2.4.1.2. Células endócrinas presentes no intestino anterior .....	20
2.4.1.3. Células endócrinas presentes no intestino médio e posterior .....	21
2.4.1.4. Células endócrinas presentes nas glândulas anexas .....	22
2.4.2. <u>Efeitos fisiológicos no aparelho digestório de Peixes.</u>	26
3. <u>MATERIAL E MÉTODOS</u> .....	28
3.1. ANIMAIS .....	28
3.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS EXEMPLARES .....	28
3.3. COLETA E FIXAÇÃO DOS ÓRGÃOS CONSTITUINTES DO APARELHO DIGESTÓRIO .....	31
3.4. PROCESSAMENTO DO MATERIAL .....	32
3.4.1. <u>Inclusão e confecção de lâminas histológicas</u> .....	32
3.4.2. <u>Técnicas de coloração</u> .....	32
3.5. ANÁLISE DAS PREPARAÇÕES HISTOLÓGICAS .....	34
3.5.1. <u>Identificação e quantificação de células endócrinas</u> ...	35
3.5.2. <u>Identificação de células caliciformes no intestino</u> .....	35
3.5.3. <u>Análise histoquímica das células mucosas do estômago</u> .....	35
3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	35

3.7. FOTOMICROGRAFIA .....	36
4. <b>RESULTADOS</b> .....	37
4.1. <i>Prochilodus marggravii</i> .....	37
4.1.1. <u>Organização histológica</u> .....	37
4.1.2. <u>Células calciformes no intestino médio</u> .....	43
4.1.3. <u>Células mucosas no estômago</u> .....	44
4.1.4. <u>Identificação e quantificação de células argirófilas</u> .....	45
4.2. <i>Leporinus reinhardti</i> .....	48
4.2.1. <u>Organização histológica</u> .....	48
4.2.2. <u>Células calciformes no intestino médio</u> .....	54
4.2.3. <u>Células mucosas no estômago</u> .....	56
4.2.4. <u>Identificação e quantificação de células argirófilas</u> .....	57
4.3. <i>Salminus brasiliensis</i> .....	59
4.3.1. <u>Organização histológica</u> .....	59
4.3.2. <u>Células calciformes no intestino médio</u> .....	64
4.3.3. <u>Células mucosas no estômago</u> .....	65
4.3.4. <u>Identificação e quantificação de células argirófilas</u> .....	66
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DE CÉLULAS ARGIRÓFILAS ENTRE AS ESPÉCIES ESTUDADAS .....	69
5. <b>DISCUSSÃO</b> .....	70
6. <b>RESUMO E CONCLUSÃO</b> .....	75
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	77
APÊNDICE A .....	86
APÊNDICE B .....	99
APÊNDICE C .....	100
APÊNDICE D .....	101

<b>APÊNDICE E .....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICE F .....</b>	<b>103</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil, dada a sua grande extensão territorial e a predominância de climas úmidos, tem uma extensa rede hidrográfica. Em muitos trechos, os rios apresentam enorme potencial hidroelétrico, que vem sendo explorado há algum tempo, com a criação de várias hidroelétricas: Três Marias, no rio São Francisco; Itaipú, no Rio Paraná; Tucuruí, no rio Tocantins dentre outras.

Essas hidroelétricas apresentam em sua estrutura grandes lagos artificiais, que segundo BRITSKI et al. (1988) têm despertado o interesse para o estudo das espécies de peixes de água doce no país. Desta forma o conhecimento da biologia das espécies é indispensável para um maior desenvolvimento da piscicultura (GOMIDE, 1996), que tem importância relevante, pois representa uma fonte alternativa de alimento para o homem.

MENIN (1988) citou aspectos conspícuos do aparelho digestório dos Teleostei que têm estimulado o interesse de vários pesquisadores: a) grande variação estrutural; b) presença de características anatômicas e

histológicas específicas com relação a diferentes hábitos e comportamentos alimentares, o que torna possível inferir a respeito da alimentação de espécies de valor comercial.

Como a piscicultura brasileira ainda não atingiu um bom desenvolvimento tecnológico, existe carência de informações sobre características biológicas da maioria das espécies nativas utilizadas como criação (GOMIDE, 1996).

Atualmente já é reconhecida a importância dos estudos morfológicos do aparelho digestório de peixes para o desenvolvimento de uma piscicultura competitiva, no entanto, tem sido muito comum, a criação de peixes nativos sem o prévio conhecimento de suas adaptações tróficas, acarretando conseqüências no custo da produção, deficiência alimentar e alto índice de mortalidade (SANTOS, 1999).

Pesquisas a respeito da morfofisiologia do tubo digestivo de espécies nativas são indispensáveis para embasar estudos direcionados para a sua criação, visando aumentar a produtividade e diminuir custos de produção e mortalidade. Além disso, tais estudos propiciarão embasamento para o repovoamento por espécies nativas, de grandes massas de água continentais, melhorando o condicionamento dos ecossistemas e repovoando espécies em áreas atualmente despovoadas.

Pelo exposto, um dos direcionamentos possíveis deste estudo é a análise morfológica e morfométrica das células endócrinas gastroenteropancreáticas. Esse sistema endócrino juntamente com a regulação entero-neural, controlam a secreção de outros elementos celulares endócrinos, dos complexos enzimáticos e de secreções digestivas, como a bile e a secreção pancreática; contribuindo para os processos digestivos, que propiciam absorção dos nutrientes necessários para o desenvolvimento normal e a manutenção da homeostase animal.

Portanto, o estabelecimento dos padrões morfológicos e morfométricos do sistema endócrino gastroenteropancreático fornecerá subsídios para o entendimento de possíveis relações entre aspectos morfológicos e fisiológicos dos processos digestivos.

Baseados nos relatos anteriores nos propusemos a: descrever a organização microscópica estômago e intestino médio de *Prochilodus marggravii* (Curimba), *Leporinus reinhardti* (Piau-três-pintas) e *Salminus brasiliensis* (Dourado); verificar a presença de células endócrinas no estômago e intestino médio de *Prochilodus marggravii* (Curimba), *Leporinus reinhardti* (Piau-três-pintas) e *Salminus brasiliensis* (Dourado); determinar a média e distribuição de células endócrinas no estômago e intestino médio de *Prochilodus marggravii* (Curimba), *Leporinus reinhardti* (Piau-três-pintas) e *Salminus brasiliensis* (Dourado); verificar se o hábito alimentar interfere na distribuição e quantidade de células endócrinas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. MORFOLOGIA DO APARELHO DIGESTÓRIO DE PEIXES**

Os Teleostei apresentam grande diversidade de hábitos e comportamentos alimentares e elevado grau de variação estrutural em seu aparelho digestório, o qual é organizado estruturalmente em cavidade buco-faringeana, tubo digestivo constituído geralmente de esôfago, estômago e intestino, e as glândulas anexas, fígado e pâncreas (ROMER & PARSONS, 1985).

O tubo digestivo das diferentes espécies de Teleostei apresenta estrutura anatômica variada, entretanto, poucas são as particularidades anatômicas que possam servir como referência para a diferenciação topográfica de suas regiões. BÉRTIN (1958) dividiu o tubo digestivo baseado nos aspectos embriológicos em: a) intestino cefálico, correspondendo à cavidade bucal e à faringe; b) intestino anterior, compreendendo o esôfago, estômago (se presente), até o orifício dos canais hepatopancreáticos, ou, até a válvula pilórica quando esta existir; c) intestino médio, intestino propriamente dito, cujo limite posterior é

marcado pela válvula íleo-retal ou por glândulas retais; d) intestino posterior, inclui o reto (quando presente) e o ânus. Esta divisão foi a adotada, uma vez que é a mais utilizada no Brasil (MENIN, 1988; GOMIDE, 1996; SEIXAS FILHO, 1998; SANTOS, 1999; SOUZA, 1999).

PREJS (1981) relata que as características morfológicas de cada um desses segmentos apresenta variação de acordo com seus hábitos alimentares, variações intra e interespecífica e durante as fases de seu desenvolvimento ontogenético.

Todos os peixes apresentam tecido pancreático exócrino e endócrino sendo grande a variação morfológica, além disso a variação de tipos celulares endócrinos reflete as distâncias filogenéticas e a diferenciação durante a evolução (EPPLLE, 1969). Este autor relata ser possível diferenciar quatro tipos de pâncreas (Figura 1A):

a) tipo ciclóstomo: com separação total entre o tecido pancreático endócrino e o exócrino (Figura 1.a.A);

b) tipo gnátostômio primitivo: com pâncreas distinto e compacto, no qual o tecido endócrino organizado em ductos se assemelha aos estádios iniciais da formação das ilhotas do pâncreas humano (Figura 1.b.A);

c) tipo semelhante aos dos tetrápodos: pâncreas compacto apresentando ilhotas típicas (Figura 1.c.A);

d) tipo actinopterígio: apresentando tendência a disseminação do pâncreas, espalhado na cavidade do corpo e em vários órgãos (fígado, baço e ovário), e com uma parcial separação do tecido endócrino e exócrino (Figura 1.d.A).

O pâncreas endócrino dos Actinopterigeos (Chondrostei, Holostei e Teleostei) é observado sob a forma de folículos envolvidos por uma cápsula conjuntiva incompleta, denominado corpo de Brockman, ou ilhota principal (EPPLLE, 1969; STEFAN & FALKMER, 1980).

## **2.2. RELAÇÃO ENTRE OS HÁBITOS ALIMENTARES E A ESTRUTURA DO APARELHO DIGESTÓRIO DE PEIXES - TELEOSTEI**

Os peixes representam quase a metade dos Vertebrata viventes e constituem um grupo extremamente variado, ocupando diferentes nichos ecológicos e níveis tróficos, além de apresentar amplo espectro alimentar (POUGH et al., 1993).

Existem várias classificações de peixes quanto aos hábitos alimentares. ANGELESCUS & GNERI (1949), NIKOLSKY (1963) e CASTAGNOLLI (1992) relacionaram o hábito alimentar com o tipo de boca, por ser ela responsável pela seleção e captura do alimento. Já PREJS (1981), relacionou o hábito alimentar de acordo com a natureza do alimento ingerido, existindo três categorias, de limites imprecisos:

- a) Herbívoros, subdivididos de acordo com a espécie de alimento ingerido e as condições ecológicas em: fitoplanctófago; macrofitófago; perifitófago e detritófago;
- b) Carnívoros, também, subdivididos de forma semelhante, em: zooplanctófagos; bentófagos e ictiófagos;
- c) Onívoros.

As características anatômicas, morfométricas e funcionais do aparelho digestório em peixes variam segundo seus hábitos alimentares, estando sempre relacionado às adaptações tróficas (ANGELESCUS & GNERI, 1949). PREJS (1981) associou a anatomia do intestino cefálico com seleção, captura, orientação e predação pré-digestiva do alimento. O autor citou, por exemplo, que a forma e posição da boca, as dentições maxilares, as áreas faringianas e a presença ou não de rastros branquiais, mostram estreita relação com a forma de alimentação e o tipo de alimento.

Assim como NIKOLSKI (1963) e PREJS (1981), CASTAGNOLLI (1992) relacionou o hábito alimentar com o tipo de boca, por ser ela responsável pela seleção e captura do alimento, classificando os peixes em cinco categorias: os carnívoros cuja boca, geralmente terminal, ampla, pode apresentar dentes pontiagudos para captura da presa; os herbívoros ou frugívoros nos quais a boca não é tão ampla, quanto a dos carnívoros, e os dentes não são pontiagudos, mas têm forma truncada; os raspadores

apresentando com boca ventral, lábios grossos, dentes muito pequenos; os iliófagos apresentando boca terminal, lábios grossos, dentes muito pequenos ou ausentes, alimentam-se do lodo depositado no fundo, sugando as substâncias nele depositadas; os onívoros com boca terminal, pequena, dentes pouco desenvolvidos, alimentam-se de vegetais, insetos, aranhas e restos de alimento.

ANGELESCUS & GNERI (1949) citaram como características estruturais e fisiológicas gerais do aparelho digestório de peixes onívoros: a ausência de estômago especializado; o grande comprimento do tubo digestivo, o que se relaciona com a ampliação da superfície de absorção dos nutrientes; a atividade fisiológica uniforme em toda extensão dos intestinos médio e posterior; e um sistema hepato-pancreático desenvolvido.

Em espécies carnívoras foram encontradas uma ou mais das seguintes características anatômicas: boca geralmente terminal, fenda bucal ampla, mucosa da cavidade bucofaringeana lisa, dentes orais e faríngeos do tipo preensor, placas dentíferas dispostas nos arcos branquiais, rastros branquiais curtos e escassos (NIKOLSKY, 1963; MENIN & MIMURA, 1991; CASTAGNOLLI, 1992).

ANGELESCUS & GNERI (1949), MENIN (1988) e MENIN & MIMURA (1992 e 1993<sub>a,b</sub>) descreveram as adaptações tróficas encontradas em espécies iliófagas, relacionadas a anatomia do aparelho digestório, como o observado em peixes do gênero *Prochilodus*. A boca é semi-ventral; os lábios são espessos, com capacidade de protração e retração, e com dentição labial, formando um disco suctório raspador; a região pilórica do estômago extremamente desenvolvida, semelhante a uma moela, com túnica muscular espessa (*Prochilodus marggravii* e *P. reticulatus*); o intestino médio é longo e enovelado, com pregas valvulares e forma de meia-lua encontradas nos dois últimos terços de sua extensão, assim como no intestino posterior; e os cecos pilóricos que, juntamente com as pregas da mucosa intestinal e o longo comprimento do intestino, ampliam a superfície de absorção de nutrientes.

Entre os Teleostei, existem variações na estrutura, na forma e no tamanho do tubo digestivo. Alguns possuem estômago morfologicamente

diferenciado, em outros este é de difícil a diferenciação do intestino, existindo ainda peixes agástricos (NIKOLSKI, 1963).

O comprimento do tubo digestivo mostra uma estreita relação com o hábito alimentar, havendo variação no comprimento do tubo digestivo de peixes adultos; em peixes carnívoros o comprimento do tubo digestivo varia 0,8 vezes em relação ao comprimento longitudinal de seu corpo; em peixes insetívoros 1,0 vez; em micrófagos 6,0 a 7,5 vezes. Assim, em peixes predadores e carnívoros o tubo digestivo, em geral, é curto; nos peixes onívoros o comprimento, em geral, é maior; nos herbívoros o tubo digestivo, em geral, atinge o maior comprimento de todos, chegando a ser várias vezes o comprimento corporal. Desta forma, um estudo morfofuncional do tubo digestivo de peixes pode indicar o tipo de alimento que eles são capazes de consumir (ANGELESCU & GNERI, 1949; PREJS, 1981; MENIN, 1988).

Segundo ANGELESCU & GNERI (1949), a cada tipo de regime alimentar correspondem características definidas do aparelho digestório, ou, em alguns de seus órgãos, de acordo com o grau de especialização.

Os hábitos alimentares podem se modificar, em uma mesma espécie, de acordo com o habitat, a natureza do alimento, a estação do ano, a idade, ou o sexo. As mudanças dos hábitos alimentares, produzidas à medida que o peixe se desenvolve, são acompanhadas por variações marcantes na morfologia do aparelho digestório, como na boca e na estrutura do tubo digestivo (PREJS, 1981).

## **2.3. SISTEMA NEUROENDÓCRINO**

### **2.3.1. Considerações gerais**

Os animais necessitam de alimento para prover energia necessária para permanecerem vivos e manterem seus diversos processos fisiológicos e físico-químicos; servir como matéria-prima dos constituintes moleculares de suas células e meios intercelulares; e propiciar o desenvolvimento normal, a saúde e a reprodução do indivíduo. Para isso, o aparelho digestório desempenha o papel ímpar de capturar e digerir o alimento, tornando-o disponível para absorção pelo organismo (SCHMIT-NIELSEN, 1996) .

Há várias décadas, muitos autores têm estudado a morfologia e fisiologia do aparelho digestório de várias espécies, de diferentes categorias taxonômicas. Estas pesquisas são indispensáveis para o desenvolvimento concreto da nutrição, além de embasar estudos direcionados para a sua criação, visando aumentar a produtividade e diminuir custos de produção.

Neste sentido, o conhecimento sobre o sistema neuroendócrino gastroenteropancreático torna-se indispensável, uma vez que este controla a secreção de outros elementos celulares endócrinos, dos complexos enzimáticos e de secreções digestivas, como a bile e secreção pancreática; contribuindo para os processos digestivos, culminando com a absorção dos nutrientes. Em adição, tal conhecimento fornece subsídios para o entendimento de possíveis relações entre aspectos morfológicos e fisiológicos dos processos digestivos.

O organismo constantemente recebe estímulos externos e internos que tendem a romper o seu equilíbrio dinâmico, sendo o mesmo capaz de responder, de maneira coordenada e apropriada (DICKSON, 1996; NULAND, 1998). Os sistemas nervoso e endócrino, através dos mensageiros químicos (ou mediadores químicos), são os principais responsáveis pela manutenção da constância do meio interno.

Os mediadores químicos são substâncias químicas capazes de mediar ações metabólicas, relacionadas com a manutenção das funções fisiológicas normais, tendo importância direta para a homeostase e sobrevivência do organismo (GANONG, 1998).

Segundo DICKSON (1996) a ação dos mensageiros químicos na célula alvo se dá devido principalmente a:

- a) ativação de enzimas celulares;
- b) influência sobre o movimento de substâncias ou íons entre compartimentos celulares ou entre os meios intracelular e extracelular;
- c) indução de síntese protéica.

Uma célula endócrina recebendo estímulo químico, proveniente da circulação, do lúmen ou de uma sinapse, desencadeia o processo de exocitose dos grânulos ou vesículas secretoras (ALBERTS et al., 1997).

A exocitose é controlada diretamente pela concentração de cálcio presente no citoplasma da célula, e envolve a participação de várias proteínas: as presentes no grânulo de secreção (sinaptofisinas, sinaptotagminas e sinaptobrevinas), na membrana plasmática (SNAP-25 e sintaxinas) e no citoplasma da célula ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -SNAP, NSF-ATP e outras proteínas) (Figura 2A) (GRATZE, 1994; ALBERTS et al., 1997).

ALBERTS et al. (1997), descreveram o mecanismo de exocitose das vesículas, ou, grânulos de secreção de células e relataram que a ligação da NSF-ATP se dá apenas após a seguinte interação: sinaptobrevina-SNAP25-sintaxina-alfa, beta e gama SNAPs. A partir daí, este complexo juntamente com auxílio de acetil-CoA e outras proteínas solúveis ainda não totalmente seqüenciadas, catalisam a fusão das duas membranas, permitindo a liberação do mediador químico. Após a fusão, a NSF hidrolisa o ATP, ocorrendo a liberação das proteínas do complexo, que podem reiniciar um novo ciclo.

Os mensageiros químicos após sua exocitose podem desencadear ações fisiológicas, podendo estas serem classificadas de acordo com a localização da célula produtora e liberadora do mediador em relação à célula alvo, bem como o caminho percorrido pelo mediador até atingir o alvo (GANONG, 1993; POLAK et al., 1993; ALBERTS et al., 1997; DICKSON, 1996; REHFELD, 1998) (Figura 3A):

- a) Telócrina, ou endócrina: o mediador sofre exocitose mediada por estímulo, sendo transportado pela corrente sanguínea até

- atingir a célula alvo, que apresenta receptores específicos (Figura 3.1A);
- b) Neurócrina: comunicação química específica entre um neurônio e outra célula (neurônio ou célula alvo - efetor) (Figura 3.2A);
  - c) Parácrina: o sinal químico é liberado no meio intersticial e atua nas células circunvizinhas (Figura 3.3A);
  - d) Autócrina: a substância mediadora sofre exocitose para o interstício e se liga a receptores presentes na própria célula, ou em células do mesmo fenótipo (Figura 3.4A);
  - e) Espermatócica: ocorre exclusivamente entre as células germinativas, durante o reconhecimento espécie-específico (Figura 3.5A);
  - f) Exócrina: sempre o agente é secretado para o meio externo.

O sistema endócrino atua através da produção de mediadores químicos, controlando, ou, influenciando muitas ações fisiológicas, as quais, SCHMIT-NIELSEN (1996) dividiu em cinco áreas funcionais básicas: digestão e funções metabólicas; osmorregulação, excreção, metabolismo de água e sais; metabolismo de cálcio; crescimento e alterações morfológicas; órgãos reprodutores e reprodução. Destas, a presença e provável relação das células endócrinas com processos metabólicos que culminam com a digestão, particularmente devido a sua abundância e localização no aparelho digestório é o foco desta revisão de literatura.

O aparelho digestório desempenha funções relacionadas com a captação, processamento, absorção de nutrientes e água do alimento, culminando com a eliminação das substâncias não aproveitáveis, processos esses necessários no desenvolvimento normal e manutenção da homeostase animal (MORBERG, 1989; DICKSON, 1996; GUYTON & HALL, 1997).

Para que o aparelho digestório desempenhe suas funções de maneira adequada, há necessidade de que os seguintes fatores estejam funcionando perfeitamente (GUYTON & HALL, 1997):

- a) movimentação do alimento ao longo do tubo digestivo;
- b) secreções digestivas;
- c) ambiente adequado para o funcionamento das enzimas digestivas;
- d) absorção de produtos da digestão, como aminoácidos, mono e dissacarídeos, ácidos graxos, nucleotídeos, água e eletrólitos.

Tais ações estão sob controle direto da integração entre o sistema nervoso (intrínseco e extrínseco) e endócrino. Por exemplo, os processos secretores, absorptivos e motores do aparelho digestório são controlados por uma combinação bastante complexa de mediadores químicos, que por sua vez se interrelacionam com células endócrinas e, também, com neurônios, formando o chamado sistema neuroendócrino (FALKMER, 1993; SANTOS & ZUCOLOTO, 1996).

O sistema neuroendócrino pode ser dividido em três partes, de acordo com a sua complexidade estrutural (FALKMER, 1993) (Figura 4A):

- a) células e fibras nervosas do sistema nervoso central e periférico;
- b) células neuroendócrinas disseminadas na mucosa do tubo gastrointestinal, pâncreas e fígado;
- c) células neuroendócrinas no parênquima e glândulas endócrinas, como na adenohipófise, células C da glândula tireóide, paratireóide, medula da adrenal e ilhotas pancreáticas.

LANGLEY (1994) cita alguns critérios atualmente aceitos para definir as células do sistema neuroendócrino:

- a) produção de neurotransmissores/neuromoduladores ou neuropeptídeos;
- b) os peptídeos devem estar contidos em grânulos secretores, os quais sofrem processo de exocitose regulada por um estímulo externo.

O sistema endócrino gastroenteropancreático é constituído de neurônios, fibras nervosas entéricas e células endócrinas esparsas ao longo do aparelho digestório, tubo digestivo e glândulas anexas (GANONG, 1993; GUYTON & HALL, 1997).

### **2.3.2. Origem embriológica**

A origem das células enteroendócrinas tem sido pesquisada e debatida por vários autores (DOUARIN & TEILLET, 1973; CHENG & LEBLOND, 1974; PICTET et al., 1976; FONTAINE & DOUARIN, 1977; DOUARIN, 1988; ANDREW, 1984 citado por FALKEMER, 1993). FEYTER, 1938 citado por SANTOS & ZUCOLOTO (1996) afirmou que as células enteroendócrinas eram originadas por um processo de migração local ou brotamento a partir de enterócitos, tendo portanto origem endodérmica. Entretanto, SANTOS & ZUCOLOTO (1996) revisando a respeito da origem das células endócrinas gastroenteropancreáticas relataram que vários autores indicam serem elas originadas da crista neural, portanto de origem neuroectodérmica.

### **2.3.3. Filogenia das células neuroendócrinas gastroenteropancreáticas**

FALKMER (1993) revisando a filogenia das células neuroendócrinas do tubo gastrointestinal, cita a existência de uma interrelação evolutiva referente a complexidade crescente do sistema neuroendócrino: inicialmente, o sistema neuroendócrino é composto de neurônios (Figuras 4.1A; 4.2A), ocorrendo em animais "primitivos" como os celenterados; posteriormente, surgem células neuroendócrinas na mucosa do tubo digestivo, presentes tanto em artrópodes e moluscos quanto nos vertebrados (Figuras 4.3A; 4.4A); culminando com os vertebrados, onde se verifica aumento da complexidade e diversidade do sistema neuroendócrino (Figuras 4.5A; 4.6A).

### **2.3.4. Células endócrinas gastroenteropancreáticas**

Inicialmente, as células do Sistema Endócrino Difuso, foram consideradas como uma população homogênea, e classificadas, de

acordo com suas propriedades de coloração em: células acidófilas; células argirófilas; células argentafins; células cromo-argentafins; células argentófilas; células amarelas.

SANTOS & ZUCOLOTO (1996) revisando a história das células endócrinas do sistema endócrino difuso, citaram que estas foram classificadas, posteriormente, como enterocromafins por apresentarem propriedades de coloração semelhantes às observadas pelas células da medula da adrenal (células cromafins).

Com o avanço na área de identificação celular, foi observado que as células enterocromafins, por meio de métodos histoquímicos específicos, tinham a capacidade de reter e precipitar sais de prata em seus grânulos citoplasmáticos, passando então a ser denominadas de células argentafins. Já outras, que captavam os sais de prata em seus grânulos e não os reduziam naturalmente, havendo a necessidade de se aplicar agentes redutores externos, foram denominadas de células argirófilas (POLAK et al., 1993; LANGLEY, 1994; SANTOS & ZUCOLOTO, 1996).

Atualmente, as células endócrinas do sistema neuroendócrino gastroenteropancreático recebem uma nomenclatura que utiliza o alfabeto latino: A, B, D, D1 e outras.

As células endócrinas do tubo digestivo estão localizadas ao longo da mucosa do mesmo e em glândulas anexas. São caracterizadas pela presença de numerosos grânulos secretores, sendo estes, heterogêneos em relação ao tamanho, forma e densidade, de um tipo celular para outro (FORSSMANN et al., 1969). Seu citoplasma é claro, podendo apresentar microvilosidades desenvolvidas em sua superfície apical.

As células endócrinas gastroenteropancreáticas podem ser divididas em dois tipos (Figura 5A), em relação ao contato de sua superfície apical com o meio externo (FUJITA et al., 1973 apud FONSECA 1996; FUJITA et al., 1981 apud SANTOS & ZUCOLOTO, 1996):

- a) células do Tipo Aberto: cujo ápice alcança a superfície da mucosa; respondendo a estímulos provenientes do mesmo, como substâncias químicas ou alterações no pH;
- b) células do Tipo Fechado: cujo ápice não atinge a superfície da mucosa; estas células respondem a

estímulos hormonais, provenientes da corrente sanguínea e, ou, devido à distensão da mucosa do tubo digestivo, causada pela passagem do bolo ou quimo alimentar.

