

**DAIANE CRISTINA MARQUES DOS SANTOS**

**ASPECTOS DA MORFOLOGIA DO INTESTINO GROSSO DO GAMBÁ  
*Didelphis aurita* (WIED-NEUWIED, 1826) COM ÊNFASE NAS CÉLULAS  
ENTEROENDÓCRINAS**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013**

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

T

S237a  
2013 Santos, Daiane Cristina Marques dos, 1982-  
Aspectos da morfologia do intestino grosso do gambá  
*Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826) com ênfase nas células  
Enteroendócrinas / Daiane Cristina Marques dos Santos –  
Viçosa, MG, 2013.  
x, 74f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Texto em português e inglês  
Orientador: Cláudio César Fonseca  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Imunohistoquímica. 2. Histoquímica. 3. Morfologia.  
4. Intestino grosso. 5. Gambá. 6. Microscopia eletrônica.  
7. Insulina. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento  
de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 573.37

DAIANE CRISTINA MARQUES DOS SANTOS

ASPECTOS DA MORFOLOGIA DO INTESTINO GROSSO DO GAMBÁ  
*Didelphis aurita* (WIED-NEUWIED, 1826) COM ÊNFASE NAS CÉLULAS  
ENTEROENDÓCRINAS

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

APROVADA: 27 de fevereiro de 2013.

---

Alfredo Jose Afonso Barbosa

---

Ita de Oliveira e Silva

---

Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado

---

Mariana Machado Neves

---

Cláudio César Fonseca  
(Orientador)

*À minha família e,  
em especial, ao meu amado esposo Dierlei,  
com todo amor e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela certeza de Sua presença em minha vida e por ser o meu refúgio em todos os momentos. A Ele, toda a minha gratidão.

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

Ao meu orientador, Professor Cláudio César Fonseca, por todos os ensinamentos e pela oportunidade de me orientar neste trabalho, com paciência, atenção e dedicação.

Aos meus Professores e Coorientadores, Sérgio e Sirlene, pelos ensinamentos, pelas sugestões e, principalmente, pela amizade, o que muito contribuiu para a minha formação profissional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, especialmente aos que atuam no Laboratório de Biologia Estrutural, pelos ensinamentos, pela amizade e pelo incentivo.

Aos Professores Izabel, Mariana, Ita e Alfredo, por terem, gentilmente, aceitado participar da minha banca de defesa da tese, contribuindo para o meu crescimento profissional e pelo enriquecimento deste trabalho.

Ao Professor Alfredo, por, gentilmente, ter concedido parte do material necessário ao desenvolvimento desta pesquisa.

Aos professores e funcionários do Museu de Zoologia João Moojen, pela cessão do local e das armadilhas para a captura dos animais.

Ao Professor da Graduação José Ricardo Pachaly, por ter sido o responsável pelo meu ingresso na pesquisa científica.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, por ter permitido a realização de algumas das técnicas empregadas nesta tese.

À Beth, secretária do Departamento de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela disponibilidade em ajudar sempre.

Aos Técnicos de Laboratórios Alex, Monteiro e Matheus, pela amizade, pelas conversas entre os momentos de trabalho e pela colaboração.

Ao Ítalo, Marli, Rômulo, Madu e Daniel, pela valiosa colaboração neste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus amigos do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela amizade, pelas conversas, pelos momentos de descontração e por todo o incentivo.

À minha querida amiga Marli, por todos os momentos maravilhosos de alegria e pela amizade duradora e sincera.

Aos meus casais amigos Magali e César, Lucir e Cristina, agora distantes, mas que continuarão meus eternos amigos.

Aos meus amigos e vizinhos Carmem e Ivan, pela amizade construída, pelos momentos de distração e pelas conversas agradáveis.

Aos meus pais Juraci e Creuza, por me dar a base para construir meu caráter, por me apoiar em todos os momentos, pelo amor incondicional, pela dedicação e por todas as palavras de incentivo nos momentos difíceis.