Após a estimulação destas células, ocorre a exocitose, com conseqüente liberação dos mediadores químicos dos grânulos secretores, que, por sua vez, desencadeiam efeitos que podem ter ação autócrina, parácrina, endócrina e, ou neurócrina (Figuras 3A e 5A), que irão regular localmente, ou não, células, tecidos ou órgãos, contribuindo para a motilidade e as secreções do tubo digestivo (BROWN, 1993; PONTER & DUVAUX-PONTER, 1993; DOCKRAY et al., 1996; REHFELD, 1998).

### **2.3.5. Mediadores químicos do sistema neuroendócrino gastroenteropancreático**

Atualmente, sabe-se que há uma enorme diversidade estrutural e bioquímica de mediadores químicos liberados pelo sistema neuroendócrino gastroenteropancreático, podendo ser estes aminas biogênicas (serotonina ou histamina), polipeptídeos ou peptídeos (GANNONG, 1993). Estas descobertas só foram possíveis devido ao desenvolvimento de métodos e equipamentos de identificação, avanços alcançados nas áreas de bioquímica, imunologia, histoquímica, biologia celular e molecular, principalmente, a partir da década de 1970 (REHFELD, 1998) (Figura 6A).

SNYDER (1980) apud SANTOS & ZUCOLOTO (1996) citou que inicialmente tais substâncias reguladoras foram encontradas apenas no eixo gastroenteropancreático, mas subseqüentemente, foram isoladas de neurônios do sistema nervoso central e periférico, nos quais atuam como neurotransmissores e, ou, neuromoduladores. Outras substâncias, inicialmente isoladas no cérebro, foram posteriormente identificadas em células endócrinas e, ou, no sistema nervoso entérico.

REHFELD (1998) revisando os mediadores químicos liberados pelo sistema neuroendócrino gastroenteropancreático, divide-os em:

- a) neuropeptídeos isolados tanto no sistema nervoso central quanto no sistema neuroendócrino gastroenteropancreático: Substância P, encefalinas, dinorfinas, neurotensina, neuropeptídeo Y, neurocinina, PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide), somatostatina, polipeptídeo pancreático (PP), CGRP (calcitonin gene-related peptide);
- b) peptídeos com ação hormonal: polipeptídeo inibidor gástrico (GIP), motilina, PYY (peptide tyrosine tyrosine), galanina, peptídeo semelhante ao glucagon (GLPs);
- c) peptídeos com ação hormonal e neurócrina: polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), peptídeo histidina-isoleucina, peptídeo liberador de gastrina (GRP);
- d) fatores de crescimento com efeito hormonal: fator de crescimento epidérmico (EGF), urogastrona, fator de crescimento semelhante a insulina I, fator de crescimento semelhante a insulina II, fator alterador do crescimento  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), fator alterador do crescimento  $\beta$  (TGF $\beta$ ), anfiregulina.

SANTOS & ZUCOLOTO (1996) relataram que algumas destas substâncias reguladoras estão presentes exclusivamente em células endócrinas (gastrina, secretina, enteroglucagon e GIP), enquanto outras são encontradas tanto em células endócrinas quanto em fibras nervosas e células ganglionares (somatostatina, motilina, encefalina e neurotensina). Já o VIP, bombesina, CGRP, substância P, galanina e NPY são detectados, principalmente, em neurônios.

As substâncias reguladoras do sistema neuroendócrino gastroenteropancreático podem ser separadas em diferentes famílias, utilizando critérios de similaridade estrutural, através de determinadas sequências de aminoácidos na estrutura primária das proteínas (Figura 7A) (PONTER & DUVAUX-PONTER, 1993; REHFELD, 1998):

- a) Família da secretina que contém secretina, glucagon\*, peptídeos semelhantes ao glucagon (GLPs)\*, polipeptídeo inibidor gástrico (GIP), polipeptídeo

- intestinal vasoativo (VIP)\*\* e peptídeo histamina-  
isoleucina\*\*;
- b) Família da gastrina que contém gastrina, colecistocinina (CCK), ceruleína e cionina;
  - c) Família da insulina que contém insulina, fator de crescimento semelhante a insulina e relaxina;
  - d) Família dos fatores de crescimento epidérmicos com o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de alteração do crescimento  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) e anfiregulina;
  - e) Família da somatostatina que contém somatostatina e corticostatina;
  - f) Família do polipeptídeo pancreático com o polipeptídeo pancreático, peptídeo YY, neuropeptídeo Y;
  - g) Família taquicinina com a substância P, neurocinina A, neurocinina B.

Estudos citados por FALKMER (1993) e SANTOS & ZUCOLOTO (1996) relataram que as células endócrinas gastroenteropancreáticas são sistemas multi-mensageiros, não produzem apenas uma substância reguladora; há variação no tipo de mensageiro químico produzido em diferentes condições fisiológicas e patológicas. No entanto, cada uma destas células endócrinas elimina principalmente um produto de secreção, além de estarem localizadas ao longo do tubo digestivo e das glândulas anexas a este, em locais predominantes para cada tipo celular (Quadro 1A; Figura 8A) (POLAK et al., 1993; PONTER & DUVAUX-PONTER, 1993).

Cada substância reguladora do sistema neuroendócrino gastroenteropancreático, desempenha ações fisiológicas importantes e sua liberação e controle estão relacionados com estímulos específicos, como por exemplo: a gastrina produzida pelas células G presentes, principalmente, no estômago, são liberadas (Figura 9A) devido a estímulos químicos (aminoácidos e peptídeos no lúmen gástrico), a ação reflexa do sistema nervoso entérico, a distensão da parede do estômago

---

\* e \*\* peptídeos encontrados em um gene.

com a chegada do bolo alimentar, ação do sistema nervoso central via nervo vago, ação do peptídeo liberador de gastrina, e por ação indireta do sistema nervoso por inibir células D, que por sua vez inibem a liberação de gastrina. A gastrina estimula as células parietais a liberarem HCl no lúmen do estômago (ação endócrina) (Figuras 10A e 11A), aumenta a motilidade antral, induz o crescimento da mucosa do estômago e intestino e estimula a liberação de insulina. Sua inibição se dá com a chegada do alimento no duodeno, que desencadeia o reflexo enterogástrico, e ação de outros mediadores químicos tais como a secretina, o peptídeo inibidor gástrico, peptídeo inibidor vasoativo, somatostatina e glucagon (Figura 10A) (MOBERG, 1989; POLAK et al., 1993; PONTER & DUVAUX-PONTER, 1993; HERSEY & SACHS, 1995; McINTOSH, 1995; ARGENZIO, 1996; DOCKRAY et al., 1996; HSU et al., 1999; GUYTON & HALL, 1997).

### **2.3.6. Patologia e o Sistema Neuroendócrino**

Algumas doenças e patologias têm relação direta com disfunções que ocorrem em células endócrinas gastroenteropancreáticas. POLAK et al. (1993) cita algumas destas, tais como: a Síndrome de Zollinger-Ellison, gastrinoma que leva a hipersecreção de ácido clorídrico, com o aparecimento de ulceração no estômago e duodeno; e a Síndrome de Verner-Morrison (WHDA), na qual a concentração plasmática de VIP em pacientes portadores desta síndrome é extremamente elevada (Figura 12A).

RONNBLOM et al. (1999), estudando pacientes com distrofia miotônica, verificou um aumento significativo das populações de células positivas para serotonina, colecistocinina/gastrina, secretina, GIP e somatostatina, presentes no duodeno em pacientes positivos, em relação à pacientes negativos. Esta alteração indica um distúrbio na regulação endócrina das funções do tubo digestivo, o que contribui para o desenvolvimento dos sintomas encontrados nos pacientes com distrofia miotônica.

SOEDA (1992) citado por HÖCKHER (1994) relata que em pacientes portadores da doença de Hirschprung o número de células

endócrinas do intestino coradas positivamente para PYY, somatostatina, serotonina e sinaptofisina, é maior, significativamente, quando comparado com os pacientes saudáveis.

No campo da patologia é possível que muitas doenças do tubo digestivo e várias outras sem etiologia determinada, possam estar relacionadas com alguma alteração no sistema neuroendócrino gastroenteropancreático (POLAK et al., 1993).

## **2.4. CÉLULAS ENDÓCRINAS GASTROENTEROPANCREÁTICAS DE PEIXES**

### **2.4.1. Distribuição no aparelho digestório de Peixes**

#### **2.4.1.1. Células endócrinas presentes no intestino cefálico**

Nenhuma citação da presença de células endócrinas no intestino cefálico foi obtida na literatura.

#### **2.4.1.2. Células endócrinas presentes no intestino anterior**

##### **2.4.1.2.1. Esôfago**

Na literatura consultada, não foi verificado a presença de células endócrinas na porção do intestino anterior, correspondente ao esôfago das outras classes de Vertebrata.

SANTOS (1999) em revisão de literatura sobre células argirófilas presentes no tubo digestivo de Teleostei, relata que, com exceção do esôfago, estas células têm sido observadas entremeadas às células epiteliais, na base da mucosa, entre as glândulas e, ainda, entre as células nervosas do plexo mioentérico.

##### **2.4.1.2.2. Estômago**

Vários autores detectaram células endócrinas no estômago de diferentes espécies de peixes, como *Anguila anguila* (enguia européia) (HERMITE et al., 1985), *Spaurus auratus* (ELBAL & AGULLEIRO, 1986; ABAD et al., 1987), *Barbus conchomius* (ROMBOUT et al., 1977; ABAD et al., 1987), *Cyprinus carpio* - carpa, *Tristichyts nobilis* - cabeça grande, *Hypophthalmichthys molitrix* - carpa silvestre e *Salmo salar* - salmão do atlântico (KRALJ-KLOBUCAR, 1987), *Mugil saliens* (ELBAL et al., 1988), *Hydrocynus forskahlii* (COETZEE et al., 1991), *Dicentrarchus labrax* (peixe tigre) (HERNANDEZ et al., 1994<sub>b</sub>), *Scophthalmus maximus* (REINECKE et al., 1997), *Tilapia* spp. (GARGIULO et al., 1997), *Lepisosteus osseus* (GROFF & YOUSON, 1997) e *Bricon nattereri* (SANTOS, 1999).

Com a utilização de técnicas específicas de identificação, em especial a imunocitoquímica, foram identificados vários tipos de mediadores químicos presentes em células endócrinas do estômago de peixes:

- a) Somatostatina (HERMITE et al., 1985; ELBAL & AGULLEIRO, 1986; ROMBOUT et al., 1977; ABAD et al., 1987; ELBAL et al., 1988; COETZEE et al., 1991; REINECKE et al., 1997; GROFF & YOUSON, 1997);
- b) Gastrina (ROMBOUT et al., 1977; KRALJ-KLOBUCAR, 1987; ELBAL et al., 1988; REINECKE et al., 1997);
- c) Insulina (ROMBOUT et al., 1977; REINECKE et al., 1997);
- d) Glucagon (ROMBOUT et al., 1977; GROFF & YOUSON, 1997);
- e) Polipeptídeo pancreático (ROMBOUT et al., 1977);
- f) Substância P (ROMBOUT et al., 1977; ELBAL & AGULLEIRO, 1986; ABAD et al., 1987; ELBAL et al., 1988);
- g) Peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (ROMBOUT et al., 1977; COETZEE et al., 1991);
- h) Neurotensina (ROMBOUT et al., 1977);
- i) Met-enkefalina (ROMBOUT et al., 1977);
- j) Serotonina (REINECKE et al., 1997).

#### **2.4.1.3. Células endócrinas presentes no intestino médio e posterior**

Células endócrinas foram identificadas no intestino médio e, ou posterior de diferentes espécies de peixes, como: *Barbus conchonus* (ROMBOUT, 1977); *Squalus acanthias* (EL-SALHY, 1984); *Anguilla anguilla* (enguia européia) (HERMITE et al., 1985); *Spaurus auratus* (ELBAL & AGULLEIRO, 1986); *Cyprinus carpio* - carpa, *Tristichyts nobilis* - cabeça grande, *Hypophthalmichthys molitrix* - carpa silvestre e *Salmo salar* - salmão do atlântico (KRALJ-KLOBUCAR, 1987); *Scyliorhinus stellaris* (TAGLIAFIERRO et al., 1988); *Mugil saliens* (ELBAL et al., 1988); *Dicentrarchus labrax* (HERNANDEZ et al., 1994<sub>a</sub>); *Scophthalmus maximus* (REINECKE et al., 1997); *Lepisosteus osseus* (GROFF & YOUSON, 1997); *Scyliorhinus torazame* (CHIBA, 1998); *Tilapia* spp. (GARGIULO et al., 1998).

Fazendo uso de técnicas específicas de identificação, várias células imunoreativas (IR) a diferentes tipos de mediadores químicos foram encontradas, como por exemplo:

- a) Células IR à somatostatina (REINECKE et al., 1997; EL-SALHY, 1984);
- b) Células IR à insulina (REINECKE et al., 1997; EL-SALHY, 1984);
- c) Células IR à glucagon (GROFF & YOUSON, 1997; REINECKE et al., 1997; EL-SALHY, 1984; HERMITE et al., 1985);
- d) Células IR à gastrina (REINECKE et al., 1997; ELBAL et al., 1988; EL-SALHY, 1984; ELBAL & AGULLEIRO, 1986);
- e) Células IR à serotonina (REINECKE et al., 1997; CHIBA, 1998; EL-SALHY, 1984; HERMITE et al., 1985);
- f) Células IR à polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) (REINECKE et al., 1997)
- g) Células IR à neurotensina (REINECKE et al., 1997);
- h) Células IR à colecistocinina (ELBAL et al., 1988; ELBAL & AGULLEIRO, 1986; EL-SALHY, 1984);
- i) Células IR à peptídeo inibidor gástrico (GIP) (ELBAL et al., 1988; EL-SALHY, 1984);
- j) Células IR à substância P (ELBAL et al., 1988; ELBAL & AGULLEIRO, 1986);
- k) Células IR à polipeptídeo pancreático (PP) (ELBAL et al., 1988; ELBAL & AGULLEIRO, 1986; EL-SALHY, 1984);
- l) Células IR à Met-encefalina (ELBAL et al., 1988; ELBAL & AGULLEIRO, 1986; HERMITE et al., 1985).

#### **2.4.1.4. Células endócrinas presentes nas glândulas anexas**

##### **2.4.1.4.1. Pâncreas Endócrino**

FONSECA (1996) em revisão sobre células produtoras de glucagon em peixes, relatou que a maioria dos autores descrevem células

endócrinas preferencialmente localizadas nas ilhotas pancreáticas, mas há células isoladas presentes no pâncreas exócrino.

GABE & MARTOJA (1971) estudaram as células endócrinas pancreáticas, nos corpos de Brockmann, do *Mugil auratus* (Teleostei, Mugiliformes). Identificaram células A, B e D nas ilhotas pancreáticas e um tipo celular agranular não definido.

JOHNSON et al. (1976) utilizando o método da PAP identificou nos corpos de Brockmann, em *Lophius americanus*, células imunoreativas a insulina, somatostatina e glucagon, na proporção de 9:6:4, respectivamente.

ROMBOUT et al. (1979) estudando células endócrinas pancreáticas de *Barbus conchoni* (Teleostei, Cyprinidae), verificou que estas estão concentradas nas ilhotas principais, localizadas perto da vesícula biliar, e, também, nas pequenas ilhotas, localizadas caudalmente às ilhotas principais. Distinguiram quatro tipos de células endócrinas nas ilhotas pancreáticas: células B, células D, células A<sub>1r</sub> (grânulos arredondados) e células A<sub>1fl</sub> (grânulos floculados).

STEFAN & FALKMER (1980) identificaram quatro tipos de células endócrinas no pâncreas de *Cottus scorpius* (Teleostei), concentradas nos corpos de Brockmann, ou ilhotas principais. Os corpos de Brockmann justa-pilóricos contém células imunofluorescentes a insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático; e os justa-esplênicos apresentaram células de insulina, glucagon e somatostatina. Por meio de observação ao microscópio eletrônico, observaram diferenças entre estes quatro tipos celulares, quanto a forma, tamanho e densidade eletrônica de seus grânulos secretores, o que permite que cada tipo possa ser distinguido em categorias ultraestruturais.

ROMBOUT & TAVERNE-THIELE (1982) estudando células endócrinas do pâncreas do Teleosteo *Barbus conchoni* (Cyprinidae), distinguiu quatro tipos de células imunoreativas nas ilhotas pancreáticas desta espécie: células B (imunoreativas a insulina); células D1 (imunoreativas a somatostatina); células A (imunoreativas a glucagon); e as células PP (imunoreativas ao polipeptídeo pancreático).

EL-SALHY (1984) identificou no pâncreas de adultos do peixe cachorro (*Squalus acanthias*) cinco tipos de células endócrinas, imunoreativas a insulina, somatostatina, glucagon, polipeptídeo pancreático e peptídeo inibidor gástrico (GIP). As células imunoreativas ao GIP não ocorrem nas células imunoreativas ao glucagon.

LOZANO & AGULLEIRO (1986) verificou em *Mugil auratus* e *Mugil saliens* (Teleostei) células endócrinas concentradas nas ilhotas principais, localizadas próximas da vesícula biliar, e um número em pequenas ilhotas. Por meio de métodos imunocitoquímicos identificaram células imunoreativas a insulina, glucagon, polipeptídeo pancreático e duas populações de células imunoreativas a somatostatina (D1 e D2). A célula D2 é caracterizada por grânulos que contêm uma densidade eletrônica moderada e as células D1 contêm grânulos menores e mais eletrondensos.

ABAD et al. (1986) estudando as células endócrinas pancreáticas em *Sparus auratus* (Teleostei), observaram que estas estavam concentradas em duas das três ilhotas principais (corpos de Brockmann) e em numerosas ilhotas menores, envolvidas por tecido exócrino. Através de imunocitoquímica (PAP indireto) identificaram células imunoreativas a insulina, somatostatina e polipeptídeo pancreático. As células de insulina estavam na região central das ilhotas; as de glucagon na periferia da ilhota e isoladas no tecido exócrino ao redor da ilhota principal; as de somatostatina distribuídas ao longo das ilhotas; e as de PP agrupadas na ilhota principal e nas ilhotas menores são mais numerosas e encontram-se na periferia.

HERNÁNDEZ & AGULLEIRO (1992) estudando o desenvolvimento ontogenético do pâncreas endócrino de *Dicentrarchus labrax*, por meio da técnica de PAP e microscopia de luz, constataram o aparecimento gradual de diferentes tipos de células endócrinas. Ainda no ovo surgem as células imunoreativas à somatostatina-25 (SST-25), SST-14 e insulina; com 5 a 9 dias surgem as células imunoreativas ao glucagon; e quando há a reabsorção total do vitelo surgem as células imunoreativas à polipeptídeo pancreático, PYY e NPY.

AGULLEIRO et al. (1993) identificaram, no pâncreas endócrino de *Dicentrarchus labrax*, células imunoreativas a insulina (célula B), SST-25 (célula D<sub>1</sub>), SST-14 (célula D<sub>2</sub>), glucagon (célula A) e glucagon - PP/PYY/NPY (PP-like), além de caracterizá-las por sua estrutura e pela marcação utilizando imunogold:

- a) Células marcadas com antisoro anti-insulina de salmão e bonito (células B) apresentaram numerosos grânulos secretores com um pequeno halo e “core” arredondado, poucos grânulos com um amplo halo e “core” arredondado ou com cristais. As partículas de ouro se depositaram apenas no “core” dos grânulos marcados;
- b) Células D<sub>1</sub> apresentam grandes grânulos apresentando o interior eletrôn-denso, mais escuro;
- c) Células D<sub>2</sub> apresentam grânulos secretores eletrôn-densos menores do que nas células D<sub>1</sub>, de localização periférica na célula;
- d) Células A contém vários grânulos com forma poligonal que são mais fortemente marcados e outros grânulos com o centro pouco marcado;
- e) Células imunoreativas a glucagon e PP-likes foram co-localizadas em grânulos secretores e as partículas de ouro utilizadas mostraram que não há diferença na distribuição entre os vários antisoros utilizados.

HERNANDES et al. (1994<sub>c</sub>) estudando a ontogenia do pâncreas endócrino de *Dicentrarchus labrax*, por meio de microscopia eletrônica e imunocitoquímica, verificaram a presença de células imunoreativas a somatostatina-25 (SST-25) e insulina no cordão pancreático primordial. Nos estágios sucessivos do desenvolvimento ontogenético, observaram a presença de ilhotas individuais apresentando células imunoreativas a SST-25, insulina, SST-14 e glucagon, que são respectivamente as células D<sub>1</sub>, B, D<sub>2</sub> e A, tanto do estágio larval quanto dos adultos desta espécie.

GROFF & YOUSON (1997) estudando células endócrinas no pâncreas de *Leporinus osseus*, ancestral filogenético dos actinopterígeos, por meio de técnicas imunocitoquímicas, com antisoro para detectar

insulina, somatostatina e membros das famílias do polipeptídeo pancreático (PP, aPY, NPY) e glucagon (GLUC, GLP); identificaram quatro tipos diferentes de células imunoreativas nas ilhotas, identificadas como células A, B, D e F (PP).

ERASMUS & VAN ASWEGEN (1997) utilizando método indireto da peroxidase anti-peroxidase (PAP), identificaram no pâncreas endócrino do *Arctocephalus pusillus* células imunoreativas à insulina, que são mais numerosas, células imunoreativas a glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático.

MAGLIO & PUTTI (1998) detectaram diferentes tipos de células endócrinas nas ilhotas pancreáticas de *Blennius gattoruggine*: células imunoreativas a insulina (células B), glucagon (células A), somatostatina (células D), polipeptídeo pancreático e polipeptídeo tirosina-tirosina, sendo que as células B estavam ao centro da ilhota e as demais na periferia.

LOPEZ et al. (1999) identificaram células imunoreativas a adrenomedulina (AM) no pâncreas endócrino de vários indivíduos pertencentes a diferentes grupos taxonômicos, dentre os Vertebrados, desde peixes até aves. Nas espécies de peixes estudados e em *Xenopus* (anfíbio) as células imunoreativas a adrenomedulina encontram-se apenas nas ilhotas. Os autores concluem que este novo peptídeo regulador pode estar envolvido na modulação da secreção de insulina ou na função pancreática.

YANG et al. (1999) estudando a composição e a topografia das células das ilhotas pancreáticas da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), por meio do método da imunoperoxidase, com antisoros contra insulina de tilapia, glucagon humano, somatostatina-25 de salmão, somatostatina-14 humano e polipeptídeo tirosina-tirosina (PYY) de salmão, verificou: 42,3% são imunopositivas a insulina; 11,5% são imunopositivas a glucagon; 23,1% são imunopositivas a somatostatina-25; 21,8% são imunopositivas a somatostatina-14; 1,3% são imunopositivas a PYY.

#### **2.4.2. Efeitos Fisiológicos no Aparelho Digestório de Peixes**

As células endócrinas do aparelho digestório e seus mensageiros químicos constituem um complexo sistema, que desempenha funções

relacionadas com o controle e regulação dos processos da digestão (peristalse, fluxo sanguíneo, ciclo celular do epitélio da parede) e para a homeostase e metabolismos de carboidratos (GRUBE, 1986).

BARRINGTON (1969) em revisão da fisiologia digestiva em peixes, relata que os aspectos da atividade motora e secretora do aparelho digestório tem sido pouco estudados, diferente do que é observado em mamíferos, mas independente do grupo taxonômico, tais aspectos são influenciados por um complexo sistema de controle nervoso e endócrino.

Neste sistema de controle endócrino do aparelho digestório, vários mensageiros químicos estão envolvidos, sendo que o conhecimento sobre estes baseia-se em estudos desenvolvidos em mamíferos, havendo poucos estudos em animais de outro grupo taxonômico (McINTOSH, 1995).

Ações fisiológicas de vários dos mediadores químicos encontrados no estômago de diversas espécies de peixes ainda não foram definidas, como as de:

- a) Gastrina (REINECKE et al., 1997);
- b) Somatostatina (HERMITE et al., 1985; ABAD et al., 1987; COETZEE et al., 1991; REINECKE et al., 1997; GROFF & YOUSON, 1997);
- c) Secretina (ABAD et al., 1987);
- d) Serotonina (ABAD et al., 1987; REINECKE et al., 1997);
- e) Insulina (REINECKE et al., 1997);
- f) Substância P (ABAD et al., 1987);
- g) Neurotensina (ABAD et al., 1987);
- h) VIP (COETZEE et al., 1991).

Estudos a respeito da presença de células endócrinas do aparelho digestório em espécies de peixes brasileiras são escassos na literatura, o que torna este trabalho um marco importante para enriquecer o conhecimento sobre a morfofisiologia do aparelho digestório de *Prochilodus marggravii*, *Leporinus* e *Salminus brasiliensis* espécies de grande importância zootécnica e econômica. Além disso, este estudo poderá embasar pesquisas futuras a respeito de fisiologia e nutrição destas espécies.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. ANIMAIS**

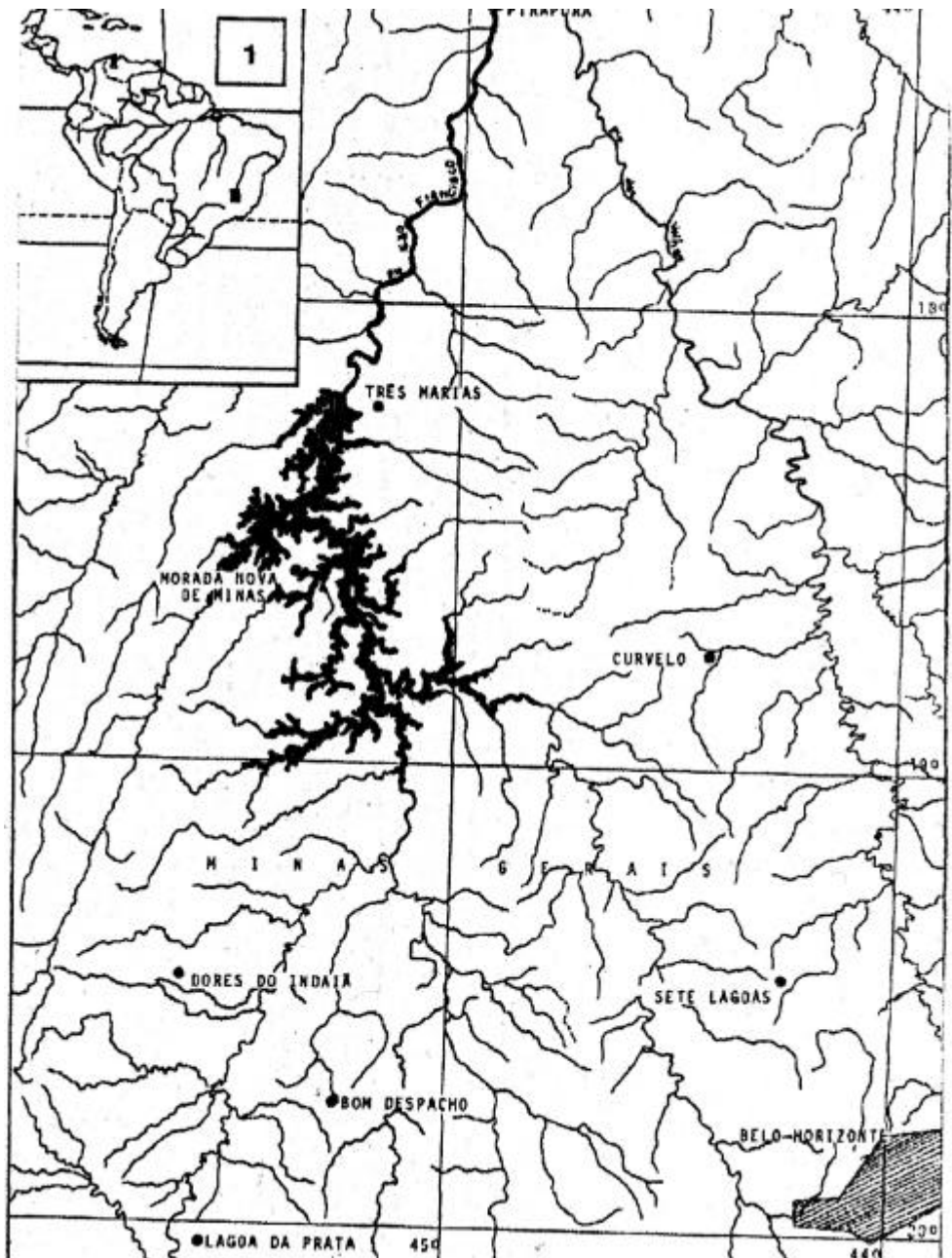
Foram utilizados dez indivíduos adultos de cada uma das espécies: *Prochilodus marggravii* (Curimba), *Leporinus reinhardti* (Piau-três-pintas) e *Salminus brasiliensis* (Dourado), os quais apresentam hábitos alimentares iliófago, onívoro e carnívoro, respectivamente.

#### **3.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS EXEMPLARES**

Os animais utilizados são provenientes da Região Sudeste do Brasil, no centro do Estado de Minas Gerais, na região do Alto do São Francisco, entre os paralelos 18<sup>o</sup> 15' e 19<sup>o</sup> 00' de latitude Sul e os meridianos 44<sup>o</sup> 48' e 45<sup>o</sup> 29' de longitude a Oeste de Greenwich, a uma altitude média de 585 metros (Figura 1).

Os espécimes encontravam-se mantidos, a dois meses, em tanques de piscicultura na Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, sendo provenientes do Rio São Francisco, região de Três Marias. Durante este período receberam o manejo alimentar adequado para cada espécie. No dia 25 de janeiro de 2000 haviam sido coletados utilizando rede de arrasto e armazenados em tanques com água corrente (Figura 3),

do Laboratório de Reprodução da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias (Figura 2), onde permaneceram em jejum por 72 horas.



**Figura 1.** Mapa da região de Três Marias, estado de Minas Gerais, onde os espécimes utilizados são provenientes.



**Figura 2.** Laboratório de Reprodução Artificial – CODESVASF



**Figura 3.** Tanques onde os espécimes permaneceram em jejum por 72 horas.

### **3.3. COLETA E FIXAÇÃO DOS ÓRGÃOS CONSTITUINTES DO APARELHO DIGESTÓRIO**

No dia 27 de janeiro de 2000 cada exemplar foi submetido aos procedimentos de rotina dos Laboratórios de Morfologia do Departamento de Veterinária e Morfofisiologia Animal do Departamento de Biologia Animal do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, a saber:

- a) contenção fisiológica, por meio de secção transversal na medula espinhal, caudalmente ao osso occipital (MENIN, 1994; SANTOS, 1999);
- b) medida do comprimento padrão (RICKER, 1968);
- c) pesagem corporal;
- d) exposição das vísceras através de incisão ventral da cavidade celomática. Nessa etapa utilizou-se solução fisiológica para Teleostei de água doce (Apêndice B), segundo HOAR & HICKMAN (1967), para limpeza;
- e) retirada das vísceras da cavidade celomática;
- f) incisão lateral desligando a cabeça do corpo e retirada de todo o aparelho digestório;
- g) limpeza externa e interna do tubo digestivo com solução fisiológica de Teleostei de água doce, na limpeza interna utilizou-se seringa e agulha para auxiliar a perfusão da solução fisiológica;
- h) perfusão do tubo digestivo com soluções fixadoras (líquido de Bouin ou formol neutro tamponado 4%) (Apêndice C);
- i) identificação e acomodação do aparelho digestório em gase;
- j) imersão em frasco contendo a solução fixadora;
- k) após 24 horas, retirada do excesso de fixador e imersão em álcool 70°;
- l) distensão e retirada do tubo digestivo através de secção cranial ao esôfago e outra caudal ao intestino posterior (ou reto);
- m) obtenção do comprimento do tubo digestivo;

- n) retirada dos fragmentos da região cárdica, cecal e pilórica do estômago, 25 e 50% do comprimento do intestino médio, denominadas respectivamente intestino proximal e distal;
- o) acomodação dos fragmentos em cassetes, previamente identificados, e imersão em álcool 70°;

### **3.4. PROCESSAMENTO DO MATERIAL**

#### **3.4.1. Inclusão e Obtenção de Lâminas Histológicas**

Fragmentos do tubo digestivo passaram pelas seguintes etapas a fim de serem incluídos em parafina (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983):

- a) desidratação em banhos com série crescente de álcoois (80, 95, Absoluto I e Absoluto II), 1 hora cada;
- b) banho em álcool absoluto e xilol (1:1) por 30 minutos;
- c) diafanização em banhos de xilol I e xilol II, 1 hora cada;
- d) imersão dos fragmentos em banhos de parafina I e II à 60°C, durante 1 hora cada;
- e) inclusão em parafina (solução de parafina com adição de cera de abelha) à 60°C; .

Os blocos obtidos foram seccionados semi-seriadamente, em micrótomo Olympus Cut 4055 II a 5 µm de espessura e 25 µm de espaçamento, e distendidos em lâminas histológicas, previamente tratadas com solução de adesão (Apêndice D). Obteve-se secções longitudinais do estômago e transversais do intestino.

De cada bloco do material fixado em Bouin ou formol neutro tamponado 10% foram obtidas lâminas, contendo 3 secções histológicas, coradas pelas técnicas de Hematoxilina-eosina (para identificação histológica do órgão), Alcian Blue (identificação de glicoproteínas ácidas), Ácido periódico de Schiff (identificação de glicoproteínas neutras) e de Grimelius (identificação de células argirófilas).

#### **3.4.2. Técnicas de coloração**

Para as colorações histológicas, as lâminas passaram pelas seguintes etapas:

- a) acondicionamento em estufa à 40°C por 2 horas;

- b) desparafinização em dois banhos de xilol, por 10 minutos cada;
- c) banho em xilol e álcool (1:1), por 5 minutos;
- d) hidratação em banhos de álcool (absoluto, 95°, 80° e 70°), por 10 minutos cada;
- e) banho em água destilada por 15 minutos.

Utilização das técnicas de coloração Hematoxilina-Eosina, Alcian Blue, Ácido Periódico de Schiff ou Grimelius.

#### **3.4.2.1. Hematoxilina de Harris – Eosina (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983)**

- a) banho com hematoxilina durante 30 segundos;
- b) 2 banhos com água destilada;
- c) banho com eosina durante 30 segundos;
- d) 2 banhos com água destilada;
- e) desidratação em série crescente de álcoois 70°, 80° e 95° por 1 minuto e absoluto I, absoluto II por 3 e 5 minutos, respectivamente;
- f) diafanização em xilol I e xilol II, rapidamente;
- g) montagem em Bálsamo do Canadá.

#### **3.4.1.2. Alcian Blue (AB – pH 2,5; McMANUS & MOWRY, 1960)**

- a) banho com AB por 15 minutos;
- b) banho com água destilada;
- c) desidratação em série crescente de álcoois 70°, 80° e 95° por 1 minuto e absoluto I, absoluto II por 3 e 5 minutos, respectivamente;
- d) diafanização em xilol I e xilol II, rapidamente;
- e) montagem em Bálsamo do Canadá.

#### **3.4.1.3. Ácido Periódico de Schiff (PAS; McMANUS & MOWRY, 1960)**

- a) banho com Ácido Periódico por 5 minutos;
- b) banho com água destilada;
- c) banho com Reativo de Schiff por 20 minutos;
- d) banho com água sulfurosa por 4 minutos;

- e) banho com água destilada;
- f) desidratação em série crescente de álcoois 70°, 80° e 95° por 1 minuto e absoluto I, absoluto II por 3 e 5 minutos, respectivamente;
- g) diafanização em xilol I e xilol II, rapidamente;
- h) montagem em Bálsamo do Canadá.

#### **3.4.1.4. Método de Grimelius (GRIMELIUS, 1968)**

- a) incubação das lâminas em solução de 80 mg de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) em tampão acetato 0,02 M pH5,6 (Apêndice E), à 60°C por 3 horas e 30 minutos;
- b) revelação em solução reveladora (Apêndice F), pré-aquecida (60°C por 1 hora), durante 1 minuto;
- c) interrupção da revelação em água destilada, pré-aquecida (60°C por 1 hora), por 10 minutos;
- d) desidratação em série crescente de álcoois 70°, 80° e 95° por 1 minuto e absoluto I, absoluto II por 3 e 5 minutos, respectivamente;
- e) diafanização em xilol I e xilol II, rapidamente;
- f) montagem em Bálsamo do Canadá.

Para cada bateria de coloração utilizou-se controle positivo, que consistia em lâminas do intestino delgado e pâncreas de gambá *Didelphis albiventris*.

### **3.5. ANÁLISE DAS PREPARAÇÕES HISTOLÓGICAS**

As lâminas obtidas foram analisadas com auxílio de um microscópio óptico binocular modelo Olympus CBA, do Setor de Morfologia do DVT/UFV e de um fotomicroscópio óptico binocular (Olympus BX60) acoplado a computador contendo um software de análise de imagens (Image-Pro Plus, versão 4.0 – Optronics Engineering DEI-470), do DBG/UFV.

Foram analisados os aspectos de organização histológica da parede das diferentes regiões do tubo digestivo; detecção de células argirófilas; análise quantitativa de células argirófilas; análise do tipo de

secreção das células mucosas das diferentes regiões do estômago; detecção de células caliciformes secretoras de glicoproteínas ácidas e células caliciformes secretoras de glicoproteínas neutras no intestino.

### **3.5.1. Identificação e quantificação de células endócrinas = argirófilas**

Para a identificação e quantificação de células argirófilas foram utilizadas lâminas coradas pela técnica de Grimelius.

A análise quantitativa consistiu no rastreamento da túnica mucosa, em cada segmento, utilizando objetiva de 40X e ocular de 10X. Foram definidas, previamente, unidades de área amostrais (UA) de 0,0185 mm<sup>2</sup> de mucosa, equivalente a fração de volume da mucosa de 0,0925 mm<sup>3</sup>. Para cada segmento estudado foram observados 40 UA diferentes a fim de obtermos o número médio de células argirófilas incidentes em 0,74 mm<sup>2</sup> da mucosa, equivalente a fração de volume de 3,7 mm<sup>3</sup>.

### **3.5.2. Identificação de células caliciformes no intestino**

Para a identificação de células caliciformes no intestino das diferentes espécies estudadas utilizou-se lâminas coradas com Alcian Blue (AB) e Ácido Periódico de Schiff (PAS), a fim de detectar a presença de células caliciformes secretoras de glicoproteínas ácidas e de glicoproteínas neutras, respectivamente.

### **3.5.3. Análise histoquímica das células mucosas do estômago**

Para a análise histoquímica das células mucosas do estômago utilizou-se lâminas coradas com AB e PAS para detectar a presença de um muco ácido ou neutro nas diferentes espécies.

## **3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os dados obtidos foram organizados em planilha eletrônica (EXCEL 97) para posterior análise de variância (ANOVA) segundo o programa estatístico SAEG 7.1 (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas - 1997) (EUCLYDES, 1983).

### **3.7. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA**

As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio óptico binocular Olympus BX 60, do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, utilizando filme KODAK Color ISO 100.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. *Prochilodus marggravii***

Os animais coletados apresentaram variação de massa corporal de 250 a 850 gramas e de comprimento de 22,5 a 33 cm.

O comprimento do tubo digestivo dos exemplares utilizados foi em média de 78,8 centímetros.

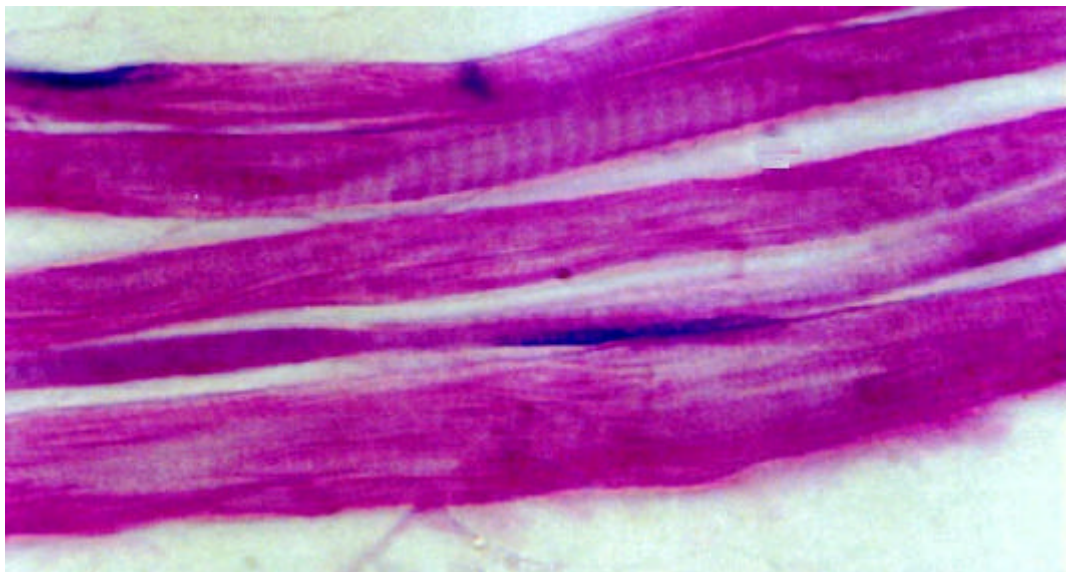
#### **4.1.1. Organização Histológica**

O estômago de *Prochilodus marggravii* apresentou o formato de U e pôde ser diferenciada em 3 regiões morfológicas distintas, cada qual apresentando uma organização histológica característica:

a) Região Cárdica:

- Túnica mucosa apresentando pregas, revestidas por epitélio simples prismático com leucócitos infiltrados, lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo rico em leucócitos, presença de glândulas simples tubulares que se abrem em criptas pequenas e ausência da muscular da mucosa;

- Túnica muscular espessa, formada, principalmente, por tecido muscular estriado esquelético (Figura 4) e apresentando variação cranio-caudal, na organização das camadas circular externa e longitudinal interna;
- Túnica serosa delgada constituída de tecido conjuntivo frouxo revestido de mesotélio.



**Figura 4.** Músculo estriado esquelético da túnica muscular, da região cárdica do estômago de *Prochilodus marginatus*. 1000X. HE.

b) Região Cecal:

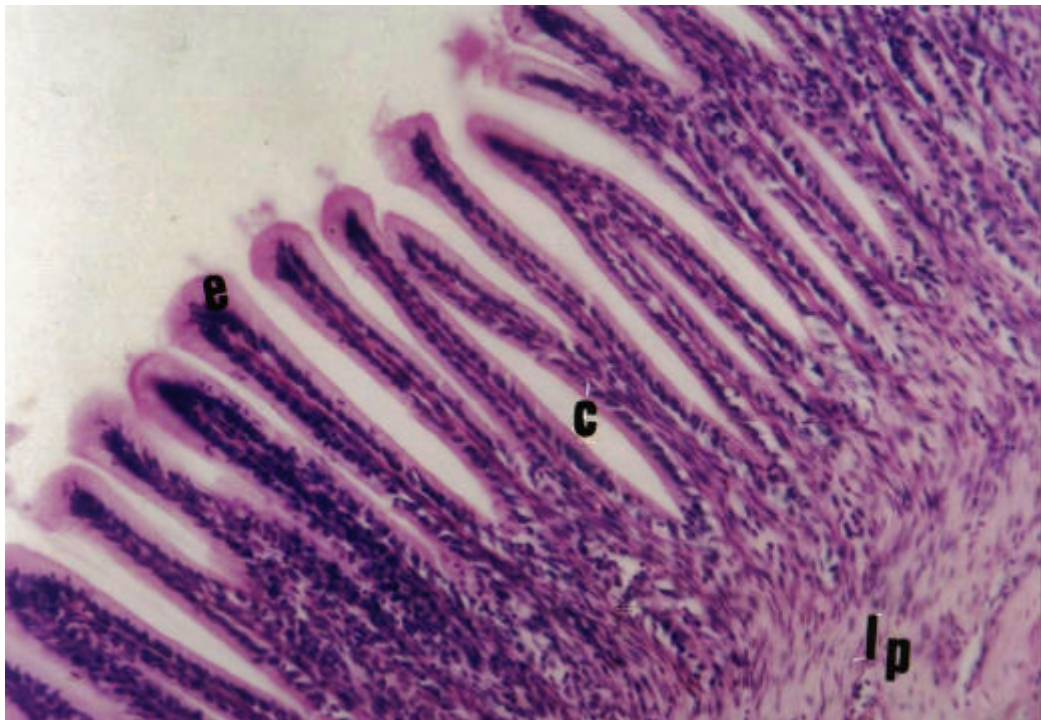
- Túnica mucosa constituída de epitélio simples prismático, lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo, rica em leucócitos, glandular e com criptas mais profundas se comparadas com as da região cárdica (Figura 5);
- Túnica muscular desenvolvida, principalmente a camada muscular circular lisa interna, que constitui quase toda a espessura (Figura 5);
- Túnica serosa formada de tecido conjuntivo frouxo e mesotélio.



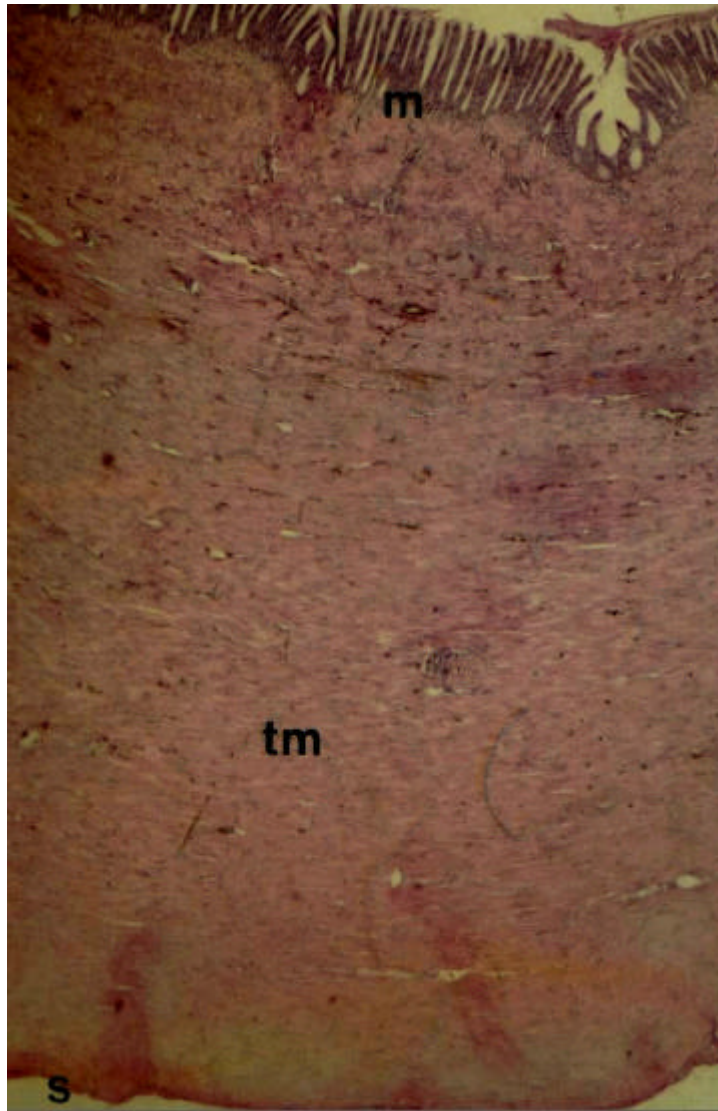
**Figura 5.** Região cecal do estômago de *Prochilodus marginatus*. Criptas (c) ; mucosa (m); túnica muscular (tm). 100X. HE.

c) Região Pilórica:

- Túnica mucosa com criptas mais profundas do que as da região cecal, apresentando epitélio simples prismático com células mucosas, lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo e ausência da muscular da mucosa (Figura 6);
- Túnica muscular muito desenvolvida (Figura 7), apresentando feixes de músculo liso com orientação circular, sustentada por feixes de fibras de músculo liso entremeadas e dispostas longitudinalmente;
- Túnica serosa formada de tecido conjuntivo frouxo e mesotélio.



**Figura 6.** Mucosa da região pilórica do estômago de *Prochilodus marginatus*. epitélio simples prismático (**e**); criptas (**c**), as mais profundas do estômago desta espécie; lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo (**lp**). 200X. HE.



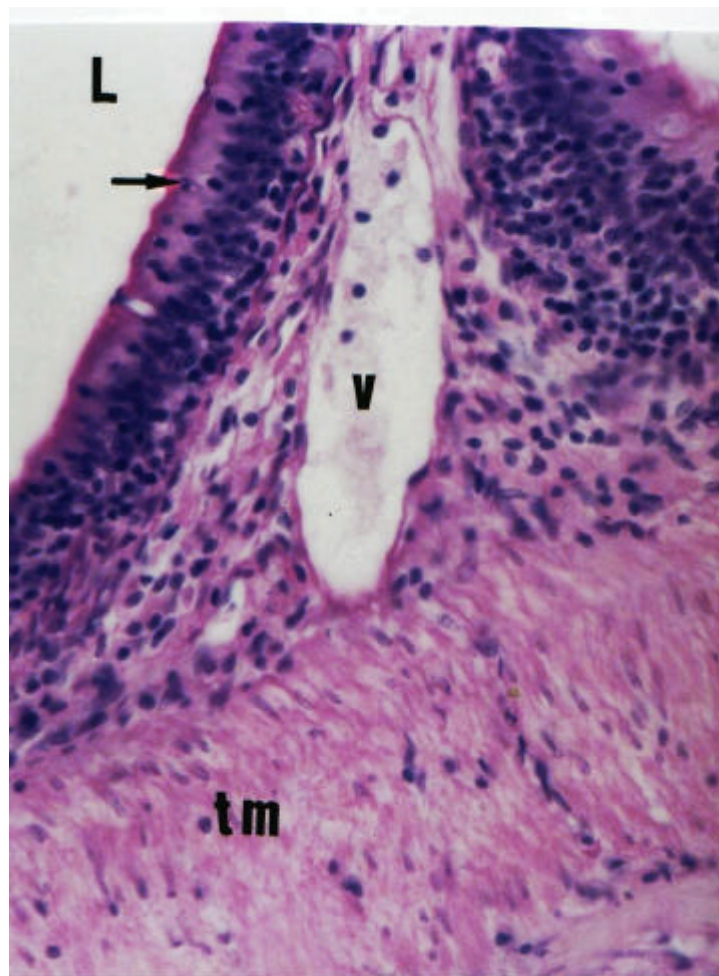
**Figura 7.** Vista panorâmica da parede da região pilórica do estômago de *Prochilodus marginatus*. Túnica mucosa (**m**); túnica muscular (**tm**); túnica serosa (**s**). 40 X. HE.

Em todas as regiões do estômago não foi identificada a muscular da mucosa.

O intestino médio de *Prochilodus marginatus* é enovelado apresentando, a seguinte organização histológica:

- Túnica mucosa delgada com epitélio simples prismático com borda estriada e células caliciformes, presença de leucócitos infiltrados no epitélio (Figura 8);

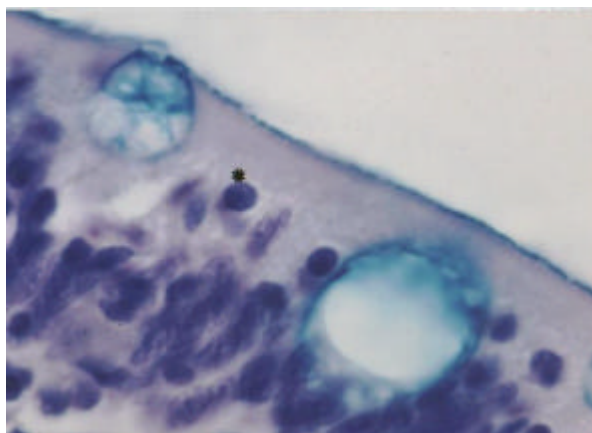
- Túnica submucosa mais espessa do que a túnica mucosa e bastante irrigada, constituída de tecido conjuntivo frouxo, com grande quantidade de leucócitos, que se distribuem por toda sua extensão (Figura 8);
- Túnica muscular com uma camada circular interna mais espessa e outra longitudinal externa (Figura 8);
- Túnica serosa pouco desenvolvida.