Ao meu esposo Dierlei, por todo o amor, pelo carinho e pela compreensão, pelo incentivo e apoio nos momentos de dificuldades e, principalmente, por tornar minha vida mais feliz. Amo você!

À minha querida irmã Mariana, pela amizade, pelo apoio e carinho e, principalmente, pelo amor que nos une.

A toda a minha família, especialmente aos meus irmãos, sobrinhos, sogros e cunhados, pelo carinho e amor sempre.

## **BIOGRAFIA**

DAIANE CRISTINA MARQUES DOS SANTOS, filha de Juraci Marques e Creuza Barbosa, nasceu na cidade de Umuarama, Paraná, em 15 de janeiro de 1982.

Em 1999, concluiu o ensino médio na EEEFM Aurélio Buarque de Holanda Ferreira, em Nova Brasilândia D'oeste, Estado de Rondônia.

Em 2001, iniciou o Curso de Ciências Biológicas, com ênfase em Biotecnologia, na Universidade Paranaense – UNIPAR, na cidade de Umuarama, graduando-se Bacharela e Licenciada em janeiro de 2005.

Em de 2005, lecionou disciplinas de Biologia e Química para o ensino médio na Escola Estadual Princesa Isabel, de São Miguel do Guaporé, em Rondônia.

Em agosto de 2007, iniciou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo a Dissertação em 18 de fevereiro de 2009.

Nessa mesma Instituição, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Biologia Celular e Estrutural da UFV, submetendo-se à defesa da Tese no dia 27 de fevereiro de 2013.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS .....	6
ARTIGO 1 .....	14
Morphologic characterization and distribution of argyrophil, argentaffin, and insulin-immunoreactive endocrine cells in the large intestine of the opossum <i>Didelphis aurita</i> (Wied-Neuwied, 1826).....	14
Abstract .....	14
Introduction.....	15
Material and methods.....	16
Results .....	19
Discussion.....	35
Conclusion.....	39
References.....	39
ARTIGO 2 .....	48
Quantificação das células endócrinas e estudo ultraestrutural dos grânulos de insulina no intestino grosso de gambá <i>Didelphis aurita</i> (Wied-Neuwied, 1826) 48	48
Resumo .....	48
Introdução .....	49
Material e métodos.....	51
Resultados .....	54
Discussão.....	61
Conclusão .....	66
Referências .....	66
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	74

## RESUMO

SANTOS, Daiane Cristina Marques dos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Aspectos da morfologia do intestino grosso do gambá *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826) com ênfase nas células enteroendócrinas.** Orientador: Cláudio César Fonseca. Coorientadores: Sérgio Luis Pinto da Matta e Sirlene Souza Rodrigues Sartori.

O aparelho digestório possui função crucial no controle da homeostase energética, sendo esse mecanismo regulador atribuído, em parte, às células enteroendócrinas. Estas células representam a maior população de células produtoras de hormônios do organismo de mamíferos eutérios e atuam no controle da secreção, absorção, motilidade e proliferação das células do aparelho digestório. Em razão da importância dessas células, teve-se por objetivos caracterizar a morfologia, identificar e quantificar as células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina do intestino grosso, nas regiões do ceco, cólons (ascendente, transverso e descendente) e reto de gambás *D. aurita*. Fragmentos da parede do intestino grosso de 10 espécimes machos de *D. aurita* foram coletados, processados e submetidos às técnicas de histoquímica, imuno-histoquímica e microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. As túnicas do intestino grosso de *D. aurita* apresentam características morfológicas descritas para os mamíferos eutérios. A camada muscular circular interna em todas as porções e regiões analisadas é mais espessa que a camada longitudinal externa, entre as regiões analisadas. Essa camada, no reto, apresentou-se mais espessa que no ceco e cólon ascendente. O número das células mucossecretoras aumentou da região do ceco em direção ao reto. Essas células exibem mucinas neutras e ácidas, indicando que a produção de muco é mista. Proporcionalmente, as células argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina representam, respectivamente, 62,75%, 36,26% e 0,99% do total determinado de células endócrinas do intestino grosso. Não houve diferença quantitativa entre as células endócrinas argirófilas e argentafins, enquanto as células imunorreativas à insulina são menos numerosas. As células endócrinas argirófilas e argentafins