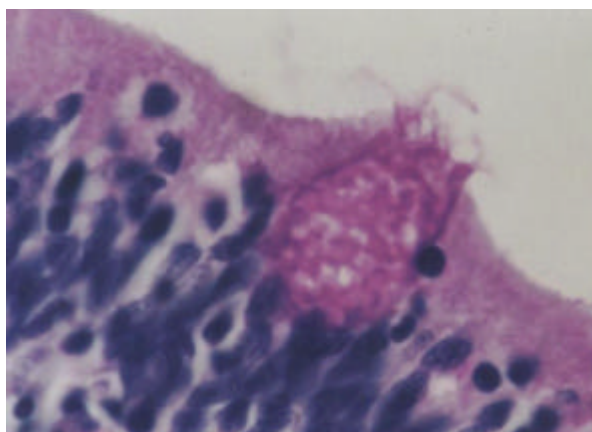
**Figura 8.** Parede do intestino médio de *Prochilodus marginatus*. Luz da cavidade intestinal (**L**); leucócito infiltrado no epitélio (**seta**); vaso sanguíneo na submucosa (**v**); túnica muscular (**tm**). 400X. HE.

#### **4.1.2. Células caliciformes no intestino médio**

Foram identificadas células caliciformes secretoras de glicoproteínas ácidas (reação AB+) e glicoproteínas neutras (reação PAS+) ao longo do intestino médio (Figuras 9 e 10).



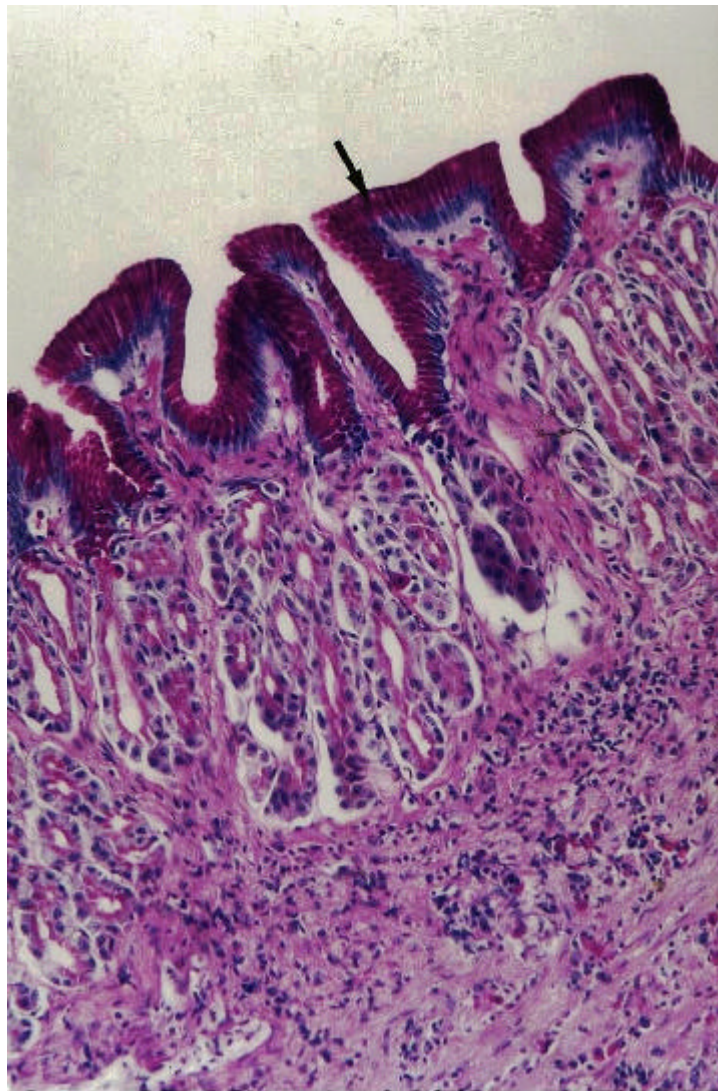
**Figura 9.** Células caliciformes secretoras de glicoproteínas ácidas, apresentando citoplasma com reação positiva em azul, presentes no epitélio do intestino médio de *Prochilodus marggravii*. Leucócito infiltrado no epitélio (\*). 1000X. Alcian Blue.



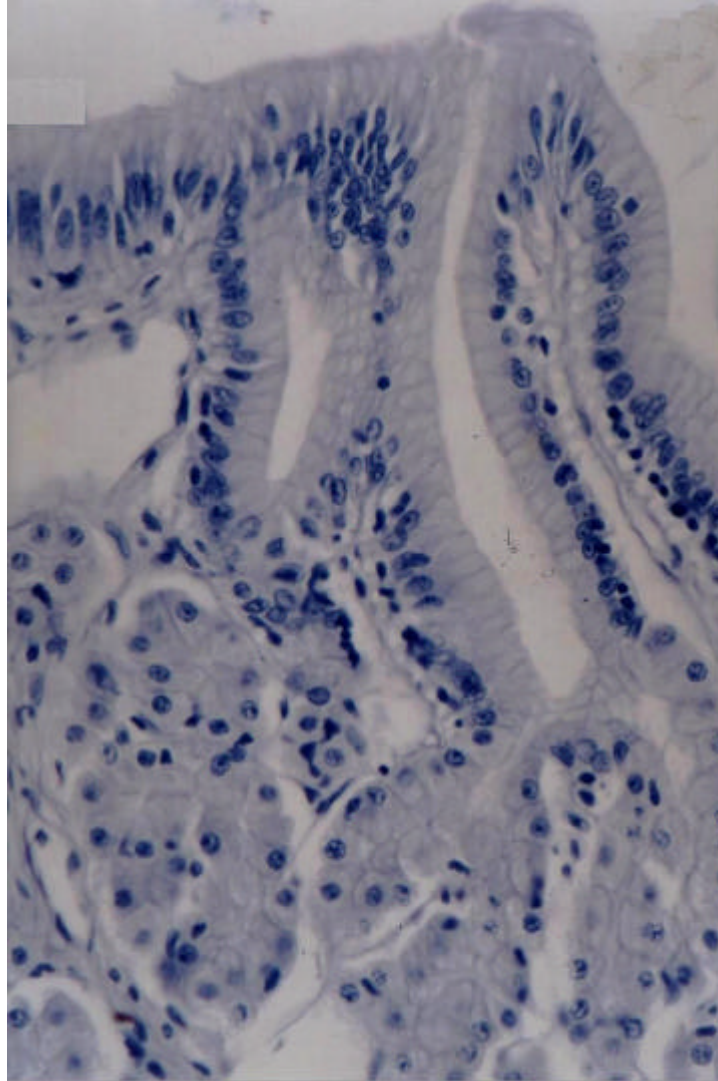
**Figura 10.** Célula caliciforme secretora de glicoproteínas neutras, apresentando citoplasma com reação positiva em rosa escuro, presentes no epitélio do intestino médio de *Prochilodus marggravii*. 1.000X. PAS.

#### **4.1.3. Células mucosas no estômago**

As células mucosas do estômago desta espécie mostraram-se PAS positivas e AB negativas (Figuras 11 e 12)



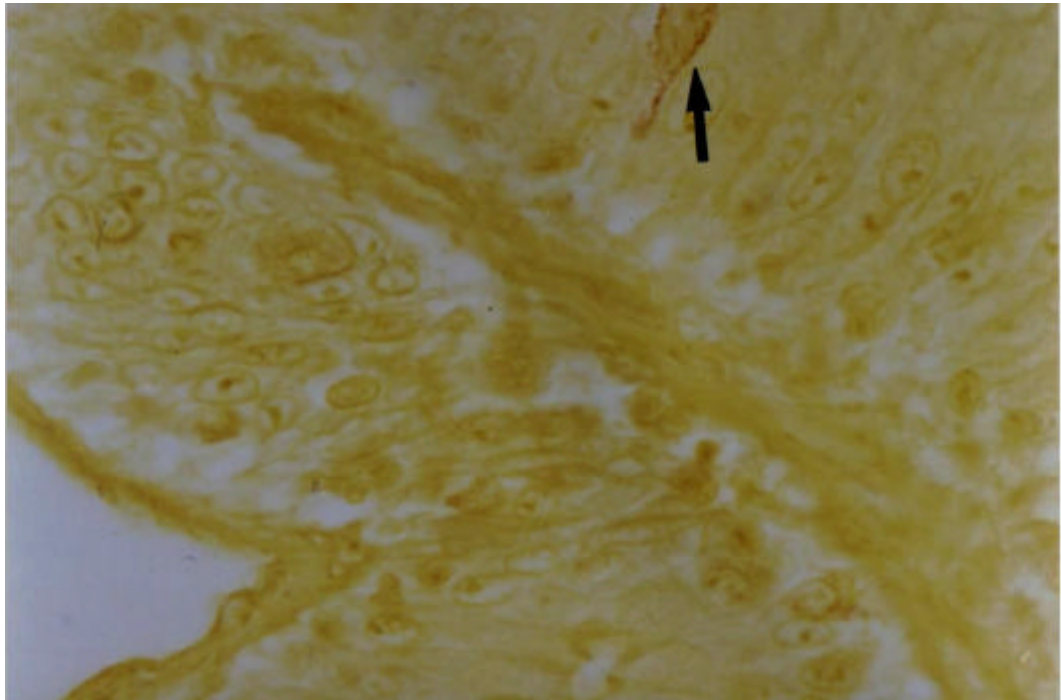
**Figura 11.** Reação PAS positiva na região cecal do estômago de *Prochilodus marginatus*. Citoplasma das células mucosas corado em vermelho (**seta**). 200X. PAS.



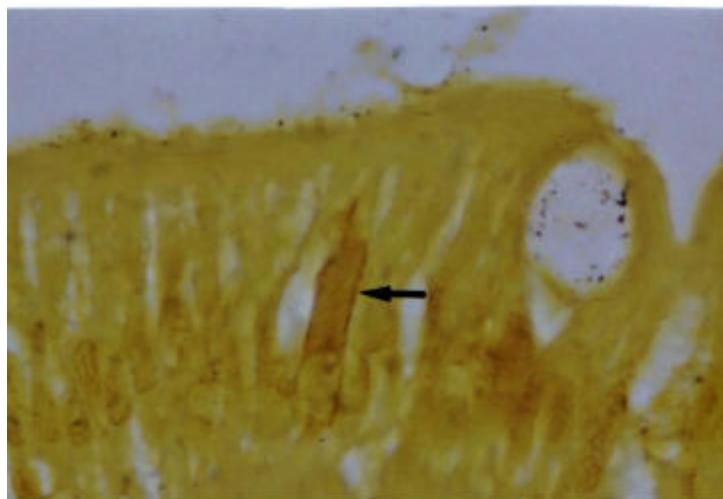
**Figura 12.** Reação AB negativa na região cecal do estômago de *Prochilodus marginatus*. 400X. Alcian Blue.

#### **4.1.4. Identificação e quantificação de células argirófilas**

Na identificação de células argirófilas, todas as lâminas controle (intestino do gambá, *D. albiventris*) tiveram reação positiva. Foram identificadas células endócrinas em todas as regiões do estômago e ao longo do intestino médio de *Prochilodus marginatus* (Figuras 13 e 14).



**Figura 13.** Célula argirófila (**seta**) em meio a células epiteliais da região cecal do estômago de *Prochilodus marginatus*. 1000X. Grimelius.



**Figura 14.** Célula argirófila (**seta**) entre enterócitos do intestino médio de *Prochilodus marginatus*. 1000X. Grimelius.

O estudo quantitativo, embora revelando diferentes números médios de células argirófilas por  $\text{mm}^2$  e  $\text{mm}^3$  da mucosa, nas regiões do estômago e do intestino médio, de *Prochilodus marginatus* (Tabela 1 e 2), o teste F da análise de variância (ANOVA) não mostrou variação significativa ( $P>0,05$ ) entre o número médio de células argirófilas dos segmentos estudados. Constatou-se, também, através do Teste de Tukey, com nível de significância de 5%, que os espécimes utilizados são homogêneos, em relação aos dados obtidos de número de células argirófilas.

**Tabela 1.** Número médio  $\pm$  desvio padrão de células argirófilas por  $\text{mm}^2$  da mucosa do estômago e intestino médio de *P. marginatus*.

	Estômago – regiões			Intestino médio	
	Cárdica	Cecal	Pilórica	Proximal	Distal
<b>Células <math>\text{mm}^2</math></b>	0,001 $\pm$ 1,25	0,0005 $\pm$ 0,97	0,0001 $\pm$ 0,32	0,0004 $\pm$ 0,97	0,0006 $\pm$ 1,07

**Tabela 2.** Número médio  $\pm$  desvio padrão de células argirófilas por  $\text{mm}^3$  da mucosa do estômago e intestino médio de *P. marginatus*.

	Estômago – regiões			Intestino médio	
	Cárdica	Cecal	Pilórica	Proximal	Distal
<b>Células <math>\text{mm}^3</math></b>	0,005 $\pm$ 1,25	0,0025 $\pm$ 0,97	0,0005 $\pm$ 0,32	0,002 $\pm$ 0,97	0,003 $\pm$ 1,07

## **4.2. *Leporinus reinhardti***

Os animais coletados apresentaram variação de massa corporal de 250 a 850 gramas e de comprimento de 27,5 a 37 cm.

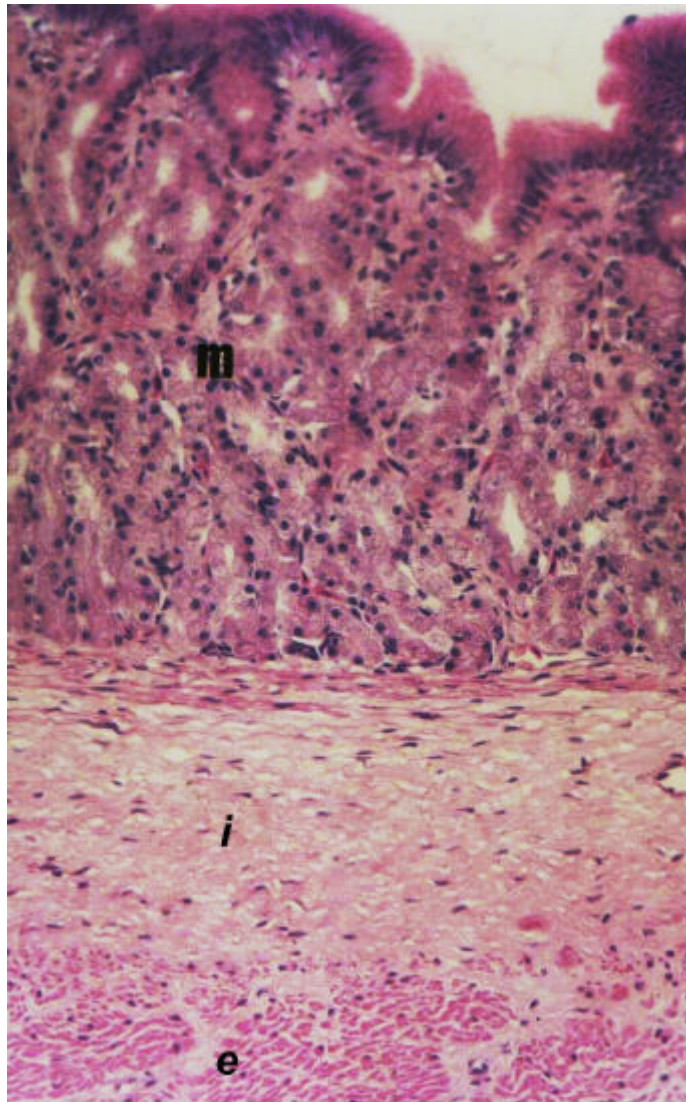
O comprimento do tubo digestivo dos exemplares utilizados foi em média de 36 centímetros.

### **4.2.1. Organização Histológica**

O estômago de *Leporinus reinhardti* é do tipo cecal, em Y e pode ser diferenciado em três regiões morfológicas, cada qual apresentando uma organização histológica distinta.

#### a) Região Cárdica:

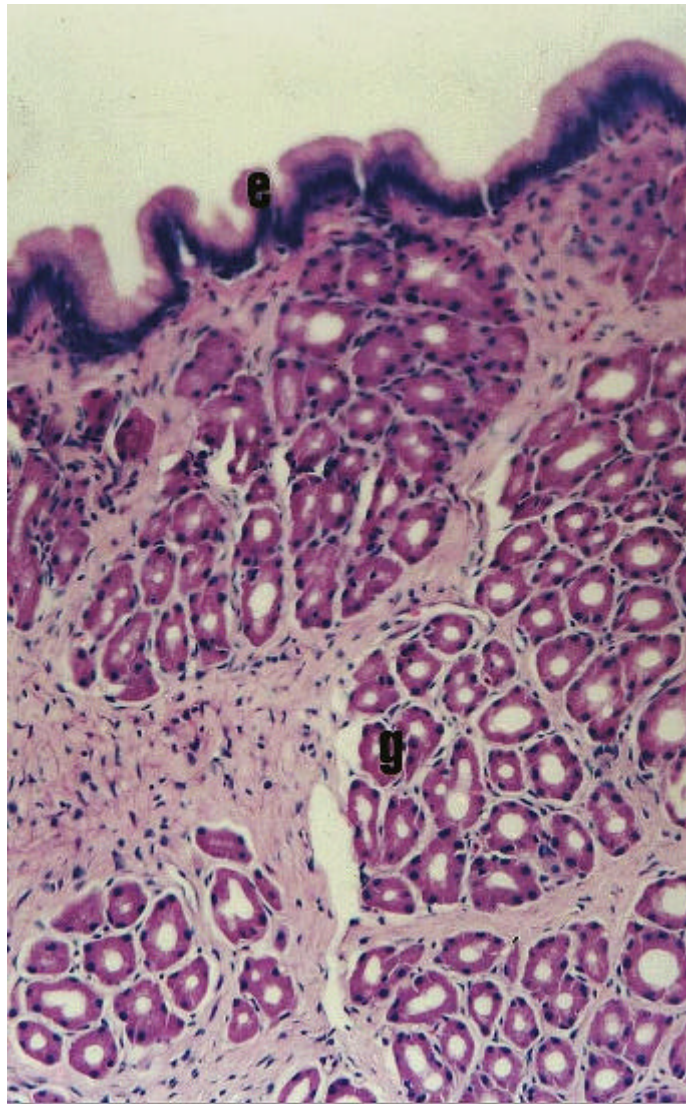
- Túnica mucosa apresentando pregas, revestidas por epitélio simples prismático, sendo neste observados leucócitos infiltrados. Logo abaixo deste epitélio, observa-se lâmina própria com glândulas tubulares simples que desembocam em pequenas criptas. Muscular da mucosa ausente (Figura 15);
- Túnica muscular desenvolvida, podendo ser dividida em circular interna e longitudinal externa e apresentando variação em sua organização crânio-caudal(Figura 15);
- Túnica serosa delgada e formada de tecido conjuntivo frouxo revestido de mesotélio.



**Figura 15.** Região cárdica do estômago de *Leporinus reinhardtii*. Mucosa (m), camadas muscular circular interna (i) e longitudinal externa (e). 200X. HE.

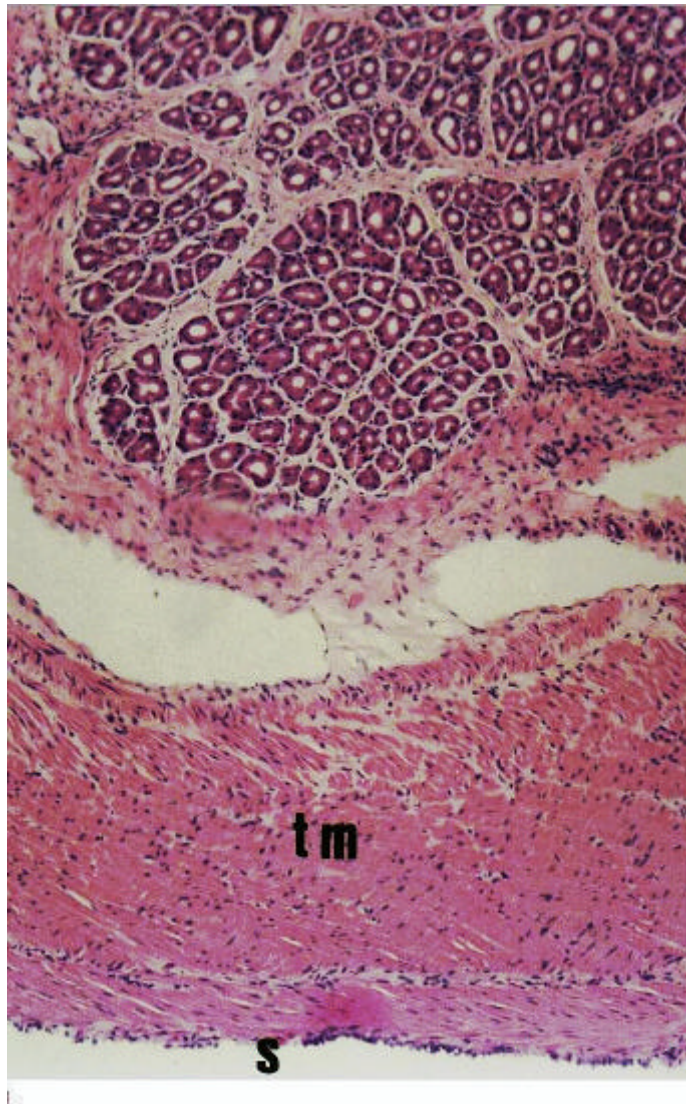
b) Região Cecal:

- Túnica mucosa com criptas mais profundas do que as da região cárdica, apresentando epitélio simples prismático, lâmina própria rica em glândulas envolvidas por tecido conjuntivo frouxo e ausência da muscular da mucosa (Figura 16).



**Figura 16.** Mucosa da região cecal de *Leporinus reinhardtii*. Epitélio simples prismático (e), lâmina própria com glândulas (g). 200X. HE.

- Túnica muscular constituída de duas camadas: uma interna circular e outra longitudinal externa (Figura 17);
- Túnica serosa delgada e formada de tecido conjuntivo frouxo revestido de mesotélio (Figura 17).



**Figura 17.** Túnica muscular (**tm**) e túnica serosa (**s**) da parede da região cecal do estômago de *Leporinus reinhardti*. 100X. HE.

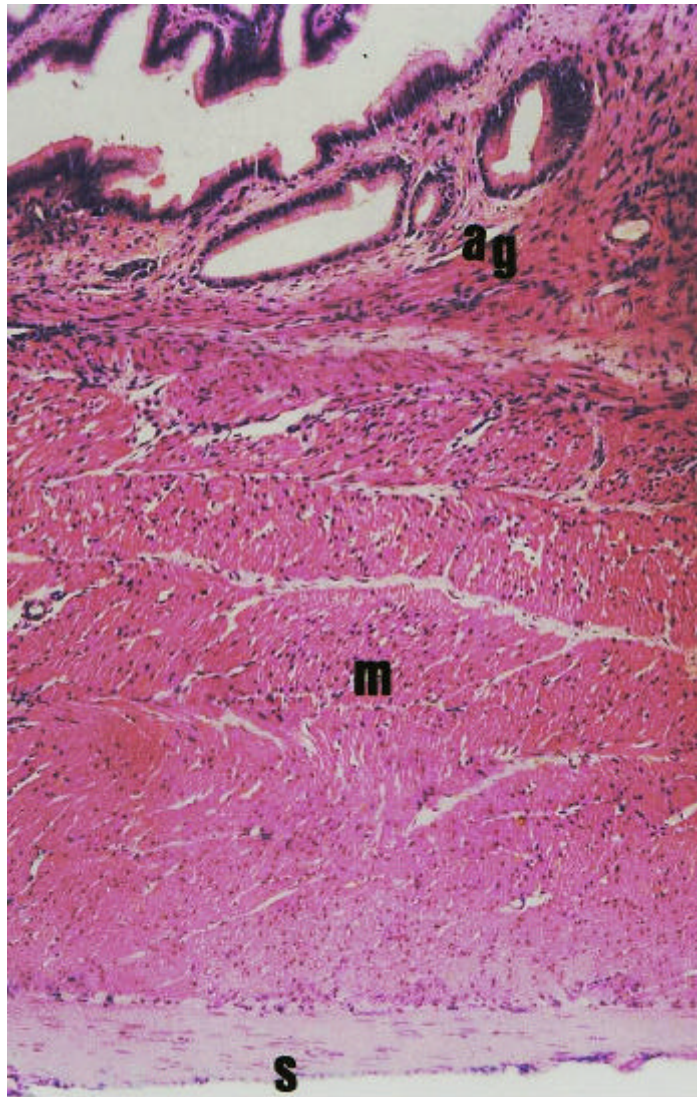
c) Região Pilórica:

- Túnica mucosa contendo as criptas mais profundas do estômago, apresentando epitélio simples prismático, lâmina própria aglandular e ausência da muscular da mucosa (Figura 18).

- Túnica muscular desenvolvida apresentando variações na região pilórica (Figura 19).
- Túnica serosa formada de tecido conjuntivo frouxo revestido por mesotélio.



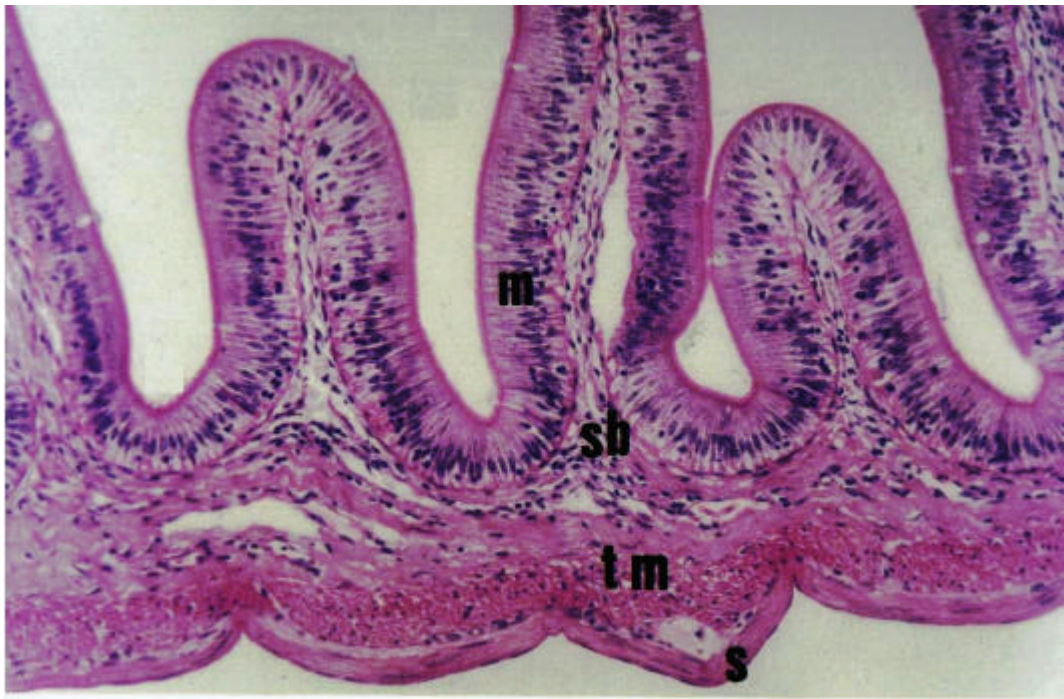
**Figura 18.** Transição entre as regiões cecal (c) e pilórica (p) do estômago de *Leporinus reinhardtii*. Glândulas na lâmina própria da região cecal (g). 200X HE.



**Figura 19.** Região pilórica do estômago de *Leporinus reinhardtii*. Mucosa aglandular (ag), muscular (m) e serosa (s). 100X. HE.

O intestino médio de *Leporinus reinhardtii* é bastante enovelado apresentando, predominantemente, a seguinte organização histológica (Figura 20):

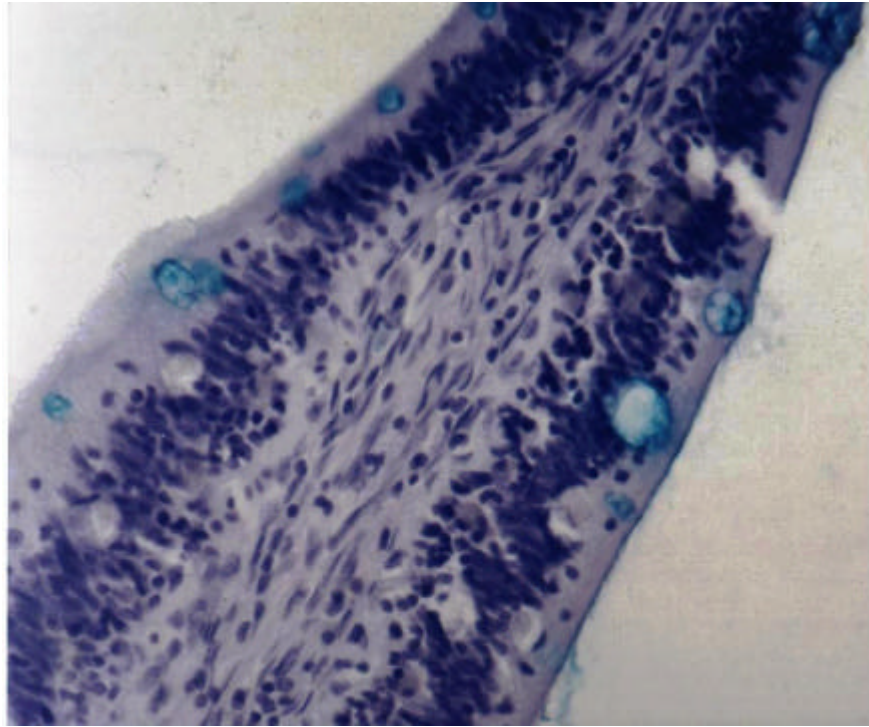
- Túnica mucosa apresentando epitélio simples prismático, contendo freqüentemente leucócitos infiltrados e muscular da mucosa bem organizada.
- Túnica submucosa constituída de tecido conjuntivo frouxo, sendo bastante irrigado.
- Túnica muscular que pode ser dividida em uma camada circular externa, que emite feixes musculares para as pregas da parede intestinal e outra longitudinal interna, menos desenvolvida.
- Túnica serosa constituída de tecido conjuntivo e mesotélio.



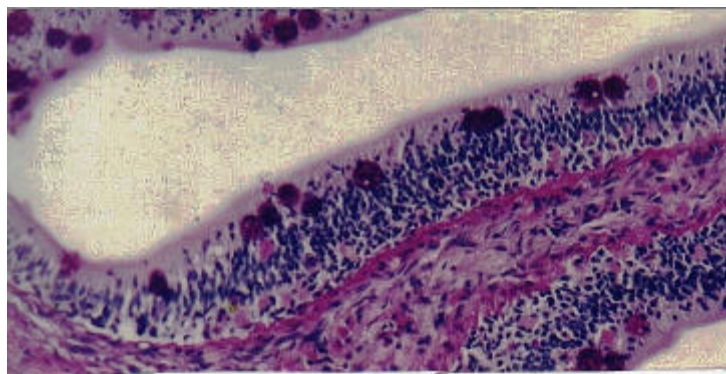
**Figura 20.** Intestino médio de *Leporinus reinhardti*. Túnica mucosa (**m**), submucosa (**sb**), túnica muscular (**t**) e túnica serosa (**s**). 100X. HE.

#### **4.2.2. Células caliciformes do intestino médio**

Foram identificadas células caliciformes secretoras de glicoproteínas ácidas (reação AB+) e glicoproteínas neutras (reação PAS+) ao longo do intestino médio (Figuras 21 e 22).



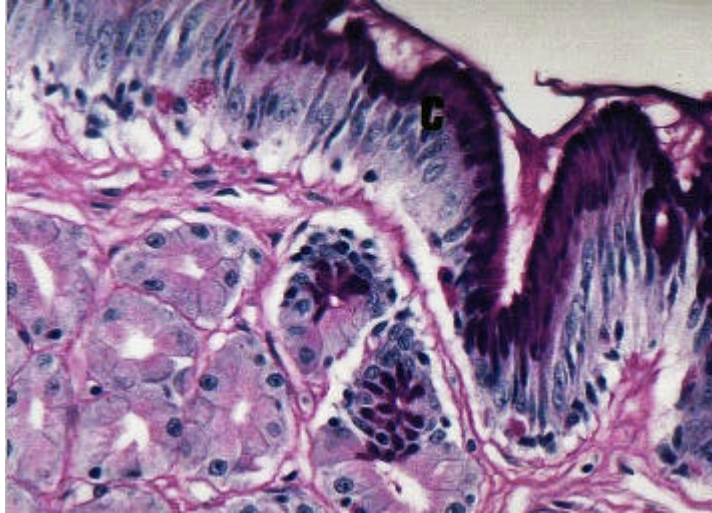
**Figura 21.** Células caliciformes secretoras de glicoproteínas ácidas, apresentando citoplasma com reação positiva em azul, presentes no epitélio do intestino médio de *Leporinus reinhardti*. 200X. Alcian Blue.



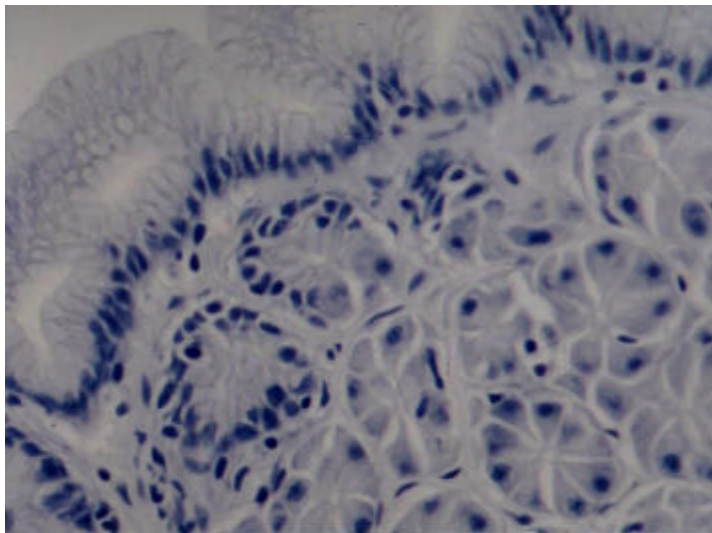
**Figura 22.** Células caliciformes secretoras de glicoproteínas neutras, apresentando citoplasma com reação positiva em rosa escuro, presentes no epitélio do intestino médio de *Leporinus reinhardti*. 400X. PAS.

#### 4.2.3. Células mucosas do estômago

As células mucosas do estômago desta espécie mostraram-se PAS positivas e AB negativas (Figuras 23 e 24)



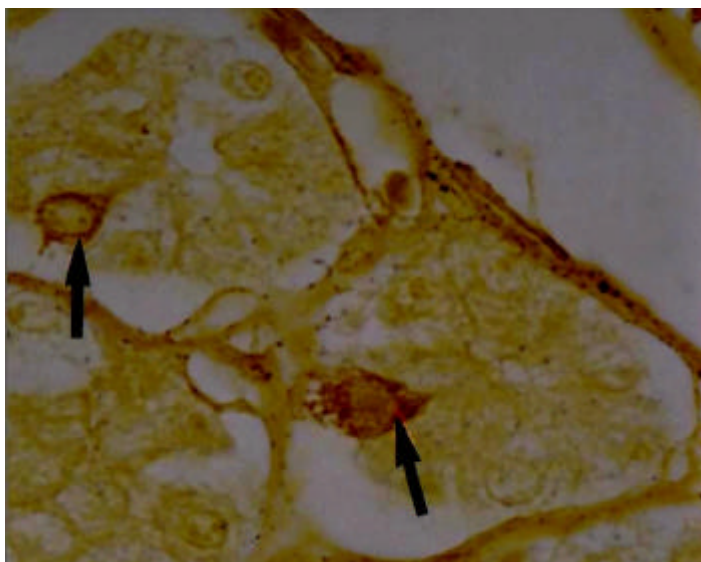
**Figura 23.** Reação PAS positiva na região cecal do estômago de *Leporinus reinhardtii*. Células mucosas (c) no epitélio da mucosa gástrica. 400X. PAS.



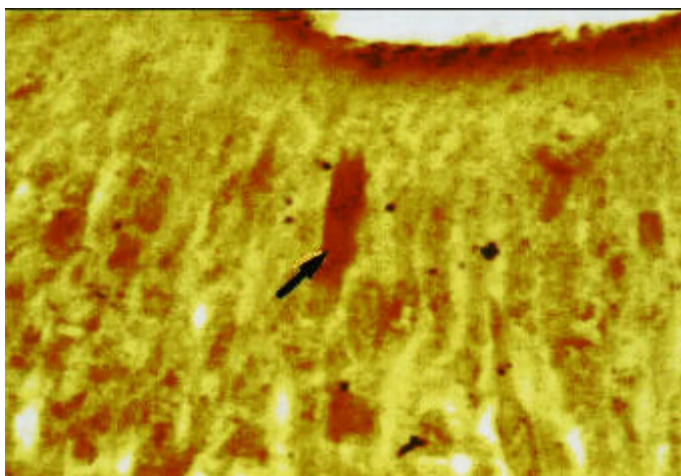
**Figura 24.** Reação AB negativa na região cecal do estômago de *Leporinus reinhardtii*. 400X. Alcian Blue.

#### **4.2.4. Identificação e quantificação de células argirófilas**

Na identificação de células argirófilas, todas as lâminas controle (intestino do gambá, *Didelphis albiventris*) tiveram reação positiva. Foram identificadas células endócrinas em todas as regiões do estômago e ao longo do intestino médio de *Leporinus reinhardti* (Figuras 25 e 26).



**Figura 25.** Células argirófilas (**setas**) entre células epiteliais da região cárdica do estômago de *Leporinus reinhardti*. 1000X. Grimelius.



**Figura 26.** Célula argirófila (**seta**) entre enterócitos do intestino médio de *Leporinus reinhardti*. 1000X. Grimelius.

O estudo quantitativo, embora revelando diferentes números médios de células argirófilas por mm<sup>2</sup> e mm<sup>3</sup> da mucosa, nas regiões do estômago e do intestino médio, de *Leporinus reinhardti* (Tabela 3 e 4), o teste F da análise de variância (ANOVA) não mostrou variação significativa (P>0,05) entre o número médio de células argirófilas dos segmentos estudados. Constatou-se, também, através do Teste de Tukey, com nível de significância de 5%, que os espécimes utilizados são homogêneos, em relação aos dados obtidos de número de células argirófilas.

**Tabela 3.** Número médio  $\pm$  desvio padrão de células argirófilas por mm<sup>2</sup> de mucosa do estômago e intestino médio de *Leporinus reinhardti*.

	Estômago – regiões			Intestino médio	
	Cárdica	Cecal	Pilórica	Proximal	Distal
Células mm <sup>2</sup>	0,009 $\pm$ 0,5	0,0006 $\pm$ 0,74	0,0001 $\pm$ 0,91	0,0005 $\pm$ 0,6	0,0008 $\pm$ 1,2

**Tabela 4.** Número médio  $\pm$  desvio padrão de células argirófilas por mm<sup>3</sup> de mucosa do estômago e intestino médio de *Leporinus reinhardti*.

	Estômago – regiões			Intestino médio	
	Cárdica	Cecal	Pilórica	Proximal	Distal
Células mm <sup>3</sup>	0,045 $\pm$ 0,5	0,003 $\pm$ 0,74	0,0005 $\pm$ 0,91	0,0025 $\pm$ 0,6	0,004 $\pm$ 1,2

### **4.3. *Salminus brasiliensis***

Os animais coletados apresentaram variação de massa corporal de 250 a 850 gramas e de comprimento de 23 a 26,5 cm.

O comprimento do tubo digestivo dos exemplares utilizados foi em média de 20 centímetros.

#### **4.3.1. Organização Histológica**

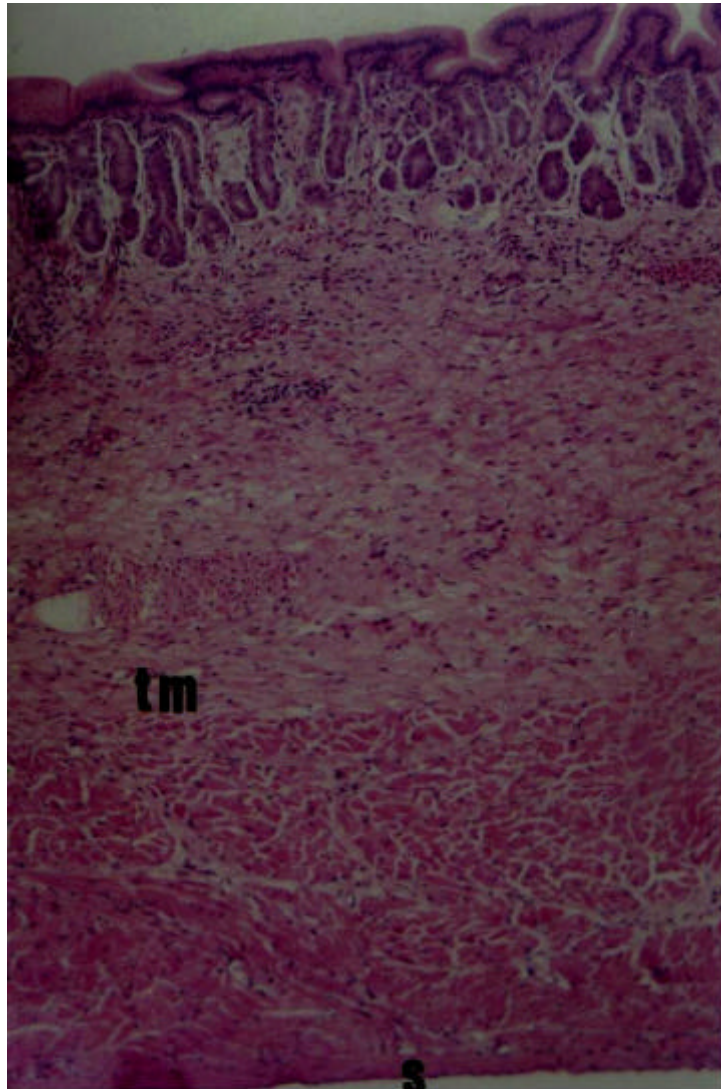
O estômago de *Salminus brasiliensis* pode ser diferenciado em três regiões morfológicas, cada qual apresentando uma organização histológica distinta.

##### b) Região Cárdica:

- Túnica mucosa com epitélio prismático simples e em sua lâmina própria, glândulas tubulares simples que desembocam nas pequenas criptas da mucosa. Ausência de muscular da mucosa (Figura 27 e 28).
- Túnica muscular bem desenvolvida, podendo ser dividida em duas camadas, sendo a mais interna de músculos dispostos circularmente e a mais externa com músculos dispostos longitudinalmente (Figura 28).
- Túnica serosa de tecido conjuntivo e mesotélio (Figura 28).



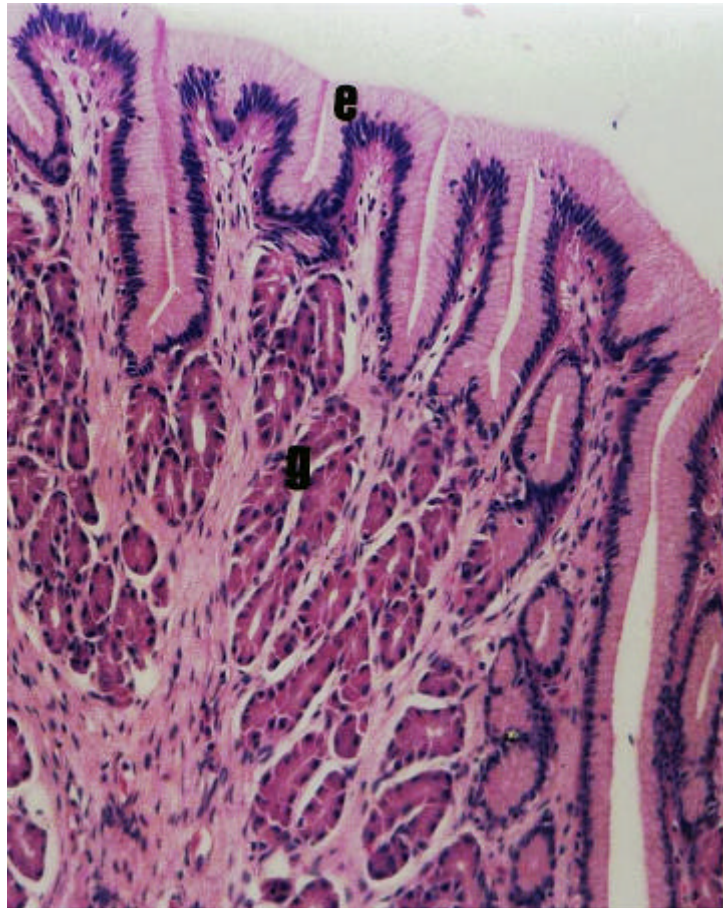
**Figura 27.** Região cárdica do estômago de *Salminus brasiliensis*. Túnica mucosa com glândulas (g) em sua lâmina própria, plexo mioentérico (pm). 200X. HE.



**Figura 28.** Panorâmica da parede da região cárdica de *Salminus brasiliensis*. Túnica muscular (**tm**) e túnica serosa (**s**). 100X. HE.

b) Região Cecal:

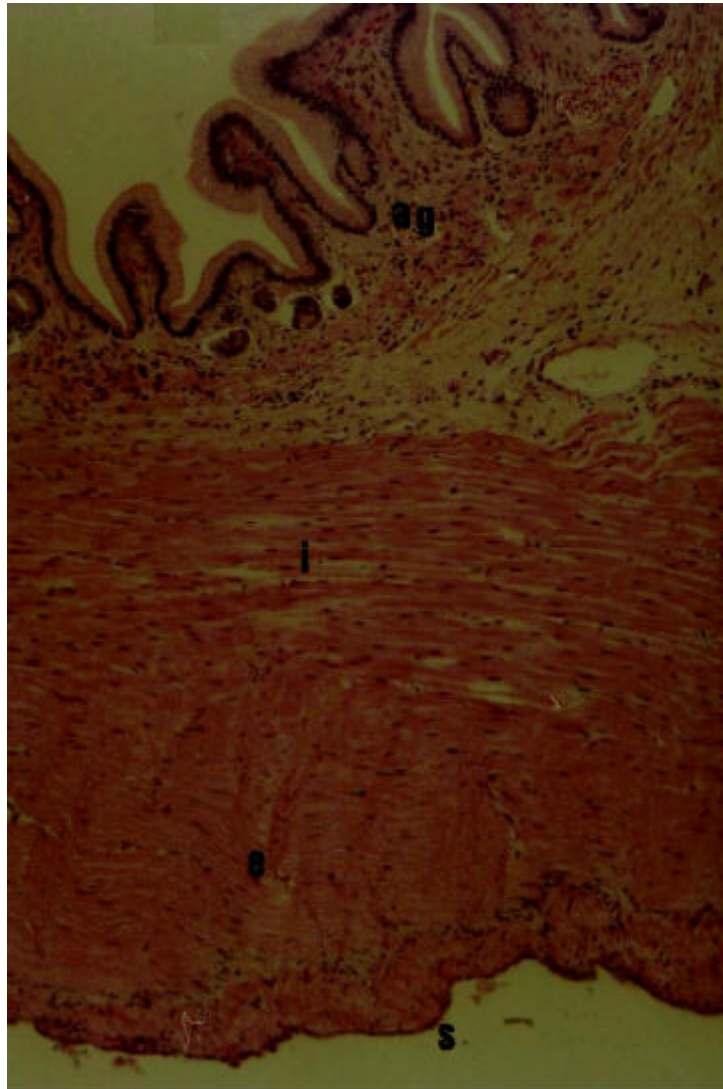
- Túnica mucosa com epitélio simples prismático e glândulas tubulares simples na lâmina própria. Criptas mais profundas do que as da região cárdica. Ausência de muscular da mucosa (Figura 29).
- Túnica muscular desenvolvida podendo ser dividida freqüentemente em duas camadas a mais externa circular e a outra longitudinal.
- Túnica serosa composta de tecido conjuntivo e mesotélio.



**Figura 29.** Túnica mucosa da região cecal do estômago de *Salminus brasiliensis*. Epitélio simples prismático (e) e glândulas (g). 200X. HE.

c) Região Pilórica (Figura 30):

- Túnica mucosa contendo as criptas mais profundas do estômago de *S. brasiliensis*, epitélio simples prismático com lâmina própria aglandular.
- Túnica muscular desenvolvida apresentando uma camada interna circular e outra externa longitudinal.
- Túnica serosa de conjuntivo revestido por mesotélio.



**Figura 30.** Região pilórica do estômago de *Salminus brasiliensis*. Túnica mucosa aglandular (**ag**), muscular longitudinal interna (**i**), muscular circular externa (**e**), e túnica serosa (**s**). 100X. HE.

O intestino médio de *Salminus brasiliensis* apresenta, predominantemente, a seguinte organização histológica (Figura 31):

- Túnica mucosa apresentando epitélio simples prismático com células caliciformes e borda estriada, separada da submucosa pela muscular da mucosa.
- Túnica submucosa pouco desenvolvida, de tecido conjuntivo frouxo.

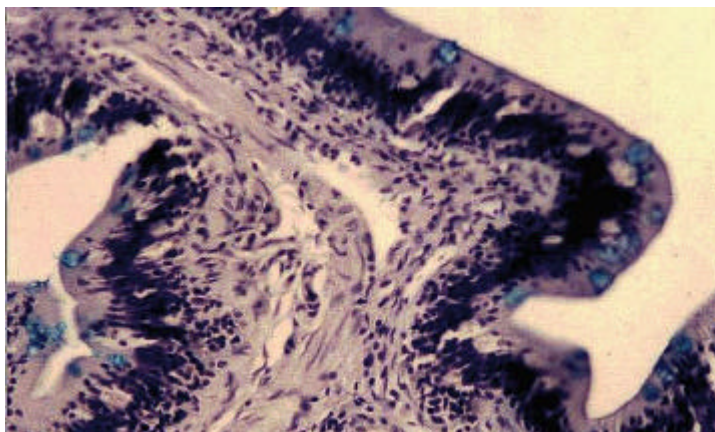
- Túnica muscular podendo ser dividida em camadas: interna circular, pouco desenvolvida em relação à camada externa longitudinal.
- Túnica serosa de conjuntivo e mesotélio.



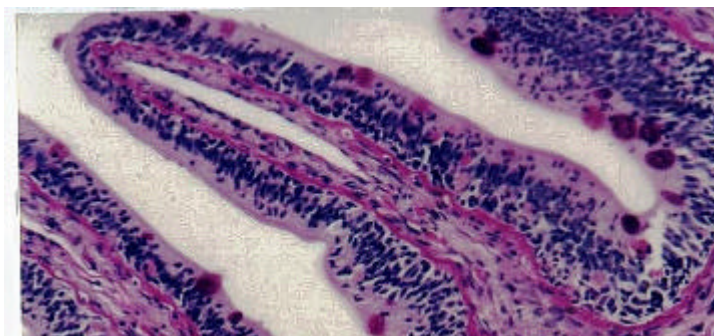
**Figura 31.** Intestino médio de *Salminus brasiliensis*. Mucosa (**m**), submucosa (**sb**), túnica muscular (**tm**) e túnica serosa (**s**). 200X. HE.

#### **4.3.2. Células caliciformes do intestino médio**

Foram identificadas células caliciformes secretoras de glicoproteínas ácidas (reação AB+) e glicoproteínas neutras (reação PAS+) ao longo do intestino médio (Figuras 32 e 33).



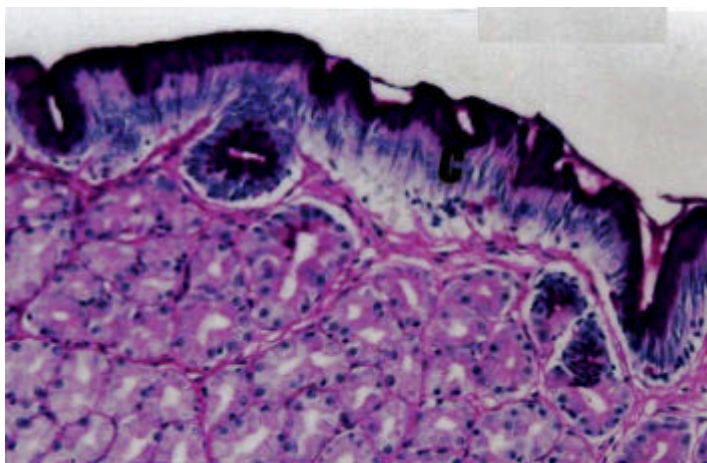
**Figura 32.** Células caliciformes secretoras de glicoproteínas ácidas, apresentando citoplasma com reação positiva em azul, presentes no epitélio do intestino médio de *Salminus brasiliensis*. 200X. Alcian Blue.



**Figura 33.** Células caliciformes secretoras de glicoproteínas neutras, apresentando citoplasma com reação positiva em rosa escuro, presentes no epitélio do intestino médio de *Salminus brasiliensis*. 200X. PAS.