apresentam formas alongada, piramidal ou arredondada e possuem núcleo ovoide e citoplasma com grande quantidade de grânulos de secreção. A maioria dessas células é do tipo aberto e apresenta prolongamento apical alcançando a superfície luminal. Outras células, sem comunicação aparente com o lúmen, do tipo fechado, são localizadas comumente na base das glândulas intestinais e possuem a porção basal geralmente dilatada e em maior contato com as células adjacentes. As células endócrinas imunorreativas à insulina são alongadas ou piramidais com núcleo arredondado, de contorno irregular, e possuem grande quantidade de grânulos de secreção distribuídos em todo o citoplasma. Os grânulos, de diferentes tamanhos e densidades eletrônicas, são classificados em imaturos e maduros. O padrão ultraestrutural dos grânulos das células imunorreativas à insulina é semelhante ao das células B de ilhotas pancreáticas. As formas maduras dos grânulos são predominantes e representam 65% do total dos grânulos de secreção.

## ABSTRACT

SANTOS, Daiane Cristina Marques dos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **The morphology aspects of the large intestine of the opossum with emphasis on the endocrine cells.** Adviser: Cláudio César Fonseca. Co-Advisers: Sérgio Luis Pinto da Matta and Sirlene Souza Rodrigues Sartori.

The digestive system has a crucial role in the control of energy homeostasis and this regulatory mechanism is partly attributed by the enteroendocrine cells. Such cells represent the largest population of hormone-producing cells of the organism of the eutherian mammals and act in the control of secretion, absorption, motility and proliferation of cells in the digestive tract. Because of the importance of those enteroendocrine cells, the objectives of this work was to characterize the morphology, to identify and quantify the argyrophil, argentaffin, and insulin-immunoreactive endocrine cells of the large intestine, in the cecum, colon (ascending, transverse, and descending) and rectum of the *Opossums D. aurita*. Fragments of the large intestine wall of 10 male opossum *D. aurita* specimens were collected, processed, and submitted to histochemistry, immunohistochemistry, and scanning transmission electron microscope. The tunics of the large intestine of *D. aurita* presented morphological characteristics that have already been described for eutherian mammals. The inner circular muscular layer on all portions and regions analyzed is thicker than the external longitudinal layer among the analyzed regions. This layer presented itself thicker in the rectum than in the cecum and ascending colon. The number of mucous secreting cells increased in the region of the cecum towards the rectum. These cells have acid and neutral mucins, indicating that the mucus production is mixed. Proportionately, the argyrophil, argentaffin, and insulin-immunoreactive endocrine cells represent 62.75%, 36.26% and 0.99% of the total determined in endocrine cells of the large intestine, respectively. There was no quantitative difference between argentaffin and argyrophil endocrine cells, while insulin-immunoreactive endocrine cells are less numerous. The argyrophil and argentaffin endocrine cells have elongated, pyramidal or rounded shapes, with

an ovoid nucleus and cytoplasm with large amount of secretion granules. Most of these cells is open type and has extension reaching the apical luminal surface. Other cells, without apparent communication with the lumen, of the closed type, are commonly located at the base of the intestinal glands, and have the basal portion usually dilated and greater contact with adjacent cells. The insulin-immunoreactive endocrine cells are elongated or pyramidal with rounded nuclei, irregular contour, and have loads of secretion granules distributed throughout the cytoplasm. The granules have different sizes and electron densities and are classified into immature and mature. The ultrastructural pattern of the granules of the insulin-immunoreactive endocrine cells is similar to that of B cells of pancreatic islets. The mature forms of the granules are predominant and represent 65% of the secretion granules.

## INTRODUÇÃO GERAL

A família Didelphidae, ordem Didelphimorphia, é composta por 19 gêneros e 100 espécies atualmente reconhecidas (Rossi et al., 2010). Esta ordem faz parte dos mamíferos metatérios e, portanto, não possuem placenta verdadeira. Dentre estes táxons, 16 gêneros e 55 espécies ocorrem no Brasil (Rossi e Bianconi, 2011). A família pode ser subdividida em duas sub-famílias: Caluromyinae e Didelphinae. Dentro de Didelphinae está o gênero *Didelphis* no qual estão os maiores animais da família (Gardner, 2008).

O gênero *Didelphis* é formado por seis espécies. Nas Américas do Norte e Central encontra-se o *Didelphis virginiana* e na América do Sul existem cinco espécies: *Didelphis marsupialis*, *D. albiventris*, *D. aurita*, *D. pernigrae* e *D. imperfecta* (Patton et al., 2003; Voss e Jansa, 2009). Há relatos na literatura de que *D. marsupialis* e *D. aurita* seriam a mesma espécie, no entanto, apresentam distribuição geográfica distinta sendo *D. marsupialis* da Amazônia e *D. aurita* da Mata Atlântica e, deste modo, isolados reprodutivamente (Aprígio-Assis, 2011), e constatou-se através de análises morfométricas (Cerqueira e Lemos, 2000) e características moleculares (Patton et al., 2003) que se tratam de espécies diferentes.

Conhecido como gambá-de-orelha-preta, raposa, saruê ou seriguê, *Didelphis aurita* (Figura 1) distribui-se na porção leste do Brasil, do estado de Alagoas ao norte do estado do Rio Grande do Sul, estendendo-se a oeste até o Mato Grosso do Sul, ocupando ainda o sudeste do Paraguai e a província de Misiones, na Argentina (Cerqueira e Lemos, 2000; Cerqueira e Tribe, 2008).



**Figura 1** – Espécime de *Didelphis aurita*. Foto: Thomas Püttker (Rossi e Bianconi, 2011).

Os gambás são escansoriais, de hábito noturno e muito ágil (Loretto e Vieira, 2005; Cunha e Vieira, 2005). Geralmente vivem próximos a cursos d'água, abrigando-se em ocos de árvores, entre raízes ou debaixo de folhas secas (Cáceres e Monteiro-Filho, 1998).

A espécie *D. aurita* apresenta uma listra escura na fronte e outra sobre cada olho. A orelha é grande, desprovida de pelos e negra. Sua coloração dorsal pode ser negra ou grisalha, devido à presença de pelos-guarda brancos que se sobressaem aos pelos de cobertura negros. A pelagem ventral é creme-amarelada. A cauda é preênsil e está coberta de pelos apenas na região próxima ao corpo (Rossi e Bianconi, 2011).

A reprodução da espécie inicia-se em julho e estende-se até fevereiro (Kajin et al., 2008). Possuem curto período de gestação (14-15 dias) e nascimento de filhotes em estágio imaturo, que escalam a pelagem da mãe até as glândulas mamárias, localizadas internamente ao marsúpio, onde se fixam até completarem o seu desenvolvimento (Samoto et al., 2006; Rossi e Bianconi, 2011).

Em relação ao hábito alimentar, a espécie tem sido considerada principalmente como onívora (Santori et al., 1995; Astúa de Moraes et al., 2003;

Casella, 2011)mas, algumas vezes, também é caracterizada como sendo especialmente frugívora (Stallings, 1989; Cáceres e Monteiro-Filho, 2001; Carvalho et al., 2005).No entanto, a variação na dietaparece estar associada à disponibilidade de recursos no ambiente, apresentando dieta oportunista e consumindo em maior quantidade os itens mais acessíveis em cada época do ano (Cáceres et al., 1999; Cáceres, 2003; Lessa e Geise, 2010).

Os marsupiaisdo gênero *Didelphis* apresentam particularidades que os colocam em evidência para pesquisa, entre as quais se destacam a origem ancestral, sendo considerados mamíferos morfológicamente primitivos,representam um elo na transição entre os *Prototheria* e *Eutheria* (MacAlester, 1994),e o curto período de gestação (Samoto et al., 2006) e a facilidade de acesso aos embriões, visto que o desenvolvimento embrionário se completa fora do útero.