#### **4.3.3. Células mucosas do estômago**

As células mucosas do estômago desta espécie mostraram-se PAS positivas e AB negativas (Figuras 34 e 35)



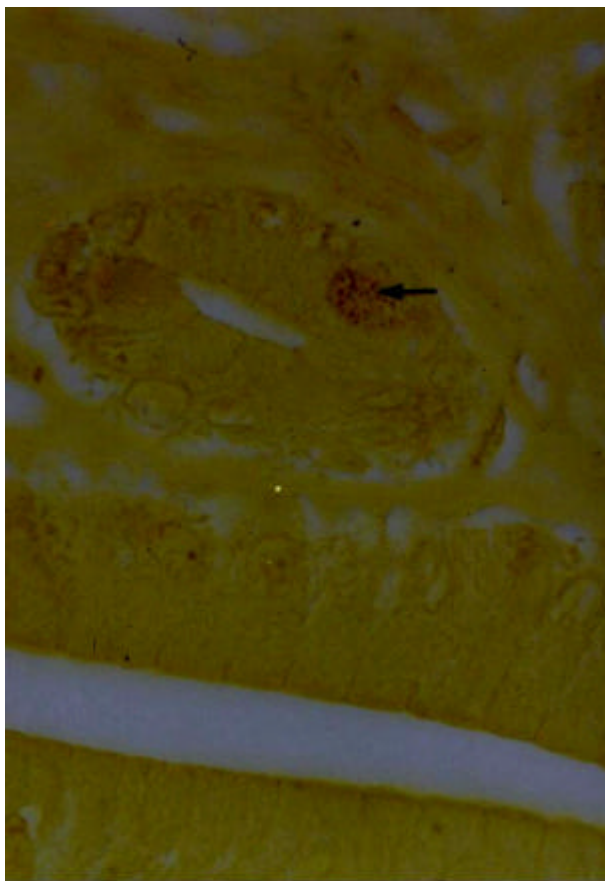
**Figura 34.** Reação PAS positiva na região cecal do estômago de *Salminus brasiliensis*. Células mucosas PAS positivas (c) com o citoplasma em vermelho escuro. 200X. PAS.



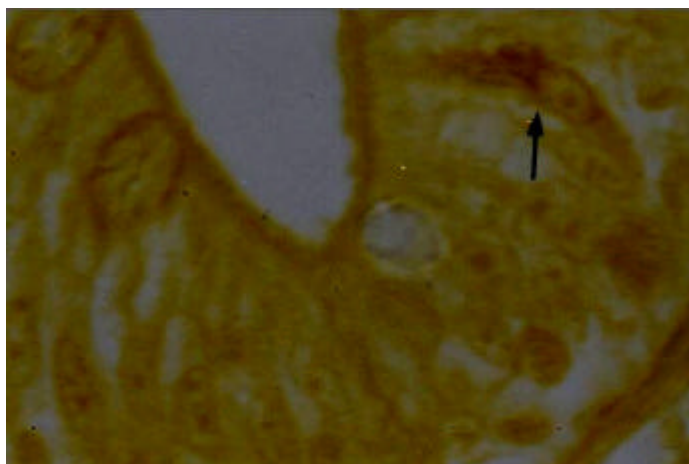
**Figura 35.** Reação AB negativa na região cecal do estômago de *Salminus brasiliensis*. Aumento de 200X. Alcian Blue.

#### **4.3.4. Identificação e quantificação de células argirófilas**

Na identificação de células argirófilas, todas as lâminas controle (intestino do gambá, *Didelphis albiventris*) tiveram reação positiva. Foram identificadas células endócrinas em todas as regiões do estômago e ao longo do intestino médio de *Salminus brasiliensis* (Figuras 36 e 37).



**Figura 36.** Célula argirófila (**seta**) entre células epiteliais da região cárdica do estômago de *Salminus brasiliensis*. 1000X. Grimelius.



**Figura 37.** Célula argirófila (**seta**) entre enterócitos do intestino médio de *Salminus brasiliensis*. 1000X. Grimelius.

O estudo quantitativo, embora revelando diferentes números médios de células argirófilas por mm<sup>2</sup> e mm<sup>3</sup> da mucosa, nas regiões do estômago e do intestino médio, de *Salminus brasiliensis* (Tabela 5 e 6), o teste F da análise de variância (ANOVA) não mostrou variação significativa (P>0,05) entre o número médio de células argirófilas dos segmentos estudados. Constatou-se, também, através do Teste de Tukey, com nível de significância de 5%, que os espécimes utilizados são homogêneos, em relação aos dados obtidos de número de células argirófilas.

**Tabela 5.** Número médio  $\pm$  desvio padrão de células argirófilas por mm<sup>2</sup> da mucosa do estômago e intestino médio de *Salminus brasiliensis*.

	Estômago – regiões			Intestino médio	
	Cárdica	Cecal	Pilórica	Proximal	Distal
<b>Células mm<sup>2</sup></b>	0,007 $\pm$ 0,74	0,001 $\pm$ 1,1	0,0002 $\pm$ 0,86	0,00045 $\pm$ 0,78	0,0008 $\pm$ 0,67

**Tabela 6.** Número médio  $\pm$  desvio padrão de células argirófilas por mm<sup>3</sup> da mucosa do estômago e intestino médio de *Salminus brasiliensis*.

	Estômago – regiões			Intestino médio	
	Cárdica	Cecal	Pilórica	Proximal	Distal
<b>Células mm<sup>3</sup></b>	0,035 $\pm$ 0,74	0,005 $\pm$ 1,1	0,001 $\pm$ 0,86	0,002 $\pm$ 0,78	0,004 $\pm$ 0,67

#### **4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DE CÉLULAS ARGIRÓFILAS ENTRE AS ESPÉCIES ESTUDADAS**

A análise estatística das médias de células argirófilas entre as espécies não constatou diferença significativa, pela análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5%.

## **5. DISCUSSÃO**

Em razão do padrão da mucosa nas regiões do estômago das espécies estudadas, pode-se atribuir funções de armazenar alimento, pela distensibilidade das regiões cárdica e cecal, observações similares foram feitas em espécies onívoras, tais como *Brycon lundii* (MENIN e MIMURA, 1993<sub>b</sub>), *Brycon nattereri* (SANTOS, 1999), *Piaractus mesopotamicus* (LOGATO, 1995) e de diferentes hábitos alimentares (GOMIDE, 1996; ZAVALA-CAMIN, 1996; WELCH, 1997; ROJAS, 1997). Já as pregas da região pilórica, juntamente com a espessura da camada muscular circular, possivelmente auxiliam no controle da saída do material digerido para o intestino médio, forma similar foi observada nas espécies onívoras citadas acima.

O epitélio de revestimento do estômago, simples prismático com células mucosas, das espécies estudadas, tem sido observado na maioria dos Teleostei (FÄNGE & GROVE, 1979; ROMER & PARSONS, 1985; MENIN, 1988; MORAES & BARBOLA, 1995; SANTOS, 1999).

Nos peixes, anfíbios, répteis e aves as células produtoras de ácido clorídrico, também secretam pepsinogênio, daí a denominação de células oxintopépticas (HELANDER, 1981), que estão localizadas nas glândulas gástricas. Nas espécies estudadas, independente do hábito alimentar, foram identificadas glândulas tubulares simples e tubulares ramificadas, como também foi observado por outros autores, tais como: MENIN (1988), LOGATO (1995), CHAVES & VAZZOLER (1984) e MURRAY et al. (1994). Nestas mesmas glândulas, foram observadas células argirófilas que estão possivelmente relacionadas com a fisiologia da digestão das espécies estudadas.

Não foi observada a muscular da mucosa gástrica nas espécies estudadas, mas existem fibras musculares, entre as glândulas gástricas, o que pode estar relacionado com o auxílio na contração destas glândulas, assim como observado por outros autores como SANTOS (1999). No entanto, MENIN (1988) observou a muscular da mucosa no estômago de diversas espécies de peixes de diferentes hábitos alimentares.

O comprimento do intestino médio de alguns Teleostei pode variar de uma a doze vezes o comprimento do corpo HILDEBRAND (1995). Alguns trabalhos relacionam o comprimento do intestino com o hábito alimentar, no entanto não se pode generalizar essa relação já que há peixes agástricos que são carnívoros e outros herbívoros com tubo digestivo curto (MENIN, 1988; GOMIDE, 1996).

O epitélio simples prismático com células caliciformes e borda em escova é característico da mucosa intestinal da maioria dos Teleostei (MENIN, 1988), o que, também, foi observado nas espécies estudadas.

Assim como em outros Teleostei a absorção de nutrientes pode estar relacionada ao comprimento e ao padrão da mucosa, à quantidade de células caliciformes e à espessura da borda em escova nas diferentes porções do intestino médio, bem como à presença de cecos pilóricos (SANTOS, 1999). MENIN (1988) estudando a espécie onívora *Brycon lundii* inferiu, em razão da maior quantidade de células caliciformes na porção cranial do que na média e na caudal, que o processo de absorção na porção cranial é menor do que nas porções media e caudal.

As células endócrinas do aparelho digestório e seus mensageiros químicos constituem um complexo sistema, que desempenha funções relacionadas com o controle e regulação dos processos da digestão (peristalse, fluxo sanguíneo, ciclo celular do epitélio da parede), homeostase e metabolismos de carboidratos (GRUBE, 1986).

BARRINGTON (1969) revisou a fisiologia digestiva de peixes e relatou que os aspectos da atividade motora e secretora do aparelho digestório tem sido pouco estudados, diferentemente do observado para mamíferos. Tais aspectos da fisiologia digestiva, independente do grupo taxonômico, são influenciados por um complicado sistema de controle nervoso e endócrino.

McINTOSH (1995) e vários outros autores relataram que no sistema de controle endócrino do aparelho digestório vários mensageiros químicos estão envolvidos. Entretanto, o conhecimento sobre estes mensageiros baseia-se em estudos desenvolvidos principalmente em mamíferos, havendo muito poucos relatos em animais de outro grupo taxonômico.

Células endócrinas estão presentes no tubo digestivo e glândulas anexas de Pisces, com exceção do esôfago, sendo observadas entremeadas às células epiteliais, na base da mucosa, entre as glândulas e, ainda, entre as células nervosas do plexo mioentérico (GABE & MARTOJA, 1971; JOHSON et al., 1976; ROMBOUT, 1977; STEFAN & FALKMER, 1980; EL-SALHY, 1984; HERMITE et al., 1985; ROMBOUT et al., 1982; KRALJ-KLOBUCAR, 1987; ELBAL et al., 1988; COETZEE et al., 1991; HERNANDEZ et al., 1994<sub>a,b,c</sub>; REINECKE et al., 1997; CHIBA, 1998; LOPEZ et al., 1999; YANG et al., 1999).

Estudos indicando a presença de células endócrinas no aparelho digestório em espécies de peixes brasileiras são escassos na literatura. SEIXAS FILHO (1998) estudando três espécies de peixes Teleostei com hábitos alimentares diferentes, *Brycon orbignyanus* (piracanjuba), *Leporinus friderici* (piauí) e *Pseudoplatystoma coruscans* (surubim) identificou células argirófilas nos segmentos referentes aos intestinos médio e posterior das espécies em estudo. O mesmo autor relatou que nestes segmentos a quantidade de células argirófilas é rara nestas

espécies estudadas. SANTOS (1999), por sua vez, identificou células argirófilas nas regiões cárdica, cecal e pilórica do estômago de *Brycon nattereri* (matrinxã).

A análise quantitativa das células argirófilas nas espécies estudadas não apresentou variação entre as espécies independente de seus hábitos alimentares. Verificou-se a presença de 0,00045 células/mm<sup>2</sup> (0,002 células/mm<sup>3</sup>) no intestino médio proximal, 0,0007 células/mm<sup>2</sup> (0,0035 células/mm<sup>3</sup>) no intestino médio distal e 0,0021 células/mm<sup>2</sup> (0,01 células/mm<sup>3</sup>) no estômago das espécies em estudo. FONSECA et al. (2001) analisou quantitativamente as células argirófilas em diferentes segmentos do tubo digestivo de gambá e encontrou 167 células/mm<sup>2</sup> no íleo, 29 células/mm<sup>2</sup> no cólon e 81 células/mm<sup>2</sup> no estômago. ITO et al. (1987) identificaram células endócrinas no aparelho digestório de embriões de camundongos e porcos, sendo que suas análises quantitativas obtiveram 80-160 células/mm<sup>2</sup> no intestino proximal, 80-100 células/mm<sup>2</sup> no intestino distal e estômago em camundongos e cerca de 100-160 células/mm<sup>2</sup> no intestino proximal, 80-100 células/mm<sup>2</sup> no intestino distal e 80-160 células/mm<sup>2</sup> no estômago de porcos.

Não podendo estabelecer comparação quantitativa com outras espécies de peixes brasileiros, verificamos que a relação à alguns mamíferos as espécies estudadas apresentaram, respectivamente, 38.571, 38.095 e 57.143 vezes menos células argirófilas por mm<sup>2</sup> do estômago, se comparadas ao gambá, ao embrião de camundongo e ao embrião do porco; 371.111, 266.667 e 288.889 vezes menos células endócrinas por mm<sup>2</sup> do intestino delgado, respectivamente, do gambá, do embrião de camundongo e embrião do porco; 41.429 e 128.571 vezes menos células endócrinas por mm<sup>2</sup> do intestino grosso em gambá e em embriões de camundongo e porco, respectivamente (FONSECA et al., 2001; ITO, 1987). Assim, verifica-se que as células endócrinas, provavelmente, responsáveis pela regulação endócrina nos processos fisiológicos do aparelho digestório das espécies de Teleostei de água doce estudadas, independente do hábito alimentar, são mais escassas ao compararmos com espécies de mamíferos.

A presença de células endócrinas no estômago e intestino médio das espécies em estudo, bem como o conhecimento da biologia, importância e funções desempenhadas por estas células no aparelho digestório, permite a conclusão da existência de um controle endócrino na fisiologia da digestão das espécies estudadas. Contudo, tornam-se necessários mais estudos envolvendo a distinção imunocitoquímica destas células para iniciar a elucidação funcional dos processos que ocorrem durante a digestão em espécies brasileiras de Teleostei. Tais estudos deverão ser direcionados no sentido de embasar pesquisas ulteriores na área da filogenia, fisiologia, morfologia, patologia e nutrição.

## **6. RESUMO E CONCLUSÃO**

Neste trabalho foram utilizados 10 exemplares de *Prochilodus marggravii* (Curimba), 10 de *Leporinus reinhardtii* (Piau-três-pintas) e 10 de *Salminus brasiliensis* (Dourado), espécies de peixes de água doce, de diferentes hábitos alimentares, que apresentaram de 250 a 850 gramas de massa corporal. Os objetivos foram: descrever a organização microscópica estômago e intestino médio; verificar a presença de células endócrinas no estômago e intestino médio; determinar a média e distribuição de células endócrinas no estômago e intestino médio; e verificar se o hábito alimentar interfere na distribuição e quantidade de células endócrinas entre as espécies estudadas. Chegou-se as seguintes conclusões:

- A estrutura histológica da parede do estômago e intestino médio das espécies estudadas não apresenta diferenças significativas entre elas;

- Células endócrinas estão presentes nas regiões cárdica, cecal e pilórica do estômago e no intestino médio, de todas as espécies estudadas;
- Não há diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre a quantidade de células argirófilas no estômago e intestino médio proximal e distal das espécies estudadas;
- O hábito alimentar não interfere na distribuição e quantidade de células endócrinas entre as espécies estudadas;
- Há necessidade de estudos envolvendo a distinção imunocitoquímica das células endócrinas do tubo digestivo destas espécies para iniciar a elucidação funcional dos processos que ocorrem durante a digestão.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, M.E.; AGULLEIRO, B.; ROMBOUT, J.H.W.M. An immunohistochemical and ultrastructural study of the endocrine pancreas of *Sparus auratus* (Teleostei). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.64: p.1-12, 1986.
- ABAD, M.E.; BINKHRST, F.M.; ELBAL, M.T.; ROMBOUT, J.H.W.M. A comparative immunocytochemical study of the gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system in a stomachless and a stomach-containing teleost. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.66, n.1: p.123-136, 1987.
- AGULLEIRO, B.; LOZANO, M.T.; ABAD, M.E.; HERNANDEZ, M.P.G. Electron-microscopic immunocytochemical study of the endocrine pancreas of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Cell Tissue Res.**, v.274, n.2: p.303-314, 1993.
- ALBERTS, B; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da Célula**. 3<sup>a</sup>ed. Porto Alegre: Artes Médicas: 1997. 1293p.
- ANGELESCUS, V. & GNERI, F. S. Adaptaciones del aparato digestivo al régimen alimenticio in algunos peces del rio Uruguay e del rio de la Plata. **Ver. Inst. Invest. Mus. Argent. Cienc. Nat.**, v.1, n.6: p.161-272, 1949.

- ARGENZIO, R.A. Funções gerais do trato gastrointestinal e seu controle e integração. *In*: SWENSON, M.J, & REECE, W.O. **Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856p.
- BARRINGTON, E.J.W. The alimentary canal and digestion. *In*: HOAR, W.S. & RANDALL, D.J. **Fish Physiology - excretion, ionic regulation and metabolism**. v.1, New York: Academic Press, 1969, p.391-432.
- BÉRTIN, L. Appareil digestif. *In*: GRASSÉ, P.P. (Ed). **Traité de zoologie**. v.13, Paris: Masson, 1958, p.1249-1301.
- BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias**. 3 ed. Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações/CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca, 1988. 115p.
- BROWN, J.C. An overview of gastrointestinal endocrine physiology. **Gastr. Horm. Med.**, v.22 (4): p.719-729, 1993.
- CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal, S.P.: FUNEP, 1992, 189p.
- CHAVES, P.T.C. & VAZZOLER, G. Aspectos biológicos dos peixes amazônicos. III. Anatomia microscópica do esôfago, estômago e cecos pilóricos de *Semaprochilodus insignis* (Characiformes: Prochilodontidae). **Acta Amazonica**, 14 (3-4): 343-353. 1984.
- CHENG, H. & LEBLOND, C.P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse intestine. V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cells types. **Am. J. Anat.**, v.141, p.537-566, 1974.
- CHIBA, A. Ontogeny of serotonin-immunoreactive cells in the gut epithelium of the cloudy dogfish, *Scyliorhinus torazame*, with reference to coexistence of serotonin and neuropeptide Y. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.111, n.3: p.290-298, 1998.
- COETZEE, H.L.; NEL, M.M.; SWANEPOEL, J.H. Light, electron microscopical and immunocytochemical investigation of the stomach wall of the tigerfish *Hydrocynus forskahlii*. **J. Morphol.**, v.208: p.311-321, 1991.
- DICKSON, W. Glândulas Endócrinas. *In*: SWENSON, M.J, & REECE, W.O. **Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856p.

- DOCKRAY, G.; VARRO, A.; DIMALINE, R. Gastric endocrine cells: gene expression, processing, and targeting of active products. **Physiol. Rev.**, v.76, n.3: p.767-798, 1996.
- DOUARIN, N.M. On the origin of pancreatic endocrine cells. **Cell**, v.54: p.169-171, 1988.
- DOUARIN, N.M. & TEILLET, M.A. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v.30: p.31-40, 1973.
- ELBAL, M.T. & AGULLEIRO, B. An immunocytochemical and ultrastructural study of endocrine cells in the gut of a teleost fish, *Sparus auratus*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.64, n.3: p. 339-354, 1986.
- ELBAL, M.T.; LOZANO, M.T.; AGULLEIRO, B. The endocrine cells in the gut of *Mugil saliens* Risso, 1810 (Teleostei): an immunocytochemical and ultrastructural study. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.70, n.2: p.231-246, 1988.
- EL-SALHY, M. Immunocytochemical investigation of the gastro-entero-pancreatic (GEP) neurohormonal peptides in the pancreas and gastrointestinal tract of the dogfish *Squalus acanthias*. **Histochemistry**, v.80, n.2: p.193-205, 1984.
- EPLLE, A. The endocrine pancreas. In: HOAR, W.S. & RANDALL, D.J. **Fish physiology - the endocrine system**. Vol.2, New York: Academic Press, 1969, p.275-319.
- ERASMUS, C.P. & VAN ASWEGEN, G. The endocrine pancreas of the Cape fur seal, *Arctocephalus pusillus*, Schreber, 1776 - an immunocytochemical study. **Onders. J. Vet. Res.**, v.6, n.3: p.239-242, 1997.
- EUCLYDES, R.F. **Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para análises estatísticas e genéticas)**. Viçosa, UFV-CPD, 1983. 59p.
- FÄNGE, R. & GROVE, D. Digestion. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; BRETT, J.R. **Fish physiology - bioenergetics and growth**. Vol.8, New York: Academic Press, 1979, p.161- 259.
- FALKMER, S. Phylogeny and ontogeny of the neuroendocrine cells of the gastrointestinal tract. **Endocrinol. Metab. Clin. North American.**, v.22, n.4: p.731-751, 1993.
- FONTAINE, J.& DOUARIN, N.M. Analysis of endoderm formation in the avian blastoderm by the use of quail-chick chimaeras: the problem of

the neuroectodermal origin of the cells of the APUD series. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v.41: p.209-221, 1977.

FONSECA, C. C. **Identificação imunocitoquímica e ultraestrutural das células produtoras de glucagon no pâncreas e nas mucosas do corpo do estômago, do íleo e do cólon durante o desenvolvimento do gambá *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (Marsupialia)**. Belo Horizonte, MG: UFMG, 1996, 180p. Dissertação (Doutorado em Morfologia) - Universidade Federal de Minas Gerais.

FONSECA, C. C.; NOGUEIRA, J. C.; BARBOSA, A. J. A. Immunocytochemical and quantitative study of glucagon-immunoreactive cells in the ileum and colon of the developing opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). **Cell, Tissue & Organ.** Fevereiro 2001.

FORSSMANN, W.G.; ORCI, L.; PICTE, R.; RRENOLD, A.E.; ROUILLER, C.H. The endocrine cells in epithelium of the gastrointestinal mucosa of rat. **J. Cell Biol.**, v.40: p.692-707, 1969.

GABE, M. & MARTOJA, M. Données histologique sur les cellules endocrines, gastriques et pancréatique de *Mugil auratus* (Téléostéen, Mugiliforme). **Arch. D'Anat. Microsc. Morphol. Expérimentale**, v.60, n.3: p.219-234, 1971.

GANONG, W.F. **Fisiologia Médica**. 17<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998, 578 p.

GARGIULO, A.M.; CECCARELLI, P.; Dall'AGLIO, C.; PEDINI, V. Ultrastructural study on the stomach of *Tilapia* spp (Teleostei). **Anat. Histol. Embryol.**, v.26, n.4: p.331-336, 1997.

GARGIULO, A.M.; CECCARELLI, P.; Dall'AGLIO, C.; PEDINI, V. Histology and ultrastructure of the gut of the *Tilapia* spp (Teleostei). **Anat. Histol. Embryol.**, v.27, n.2: p.89-94, 1998.

GOMIDE, A.T.M. **Anatomia funcional e morfometria comparativas do tubo digestivo de trairão (*Hoplias cf. lacerdae* Ribeiro, 1908) (Characiformes, Erythrinidae), em diferentes classes de tamanho**. Viçosa, MG: UFV. 1996. 76p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.

GRATZL, M. Molecular aspects of secretory granule exocytosis by neurons and endocrine cells. **Ann. New York Acad. Sci.** v.733: p.223-232, 1994.

GRIMELIUS, L. A silver nitrate stain for  $\alpha_2$  cells in human pancreatic islets. **Acta. Soc. Med. Upsal.** v.73: p.43-270, 1968.

- GROFF, K.E. & YOUSON, J.H. Na immunohistochemical study of the endocrine cells within the pancreas, intestine and stomach of the gar (*Lepisosteus osseus*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.106, n.1: p.1-16, 1997.
- GRUBE, D. The endocrine cells of the digestive system: amines, peptides, and modes of action. **Anat. Embryol.**, v.175: p.151-162, 1986.
- GUYTON, A.C. & HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997. 1014 p.
- HELANDER, H. The cells of the gastric mucosa. **International review of cytology**. v.70: p. 217-288, 1981.
- HERNANDEZ, M.P.G. & AGULLEIRO, B. Ontogeny of the endocrine pancreas in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) - ultrastructural study. **Cell Tissue Res.**, v.270: p.339-352. 1992.
- HERNANDEZ, M.P.G.; LOZANO, M.T.; AGULLEIRO, B. Ontogeny of the endocrine cells of the intestine and rectum of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) - na ultrastructural study. **Anat. Embryol.**, v.190, n.6: p.529-539, 1994 <sup>a</sup>
- HERNANDEZ, M.P.G.; LOZANO, M.T.; AGULLEIRO, B. Ontogeny of the endocrine cells of the stomach of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) - an ultrastructural study. **Anat. Embryol.**, v.190, n.5: p.507-514, 1994 <sup>b</sup>.
- HERNANDEZ, M.P.G.; LOZANO, M.T.; AGULLEIRO, B. Ontogeny of the endocrine pancreas in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) - an ultrastructural study. 1. The primordial cord and the primitive, single and primordial islets. **Cell Tissue Res.**, v.276, n.2: p.309-322, 1994 <sup>c</sup>.
- HERMITE, A.L.; FERRAND, R.; DUBOIS, M.P.; ANDERSEN, A.C. Detection of endocrine cells by immunofluorescence method in the gastroenteropancreatic system of the adult Eel, glass-Eel, and leptocephalic larva (*Anguilla anguilla*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.58: p.347-359, 1985.
- HERSEY, S.J. & SACHS, G. Gastric acid secretion. **Physiol. Ver.**, v.75, n.1: p.155-167, 1995.
- HILDEBRAND, M. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu Editora, 1995, 221-239 p.
- HOAR, W.S. & NICKMAN, C.P. **A laboratory companion for general and comparative physiology**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1967, 262p.