A forma do aparelho digestório dos marsupiais Didelphidae é simples, com estômago unicavitário, intestino delgado e intestino grosso. A espécie *D. aurita* apresenta glândulas salivares grandes e longo intestino delgado, bastante eficiente na digestão de conteúdos ricos em proteínas e gorduras. O intestino grosso é bastante desenvolvido, em concordância com seu hábito alimentar (Santori et al., 2004).

Segundo Drucker (2007) o aparelho digestório possui papel crucial no controle da homeostase energética, através de sua ação na digestão e absorção de nutrientes ingeridos.Este mecanismo regulador é desenvolvido em parte pelas células enteroendócrinas.

Os didelfídeos vêm se destacando como modelo para estudos ontogênese, uma vez que a diferenciação do aparelho digestório é simultânea à presença do animal ainda no marsúpio (Krause et al., 1989; Fonseca et al., 2002b). Pesquisas imunohistoquímicas das células enteroendócrinas em marsupiais estão focadas no pâncreas, estômago e intestino delgado (Krause et al., 1985; Barbosa et al., 1987; Krause et al., 1989; Takagi et al., 1990; Fonseca et al., 2002a, Barbosa et al., 2006, Freitas-Ribeiro et al., 2011; 2012; Basile et

al., 2012), não havendo trabalhos referente à presença dessas células no intestino grosso, o que ressalta a necessidade e importância dessa pesquisa.

As células endócrinas distribuídas ao longo do aparelho digestório dos vertebrados correspondem a 1% do total das células que estão presentes no epitélio e representam a maior população de células produtoras de hormônios do corpo (Rehfeld 1998; Sternini et al., 2008). São pelo menos 14 diferentes tipos de células deste aparelho que produzem grande variedade de hormônios ou peptídeos reguladores com distribuição regional específica (Rindi et al., 2004).

Estas células atuam no controle da secreção, absorção, motilidade e proliferação das células do aparelho digestório (Rindi et al., 2004; Drucker, 2007) e apresentam imunorreatividade à serotonina, somatostatina, colecistoquinina, gastrina, secretina, glucagon, motilina, histamina, peptídeos inibitórios gástricos (Krause et al., 1989) e insulina (Freitas-Ribeiro et al., 2011;2012; Basile et al., 2012) dentre outros hormônios.

As células endócrinas podem ser classificadas de acordo com a sua morfologia (Fujita e Kobayashi, 1977; Dayal et al., 1987; Sjölund et al., 1983), pela sua capacidade de absorver determinados sais (Grimelius e Wilander, 1980), pela morfologia dos seus grânulos secretores (Polak et al., 1993) e pela presença de moléculas marcadoras específicas (Rindi et al., 2004; Schonhoff et al., 2004). Morfologicamente, as células endócrinas são consideradas do tipo aberto quando o ápice alcança a superfície luminal, e do tipo fechado, quando se apresentam sem comunicação com o lúmen (Fujita e Kobayashi, 1977).

Quanto à capacidade de absorver e reduzir sais de prata, as células endócrinas são classificadas em argirófilas e argentafins. Na reação argentafim (Barbosa et al., 1984), a redução do nitrato de prata amoniacal é decorrente da capacidade redutora dos próprios componentes intracelulares. Na reação argirófila (Grimelius e Wilander, 1980), os sais de prata em solução amoniacal ligam-se aos grânulos citoplasmáticos e são, então, reduzidos à prata metálica pela exposição de uma substância redutora exógena.

Segundo estudos de Grimelius e Wilander (1980) e Polak et al. (1993), a técnica de Grimelius cora quase todas as células endócrinas do aparelho digestório, exceto as células imunorreativas à insulina, colecistocinina e somatostatina, enquanto o método de Masson-Fontana cora somente as células enterocromafins do tipo I (serotonina e substância P) e do tipo II (serotonina e motilina).