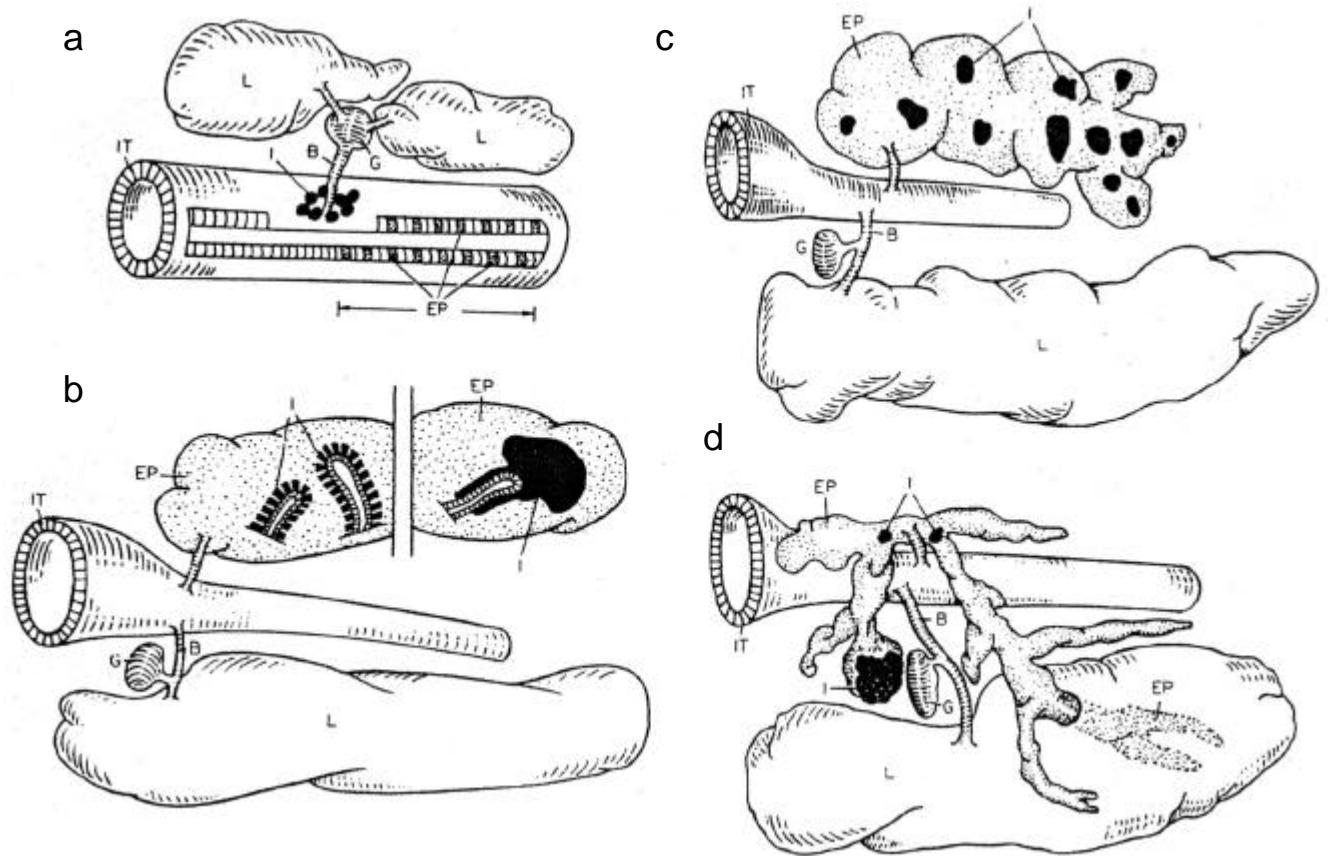
- HÖCKER, M. & WIEDENMANN, B. Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. **Ann. New York Acad. Sci.**, v.733: p.160-174, 1994.
- HSU, C.T., BAILEY, C.M., DiCARLO, S.E. "Virtual rat": a tool for understanding hormonal regulation of gastrointestinal function. **Adv Physiol. Educ.**, v.21, n.1: p.S23-S38, 1999.
- ITO, H.; HASHIMOTO, Y.; KITAGAWA, H.; KON, Y.; KUDO, N. Ontogeny of gastroenteropancreatic (GEP) endocrine cells in mouse and porcine embryos. **Jpn. J. vet. Sci.**, v.50: p. 99-110, 1987.
- JOHNSON, D.E.; TORRENCE, J.L.; ELDE, R.P.; BAUER, G.E.; NOE, B.D.; FLETCHER, J. Immunohistochemical localization of somatostatin, insulin and glucagon in the principal islets of anglerfish (*Lophius americanus*) and the channer catfish (*Ictalurus punctata*). **Am. J. Anat.**, v.147: p.119-124, 1976.
- JUNQUEIRA, L. C. & JUNQUEIRA, L. M. N. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. Santos, São Paulo, 1983.
- KRALJ-KLOBUCAR, N. Comparative analysis of gastrin-immunoreactive and argyrophil cells in bony fish larvae. **Folia Histochem. Cytobiol.**, v.25, n.2: p.133-136, 1987.
- LANGLEY, K. The neuroendocrine concept today. **Ann. New York Acad. Sci.**, v.733: p.1-17, 1994.
- LOGATO, P.V.R. Anátomo-histologia funcional do aparelho digestivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characiformes, Cgarcudaem Myelinae). **Tese**. Viçosa, MG: UFV, 118p., 1995. Dissertação (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- LOPEZ, J.; CUESTA, N.; CUTTITTA, F.; MARTINEZ, A. Adrenomedullin in nonmammalian vertebrate pancreas: An immunocytochemical study. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.115, n.3: p.309-322, 1999.
- LOZANO, M.T. & AGULLEIRO, B. Immunocytochemical and ultrastructural study of endocrine pancreas of *Mugil auratus* and *Mugil saliens* (Teleostei). **J. Submicrosc. Cytol.**, v.18, n.1: p.85-89, 1986.
- MAGLIO, M. & PUTTI, R. Morphological basis of the interactions between endocrine cell types in the pancreatic islets of the teleost, *Blennius gattoruggine*. **Tiss. Cell.**, v.30, n.6: p.672-683, 1998.
- McINTOSH, C.H.S. Control of gastric acid and the endocrine pancreas by gastrointestinal regulatory peptides. **Amer. Zool.**, v.35: p.455-465, 1995.

- McMANUS, J. F. A. & MOWRY, R. W. **Staining methods histologic and histochemical**. New York: P. B. Hoeber, 1960. 423p.
- MENIN, E. **Anátomo-histologia funcional comparativa do aparelho digestivo de seis Teleostei (Pisces) de água doce**. São Paulo, SP: USP, 557p., 1988. Dissertação (Doutorado) - Universidade de São Paulo.
- MENIN, E. & MIMURA, O. M. Anatomia funcional da cavidade bucofaringeana de *Pimelodus* sp. (Siluriformes, Pimelodidae). **Rev. Ceres**, v.38, n.218: p. 286-304, 1991.
- MENIN, E. & MIMURA, O. M. Anatomia funcional da cavidade bucofaringeana de *Prochilodus marggravii* Wallbaum, 1792 e *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Characiformes, Prochilodontidae). **Rev. Ceres**, v.39, n.226: p.507-528, 1992.
- MENIN, E. & MIMURA, O. M. Anatomia do estômago de duas espécies de peixes Teleostei de água doce, *Prochilodus marggravii* Wallbaum, 1792 e *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Characiformes, Prochilodontidae), de hábito alimentar iliófago. **Rev. Ceres**, v.40, n.229: p.253-271, 1993<sup>a</sup>.
- MENIN, E. & MIMURA, O. M. Anatomia do estômago de três espécies de peixes Teleostei de água doce de hábito alimentar iliófago. **Rev. Ceres**, v.40, n.228: p.203-222, 1993<sup>b</sup>.
- MORAES, M.F.P. & BARBOLA, I.F. Hábito alimentar e morfologia do tubo digestivo de *Hoplias malabaricus* (Osteichithyes, Erythrinidae), da lagoa Dourada, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. **Acta Biol. Par.**, Curitiba, 24 (1,2,3,4): 1-23. 1995.
- MORBERG, K.U. The gastrointestinal tract in growth and reproduction. **Sci. Am.**, v.7: p.60-65, 1989.
- MURRAY, H. M.; WRIGHT, G. M.; GOFF, G. P. A comparative histological and histochemical study of the stomach from three species of pleuronectid, the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, the yellowtail flounder, *Pleuronectes ferruginea*, and winter flounder, *Pleuronectes americanus*. **Can. J. Zool.**, v.72: p.1199-1210, 1994.
- NIKOLSKY, G. V. **The ecology os fishes**. London: Academic Press, 1963, 325p.
- NULAND, S.B. **A Sabedoria do Corpo**. Rio de Janeiro: Rocco, 1998, 500p.
- PICTET, R.L.; RALL, L.B.; PHELPS, P.; RUTTER, W.J. The neural crest and the origin of the insulin-producing and other gastrointestinal hormone-producing cells. **Science**, v.191: p.191-196, 1976.

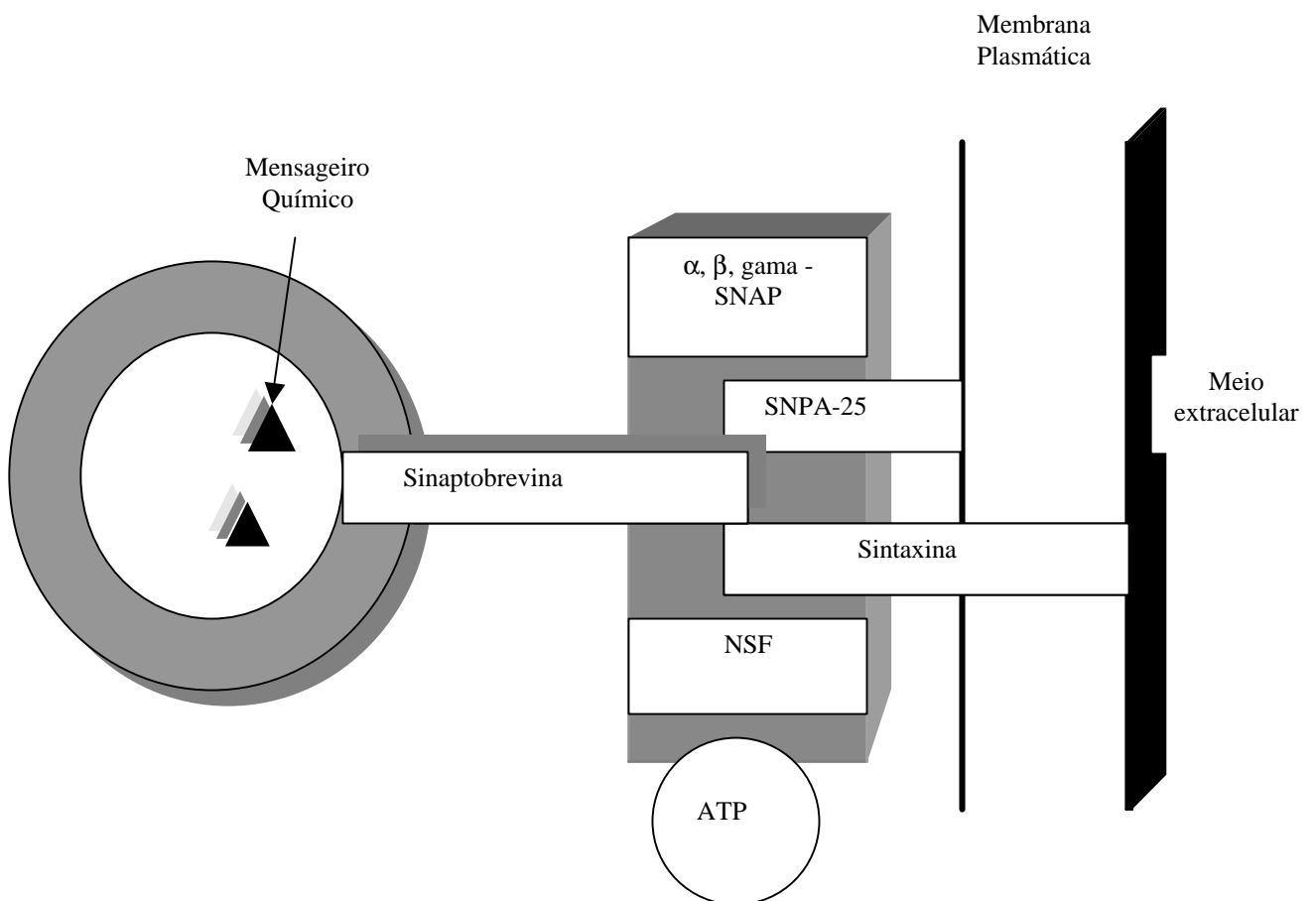
- POLAK, J. M.; BISHOP, A. E.; BARBOSA, A. J. A.; BLOOM, S. R. Hormônios gastrointestinais. In: R. DANI & P. CASTRO (eds) **Gastroenterologia Clínica**, v. 2. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1993, 1446-1465p.
- PONTER, A.A. & DUVAUX-PONTER, C. Contrôle hormonal de la fonction digestive. **Recueil Med. Vétér.**, v.169, n.11/12: p.871-884, 1993.
- POUGH, F. H.; HEISER, J. B.; McFARLAND, W. N. **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu Editora, 1993, 183-306p.
- PREJS, A. Metodos para el estudio de los alimentos y las relaciones troficas de los peces. Caracas, **Universidad Central de Venezuela y Universidad de Varsovia**, 129p. 1981.
- REHFELD, J.F. The new biology of gastrointestinal hormones. **Physiol. Rev.**, v.78, n.4: p.1087-1108, 1998.
- REINECKE, M.; MULLER, C.; SEGNER, H. An immunohistochemical analysis of the ontogeny, distribution and coexistence of 12 regulatory peptides and serotonin in endocrine cells and nerve fibers of the digestive tract of the turbot, *Scophthalmus maximus* (Teleostei). **Anat. Embryol.**, v.195, n.1: p.87-101, 1997.
- RICKER, W. E. **Methods for Assessment of Fish Production in Fresh Waters**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1968. 313p.
- ROJAS, J.R.M. Hábitos alimentarios del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. **Rev. Biol. Trop.**, 44 (1)/ 45 (1): 471-476. 1997.
- ROMBOUT, J.H.W.M. Enteroendocrine cells in the digestive tract of *Barbus conchoniis* (Teleostei, Cyprinidae). **Cell Tiss. Res.**, v.185: p.435-450, 1977.
- ROMBOUT, J.H.W.M.; RADEMAKERS, L.H.P.M.; VanHEES, J.P. Pancreatic endocrine cells of *Barbus conchoniis* (Teleostei, Cyprinidae) and their relation to the enteroendocrine cells. **Cell Tiss. Res.**, v.203: p.9-23, 1979.
- ROMBOUT, J.H. & TAVERNE-THIELE, J.J. An immunocytochemical and electron-microscopical study of endocrine cells in the gut and pancreas of a stomachless teleost fish, *Barbus conchoniis* (Cyprinidae). **Cell Tissue Res.**, v.227, n.3: p.577-593. 1982.
- ROMER, A.S. & PARSONS, T.S. **Anatomia comparada dos vertebrados**. Atheneu Editora, São Paulo, 1985, 302-320p.

- RONNBLOM, A.; DANIELSSON, A.; EL-SALHY, M. Intestinal endocrine cells in myotonic dystrophy: an immunocytochemical and computed image analytical study. **J. Int. Med.**, v.245: p.91-97, 1999.
- SANTOS, C. A. N. **Anátomo-histologia funcional do aparelho digestivo de *Brycon nattareri* Güther, 1864 (Teleoptei, Characiformes, Characidae, Bryconinae)**. Viçosa, MG: UFV, 119p., 1999. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa.
- SANTOS, G.C. & ZUCOLOTO, S. Células endócrinas gastrointestinais: breve histórico e principais métodos de identificação à microscopia óptica. **Arq. Gastroenterol.**, v.33, n.1: p.36-44, 1996.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal - Adaptação e Meio Ambiente**. 6<sup>a</sup>ed. , São Paulo: Santos Editora, 1996, 600 p.
- SEIXAS FILHO, J. T. **Anatomia funcional e sistemas enzimático e endócrino de Teleostei (Pisces) de água doce com hábitos alimentares diferentes**. Viçosa, MG: UFV, 175p., 1998. Dissertação (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa.
- STEFAN, Y. & FALKMER, S. Identification of four endocrine cell types in the pancreas of *Cottus scorpius* (Teleostei) by immunofluorescence and electron microscopy. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.42: p.171-178, 1980.
- TAGLIAFIERRO, G.; BONINI, E.; FARALDI, G.; FARINA, L.; ROSSI, G.G. Distribution and ontogeny of VIP-like immunoreactivity in the gastro-entero-pancreatic system of a cartilaginous fish *Scyliorhinus stellaris*. **Cell Tiss. Res.** v.253, n.1: p.23-28, 1988.
- WELCH, D.W. Anatomical specialization in the gut of pacific salmon (*Oncorhynchus*): evidence for oceanic limits or salmon production. **Can. J. Zool.** 75: 936-942. 1997.
- YANG, H.; MORRISON, C.M.; COLON, J.M.; LAYBOLT, K.; WRIGHT, J.R. Immunocytochemical characterization of the pancreatic islet cells of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.114, n.1: p.47-56, 1999.
- ZAVALA-CAMIN, L.A. Introdução aos estudos sobre alimentação natural em peixes. **EDUEM**, 129p. 1996.

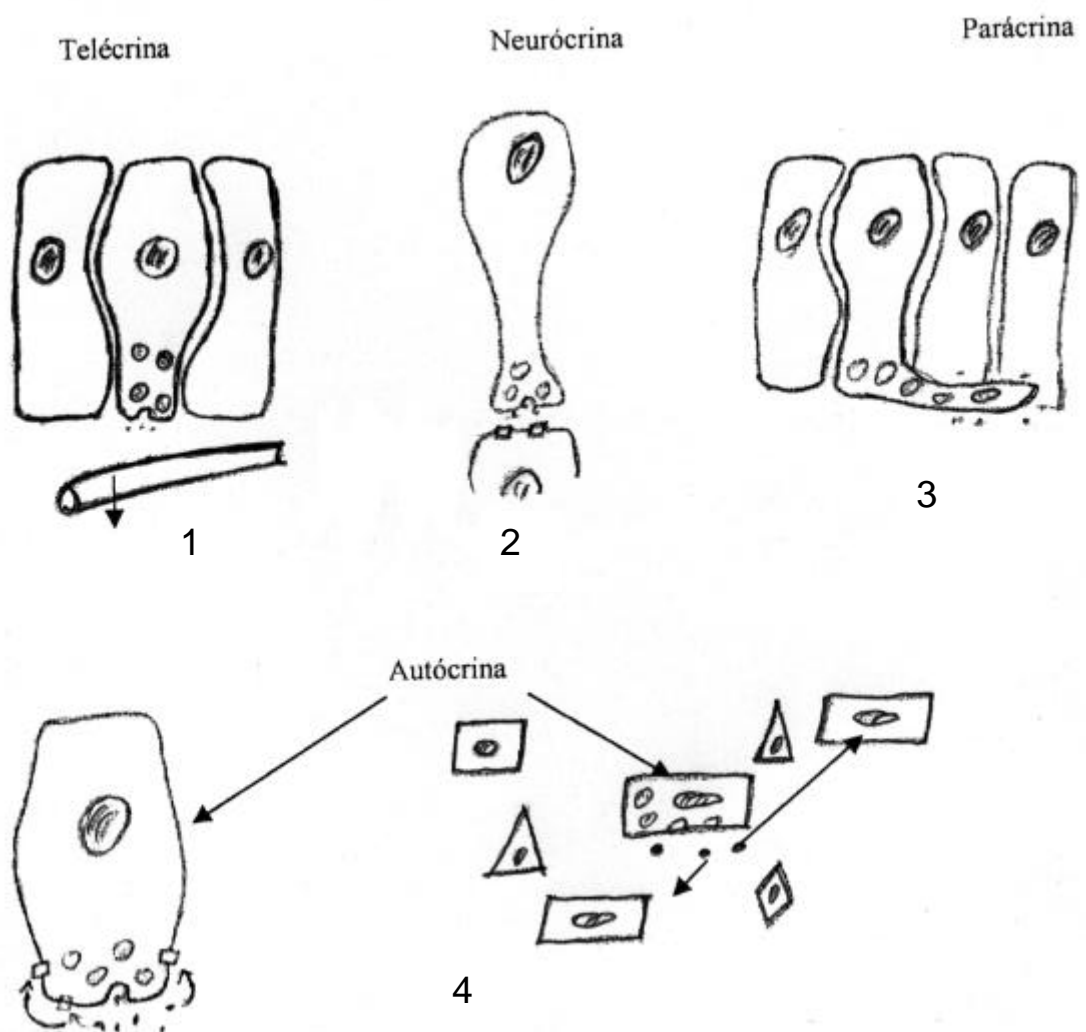
## APENDICE A



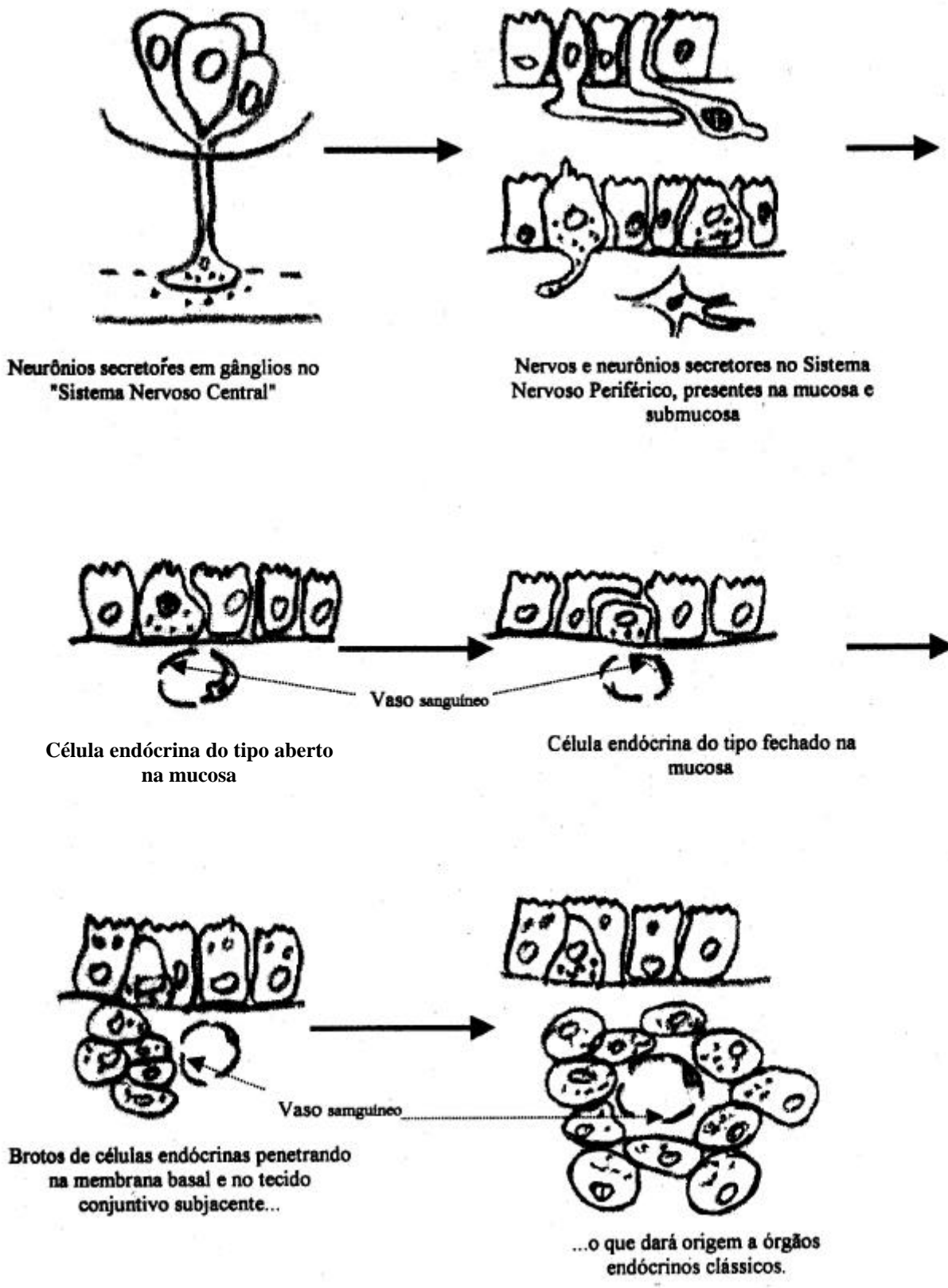
**Figura 1.** Tipos de pâncreas de peixes: a) Tipo ciclóstomo (*Myxine*), com as células foliculares das ilhotas próximas a região distal do ducto biliar e o pâncreas exócrino é representado por células especializadas no epitélio da parede do tubo digestivo; b) Tipo Gnatostomata primitivo, vários tubarões apresentam pâncreas compacto com as células das ilhotas ocorrendo como camada externa aos ductos (esquerda), já nos Holocéfalos (direita) exemplifica um estágio intermediário para o tipo tetrápodo; c) Tipo tetrápodo, pâncreas compacto com ilhotas endócrinas espalhadas, semelhante ao que ocorre em alguns teleósteos (*Anguilla*); d) Tipo Actinopterygion (Teleósteo), na maioria dos actinopterygions o pâncreas exócrino tende a invadir outros órgãos, e a maioria das ilhotas endócrinas são originárias de uma porção endócrina compacta, que invade, durante a ontogênese, o tecido exócrino mas permanecem como uma massa endócrina compacta, denominada corpos de Brockmann. Fígado **L**; Pâncreas exócrino **EP**; Ilhotas **I**; Vesícula biliar **G**; ducto biliar **B**; Tubo digestivo **IT**. (Modificado de EPLLE, 1969).