Imunorreatividade à insulina têm sido localizadas em diversas regiões extrapancreáticas, como na próstata (Stahler et al., 1988), no néfron (Coutinho et al., 1985), no sistema nervoso central (Devaskar et al., 2002), na retina (Meimaridis et al., 2003) na glândula submandibular (Égéa et al., 2000) e intestinos (Coutinho et al., 1984; Bendayan e Park, 1991; Kendzierski et al., 2000; Freitas-Ribeiro et al., 2011; 2012; Basile et al., 2012). Kendzierski et al. (2000) sugeriram que a insulina intestinal possui funções parácrina ou autócrina de grande importância no controle da divisão celular, na secreção de outros peptídeos, na motilidade e absorção intestinal. Entretanto, são necessárias mais pesquisas que confirmem a presença dessas células especialmente no intestino grosso em marsupiais didelfídeos.

Em função da importância das células endócrinas, esta pesquisa teve como objetivos caracterizar a morfologia, identificar e quantificar as células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina do intestino grosso, nas regiões do ceco, cólons (ascendente, transverso e descendente) e reto de gambás *D. aurita*.

Especificamente, pretendeu-se:

- a) Descrever as características anatômicas, histológicas, histoquímica e imunohistoquímica de todas as regiões do intestino grosso;
- b) Quantificar as células mucossecretoras PAS e AB positivas presentes na túnica mucosa;

- c) Verificar variações morfométricas das camadas mucosa, submucosa e muscular entre as porções proximal, média e distal de cada região;
- d) Identificar e quantificar as células enteroendócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina ao longo de todas as porções e regiões.
- e) Verificar detalhes da estrutura superficial e tridimensional do intestino grosso através da microscopia eletrônica de varredura;
- f) Caracterizar a ultraestrutura das células endócrinas imunorreativas à insulina e em especial, a morfologia de seus grânulos de secreção.

## REFERÊNCIAS

Aprígio-Assis, A.P., 2011. Estudo de padrões de distribuição da diversidade genética e morfológica em *Didelphis aurita* (Didelphidae, Didelphimorphia): investigando a biogeografia da Floresta Atlântica. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Evolutiva. 185p.

Astúa de Moraes, D., Santori, R.T., Finotti, R., Cerqueira, R., 2003. Nutritional and fibre contents of laboratory established diets of neotropical opossums. In: Jones, M., Dickman, C., Archers, M. (Eds). *Predators with pouches: The biology of carnivorous marsupials*. CSIRO Publishing, Australia, p. 229-237.

Barbosa, A.J.A., Castro, L.P.F., Nogueira, A.M.F., 1984. A simple and economical modification of the Masson-Fontana method for staining melanin granules and enterochromaffin cells. *Stain Technol.* 59, 193-196.

Barbosa, A.J.A., Nogueira, J.C., Fonseca, C.C., 2006. Células endócrinas (APUD) do sistema digestivo do gambá *Didelphis albiventris*. In: Cáceres, N.C.,

Monteiro-Filho, E.L.A (Eds). Os marsupiais do Brasil: biologia, ecologia e evolução. Campo Grande: Ed. UFMS, p.89-98.

Barbosa, A.J.A., Nogueira, J.C., Penna, F.J., Polak, J.M., 1987. Distribution of enteroglucagon - and polypeptide YY - immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the white-belly opossum (*Didelphis albiventris*).Histochemistry. 88, 37-40.

Basile, D.R.S., Novaes, R.D., Marques, D.C.S., Fialho, M.C.Q., Neves, C.A., Fonseca, C.C., 2012. Analysis of the morphology and distribution of argentaffin, argyrophil and insulin-immunoreactive endocrine cells in the small intestine of the adult opossum *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826).Tissue & Cell. 44, 301-307.

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

Cáceres N.C., Monteiro-Filho, E.L.A., 2001. Food habits, home range and activity of *Didelphis aurita*(Mammalia, Marsupialia) in southern Brazil. Stud. Neotrop. Fauna Environ. 36, 85-92.