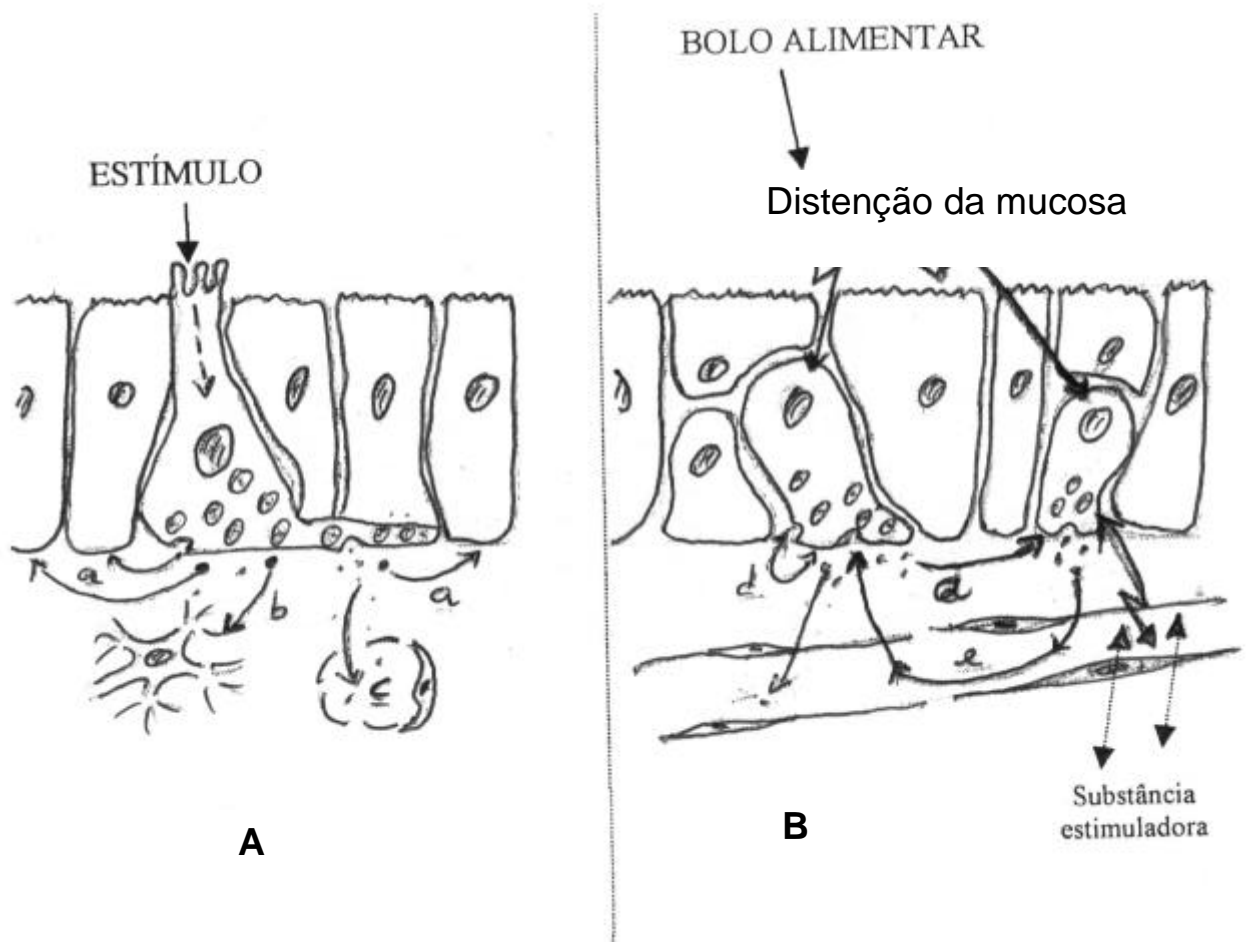
**Figura 2.** Esquema demonstrando a interação molecular da vesícula secretora com a membrana plasmática em uma célula endócrina. A proteína sinaptobrevina da vesícula interage com as proteínas SNAP-25 e sintaxina da membrana plasmática, por meio de proteínas solúveis de ligação à NSF e a NSF-ATP (proteína de fusão sensível a N-etilmaleimida, ligada a ATP). (Modificado de GRATZE, 1994).



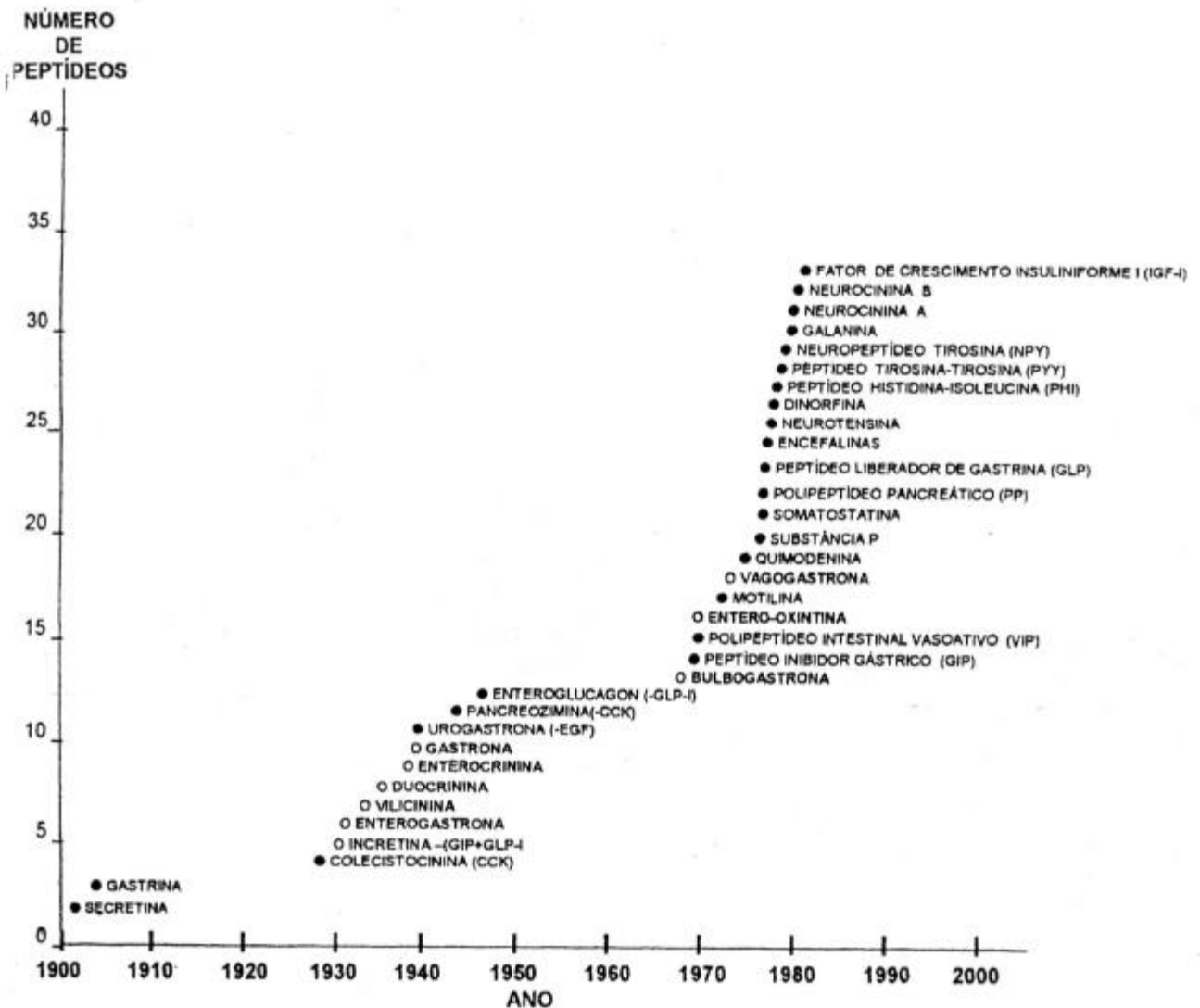
**Figura 3.** Representação esquemática dos diferentes mecanismos de comunicação química com ação fisiológica. (Modificado de ALBERTS et al., 1997; REHFELD, 1998).



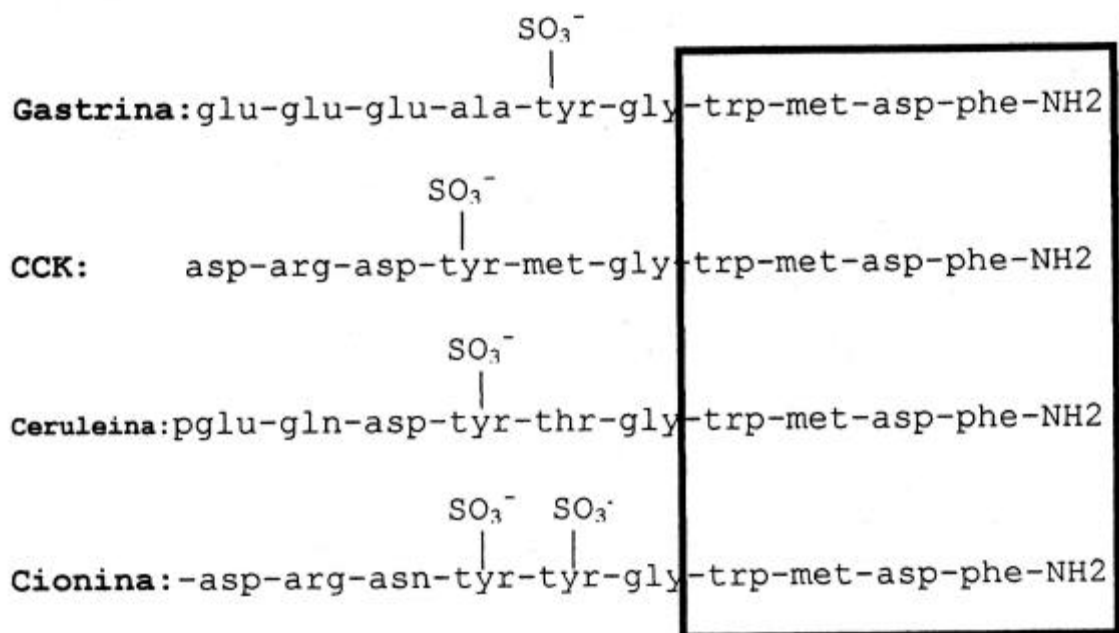
**Figura 4.** Esquema dos três principais componentes do sistema neuroendócrino e suas possíveis interações filogenéticas em ordem crescente de complexidade. (Modificado de FALKMER, 1993).



**Figura 5.** Ilustração mostrando os diferentes tipos de células endócrinas presentes no tubo digestivo; **A** – Tipo Aberto; **B** – Tipo Fechado. Há, também, a representação de alguns esquemas de comunicação química e interações existentes n sistema neuroendócrino: **a** (ação parácrina); **b** (ação neurócrina); **c** (ação endócrina); **d** (ação autócrina); **e** (ação autócrina, via circulação entérica).



**Figura 6.** Gráfico indicando a época de descoberta e identificação de várias das substâncias sinalizadoras do sistema neuroendócrino entérico. Os círculos escuros indicam a identificação estrutural e os círculos transparentes indicam atividade hormonal que ainda requer a identificação do hormônio responsável. Algumas atividades endócrinas ainda não identificadas podem ser parcialmente explicadas pela atividade do último sinal químico identificado, por exemplo, a atividade da incretina se deve parcialmente às atividades do GIP e do GLP-1. (Modificado de REHFELD, 1998).

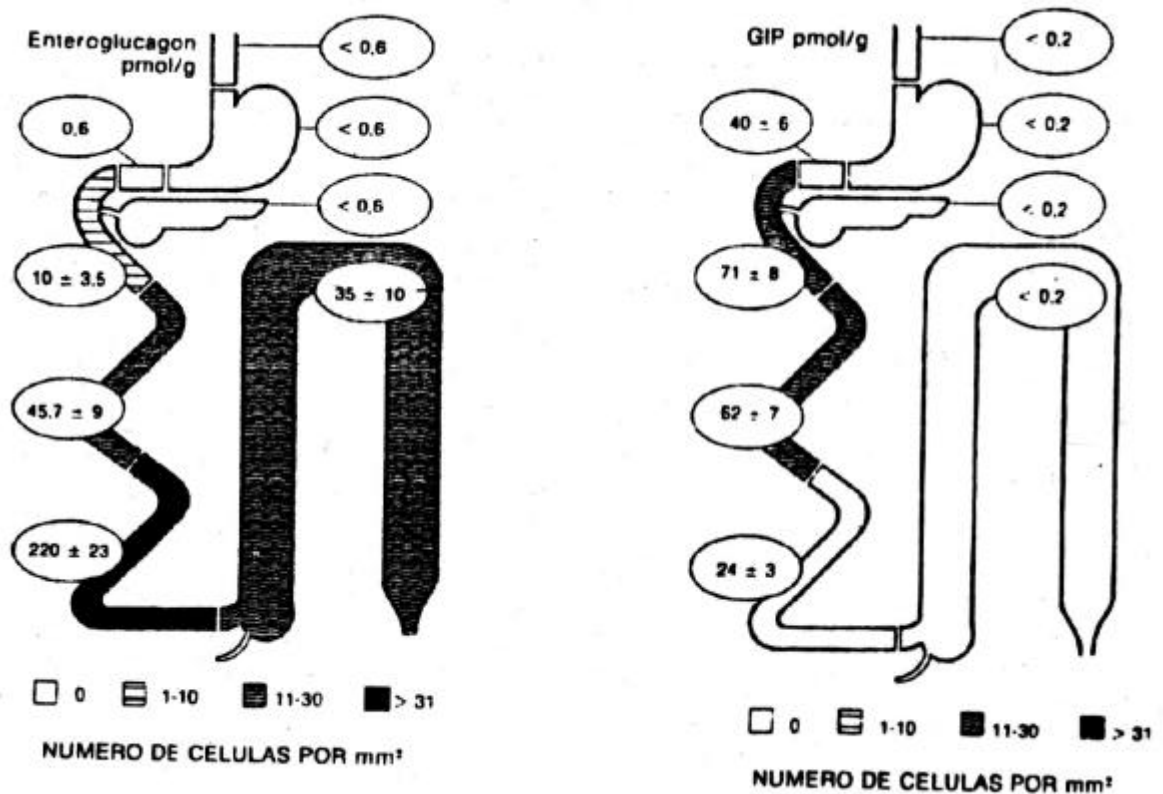


**Figura 7.** Estrutura homóloga dos membros da família da gastrina: gastrina, colecistocinina e cionina. O terminal comum amino-tetrapeptídeo terminal constitui a estrutura mínima necessária para a bioatividade. (Modificado de REHFELD, 1998).

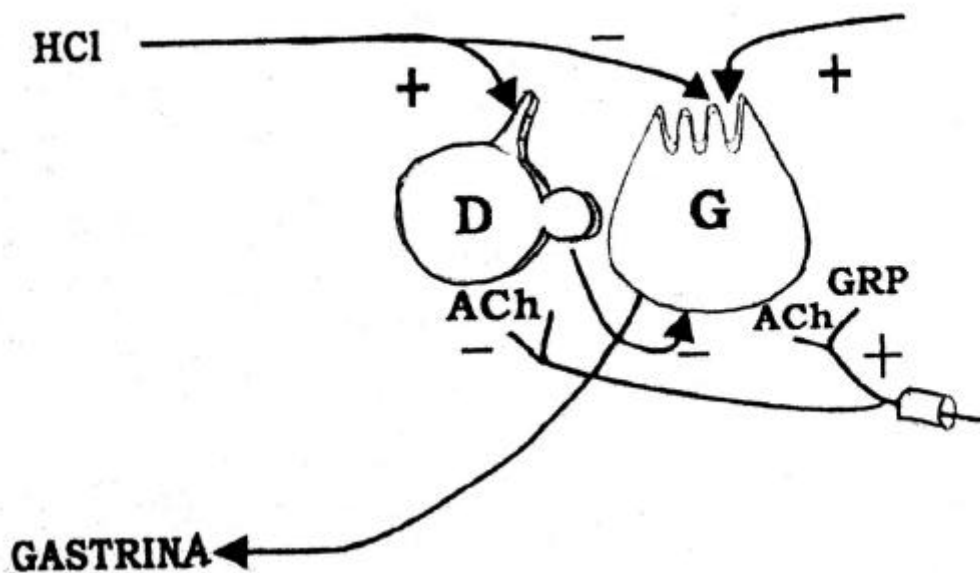
**Quadro 1.** Células endócrinas do sistema neuroendócrino gastroenteropancreático de humano. (Modificado de POLAK, 1993).

Célula	Principal Mediador químico	Estômago			Intestino	
		Pâncreas	Fundo	Piloro	Delgado	Grosso
P	Peptídeos ?	P	+	+	+	-
D1	Peptídeos ? VIP	R	R	R	R	+
EC	Serotonina	R	+	+	+	+
D	Somatostatina	+	+	+	+	R
B	Insulina	+	-	-	-	-
PP	Peptídeos pancreático	+			R	
A	Glucagon	+	F	-	-	-
X	?	-	+	+	-	-
ECL	Histamina	-	+	-	-	-
G	Gastrina			+	+	
IG	Gastrina	-	-	-	+	-
I	Colecistocinina	-	-	-	+	-
S	Secretina	-	-	-	+	-
K	Peptídeo inibidor gástrico	-	-	-	+	-
Mo	Motilina	-	-	-	+	-
N	Neurotensina	-	-	-	+	R
L	Peptídeo semelhante ao glucagon	-	-	-	+	+

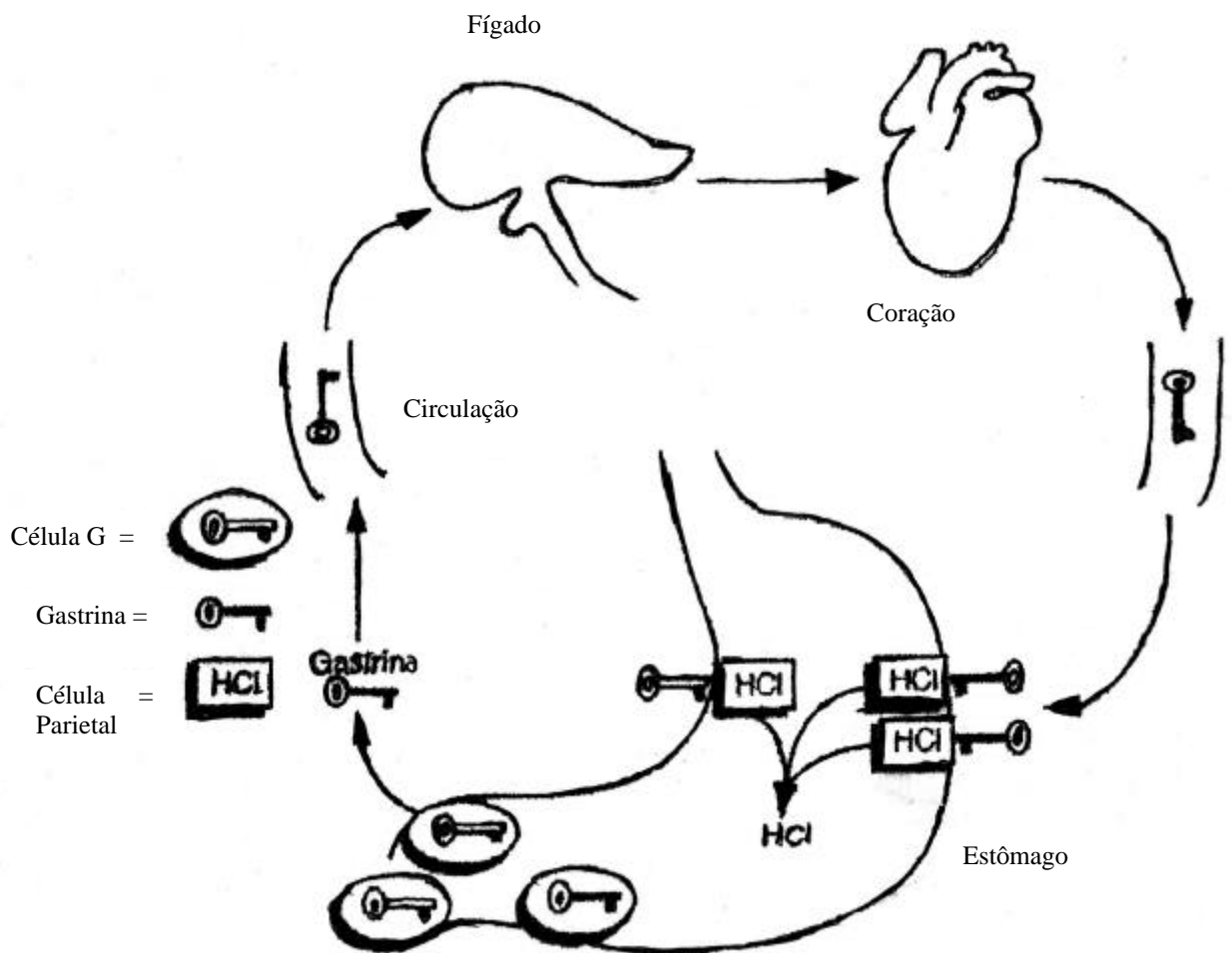
F – presentes no feto ou recém nascido; R – raras; + presentes; - ausentes



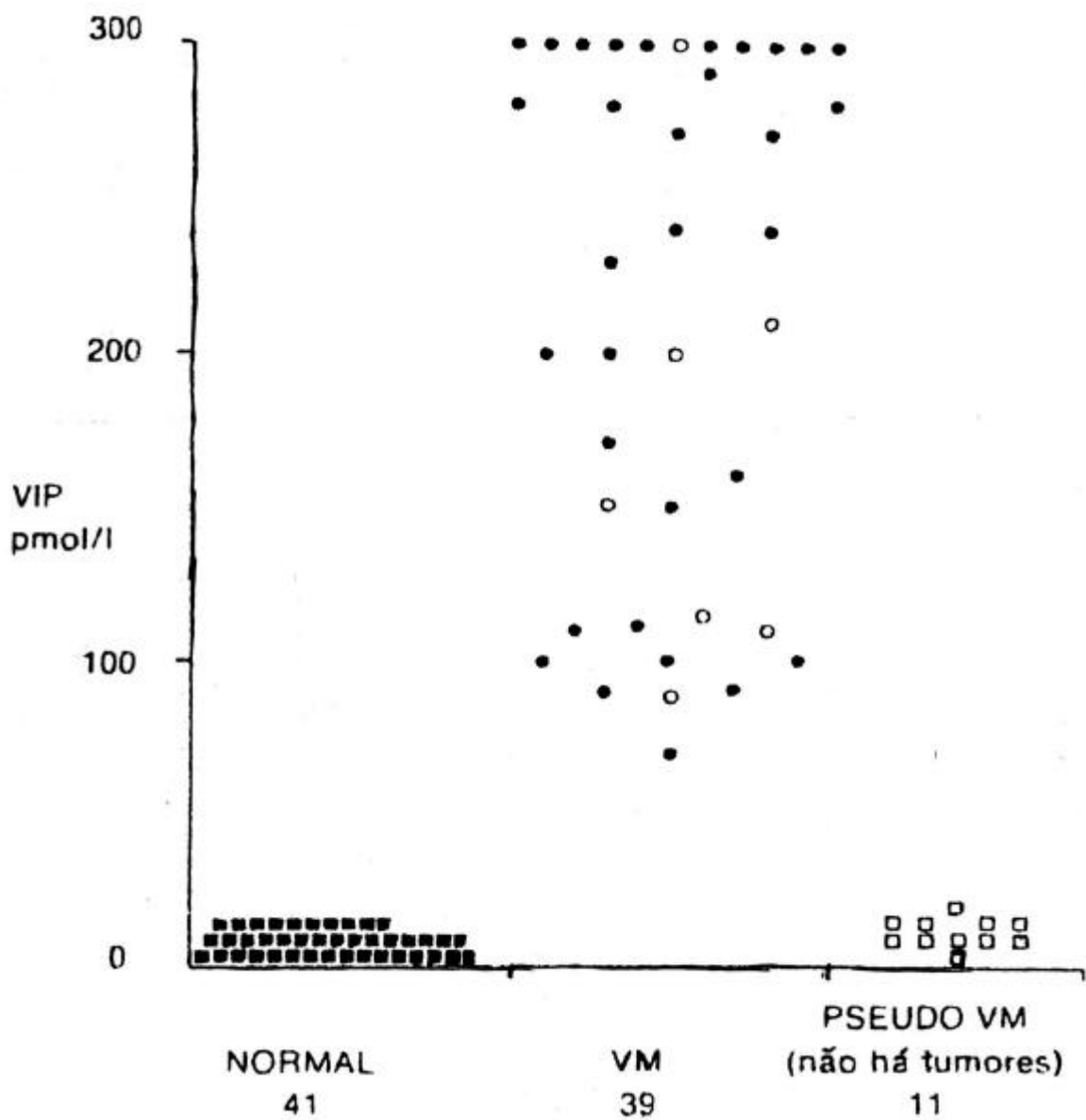
**Figura 8.** Distribuição e concentração das células produtoras de colecistocinina (CCK) e enteroglucagon, ao longo do tubo digestivo; foram utilizados métodos combinados de imunocitoquímica e radioimunoensaio para realizar a proporção (Modificado de POLAK, 1993).



**Figura 9.** Modelo da regulação das células G do antro do estômago , na secreção de gastrina. GRP – peptídeo liberador de gastrina; Ach – acetilcolina; HCL – ácido clorídrico; + estimulação; - inibição; D – células D, produtoras de somatostatina. (Modificado de HERSEY, 1995).



**Figura 10.** Simplificação do mecanismo de ação da gastrina, estimulando as células parietais a liberarem HCl (Modificado de HSU, 1999).



**Figura 11.** Níveis de VIP plasmático em pacientes com a síndrome de Verner-Morrison, pseudo-síndrome de Verner-Morrison e nos controles normais. (Modificado de POLAK, 1993).

## APENDICE B

### SOLUÇÃO FISIOLÓGICA PARA TELEOSTEI DE ÁGUA DOCE (HOAR & HICKMAN, 1967)

6,42g NaCl;

0,15g KCl;

0,22g CaCl<sub>2</sub>;

0,12g MgSO<sub>4</sub>;

0,084g NaHPO<sub>3</sub>;

0,06g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;

1L água destilada.

## APÊNDICE C

### SOLUÇÕES FIXADORAS

#### a) LÍQUIDO DE BOUIN

- 75 partes de ácido pícrico (750 mL);
- 25 partes de formaldeído (250 mL);
- 05 partes de ácido acético (50 mL).

(solução preparada na hora da fixação).

#### b) FORMOL 4% NEUTRO TAMPONADO

- formaldeído 40% (100 mL);
- água destilada (900mL);
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  anidro (6,5g).

## **APÊNDICE D**

### **SOLUÇÃO DE ADESÃO DE CORTES**

#### **Albumina – glicerina**

Solução filtrada de clara de ovo e glicerina (1:1), adicionada de cristais de timol.

## APÊNDICE E

### TAMPÃO ACETATO 0,02M pH5,6

- a) Solução A: ácido acético 0,02M
- b) Solução B - acetato de sódio:
  - b1) acetato de sódio anidro (PM82) – 1,65g
  - b2) 100 mL de água destilada

Tampão pH5,6:

4,8 mL de Solução A + 45,2 mL de solução B + 50 mL de água destilada

## APÊNDICE F

### SOLUÇÃO REVELADORA

- a) hidroquinona – 1g
- b) sulfito de sódio – 1 mL
- c) água destilada – 100 mL