Cáceres, N.C., 2003. Use of the space by the opossum *Didelphis aurita*Wied-Neuwied (Mammalia, Marsupialia) in a mixed forest fragment of southern Brazil.Rev. Bras. Zool. 20, 315-322.

Cáceres, N.C., Dittrich, V.A.O., Monteiro-Filho, E.L.A., 1999. Fruit consumption, distance of seed dispersal and germination of solanaceous plants ingested by the common opossum (*Didelphis aurita*) in southern Brazil.Revue d'Ecologie Terre et Vie. 54, 225-234.

Cáceres, N.C., Monteiro-Filho, E.L.A., 1998. Population dynamics of the common opossum, *Didelphis marsupialis* (Mammalia, Marsupialia), in southern Brazil. *Mamm. Biol.* 63, 169-172.

Carvalho, F.M.V., Fernandez, F.A.S., Nessimian, J.L., 2005. Food habits of sympatric opossums coexisting in small forest fragments in Brazil. *Mammal. Biol.* 70, 366-375.

Casella, J., 2011. Diet of *Didelphis aurita* and *Micoureus paraguayanus* and the fruit availability in a semideciduous Atlantic forest in Southern Brazil. *Neotrop. Biol. Conserv.* 6, 85-93.

Cerqueira, R., Lemos, B., 2000. Morphometric differentiation between neotropical black-eared opossums, *Didelphis marsupialis* and *D. aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). *Mammalia*. 64, 319-327.

Cerqueira, R., Tribe, C.J., 2008. Genus *Didelphis* Linnaeus, 1758. In: Gardner, A.L. (ed.) *Mammals of South America. Vol. 1. Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*. Chicago: Chicago University Press. p. 17-25.

Coutinho, H.B., Sewel, H.F., Coutinho, V.B., 1985. Immunocytochemical demonstration of insulin in the mesonephros and metanephros of the Brazilian opossum *Didelphis albiventris*. *Ann. Anat.* 159, 97-103.

Coutinho, H.B., Sewell, H.F.; Smith, D.I., Coutinho, V.B., Pinheiro, P.B., 1984. Demonstration of insulin in the pancreas of the *Didelphis albiventris* (opossum) by immunocytochemical techniques. *Ann. Anz.* 157: 167-175.

Cunha, A.A., Vieira, M.V., 2005. Age, season, and vertical use of the Atlantic rainforest by the common opossum, *Didelphis aurita* - Wied, 1826. *Acta Theriol.* 50, 551-560.

Dayal, Y., Delellis, R.A., Wolf, H.J., 1987. Hiperplastic lesion of the gastrointestinal endocrine cells. *Am. J. Surg. Pathol.* 1, 87-101.

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

Drucker, D.J., 2007. The role of gut hormones on glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 1, 24-32.

Égéa, J.-C., Hirtz, C., Gross, R., Lajoix, A.-D., Traskawka, E., Ribes, G., Deville de Périère, D., 2000. Preproinsulin I and II mRNA expression in adult rat submandibular glands. *Eur. J. Oral Sci.* 108, 292-296.

Fonseca, C.C., Nogueira, J.C., Barbosa, A.J.A., 2002a. Argyrophilic and glucagon-immunoreactive cells in the ileum and colon of the developing opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). *Cells Tissues Organs.* 170, 20-33.

Fonseca, C.C., Nogueira, J.C., Barbosa, A.J.A., 2002b. Diâmetro das ilhotas pancreáticas do gambá *Didelphis albiventris* em desenvolvimento intramarsupial. *Arch. Vet. Sci.* 7, 129-134.

Freitas-Ribeiro, G.M., Fonseca, C.C., Sartori, S.S., Matta, S.L.P., Neves, C.A., 2011. Quantification of argyrophilic, argentaffin and insulin immunoreactive cells in the small intestine in the opossum *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). *Acta Sci. Biol. Sci.* 33, 479-485.

Freitas-Ribeiro, G.M., Fonseca, C.C., Sartori, S.S.R., Loures-Ribeiro, A., Neves, C.A., 2012. Endocrine cells and nerve ganglia of the small intestine of the Opossum *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Mammalia: Didelphidae). *An. Acad. Bras. Ciênc.* 84, 747-757.

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

Gardner, A.L., 2008. Mammals of South America, Vol. 1: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats. The University of Chicago Press.669p.

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

Kajin, M., Cerqueira, R., Vieira, M.V., Gentile, R., 2008.Nine-year demography of the black-eared opossum *Didelphis aurita* (Didelphimorphia: Didelphidae) using life tables. Rev. Bras. Zool. 25, 206-213.

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

Krause, W.J., Cutts, J.H. 3rd, Cutts, J.H., Yamada J., 1989. Immunohistochemical study of the developing endocrine pancreas of the opossum (*Didelphis virginiana*).Acta Anat. 135, 84-96.

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

Lessa, L.G., Geise, L., 2010. Hábitos alimentares de marsupiais didelfídeos brasileiros: análise do estado do conhecimento atual. Oecol.Aust. 14, 910-910.

Loretto, D., Vieira, M.V., 2005. The effects of reproductive and climatic seasons on movements in the black-eared opossum (*Didelphis aurita*Wied-Neuwied, 1826).J. Mammal. 86, 287-293.

MacAlester, A.L., 1994. História Geológica da vida. São Paulo: E. Blucher. 173p.

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

Patton, J.L., Costa, L.P., 2003. Molecular phylogeography and species limits in rainforest didelphid marsupials of South America. In: Jones, M., Dickman, C., Archer, M., (Eds). *Predators with pouches: the biology of carnivorous marsupials.* Melbourne: CSIRO Press. p. 63-81.

Polak, J.M., Bishop, A.E., Barbosa, A.J.A., Bloom, S.R., 1993. Hormônios gastrointestinais. In: Dani, R., Castro, L.P (Eds). *Gastroenterologia Clínica.* Rio de Janeiro: Ed. Guanabara-Koogan. p. 1446-1465.

Rehfeld, J.F., 1998. The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiol. Rev.* 78, 1087-1102.

Rindi, G., Leiter, A.B., Kopin, A.S., Bordi, C., Solcia, E., 2004. The “normal” endocrine cells of the gut changing concepts and new evidences. *An. NY Acad. Sci.* 1014, 1-12.

Rossi, R.V., Bianconi, G.V., 2011. Ordem Didelphimorphia. In: Reis, N.R., Peracchi, A.L., Pedro, W.A., Lima, I.P. *Mamíferos do Brasil.* Londrina: Nelio R. dos Reis, 2 ed. 439p.

Rossi, R.V., Voss, R.S., Lunde, D.P., 2010. A revision of the didelphid marsupial genus *Marmosa*. Part 1. The species in Tate's 'mexicana' and 'mitis' sections and other closely related forms. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 334, 1-83.

Samoto, V.Y., Miglino, M.A., Ambrosio, C.E., Pereira, F.T.V., Lima, M.C., Carvalho, A.F., 2006. Opossum (*Didelphis sp*) mammary gland morphology associated to the marsupial model. *Biota Neotrop.* v.6, n. 2.

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

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

Schonhoff, S.E., Giel-Moloney, M., Leiter, A.B., 2004. Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology.* 145, 2639-2644.

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

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

Stallings, J.R., 1989. Small mammal inventories in an eastern Brazilian park. *Bull. Fla. Mus. Nat. Hist. Biol Sci.* 34, 153-200.

Sternini, C., Anselmi, L., Rozengurt, E., 2008. Enteroendocrine cells: a site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 15, 73-78.

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

Voss, R.S., Jansa, S.A., 2009. Phylogenetic relationships and classification of Didelphid marsupials, an extant radiation of new world metatherian mammals. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 322, 1-177.

## ARTIGO 1

### **Morphologic characterization and distribution of argyrophil, argentaffin, and insulin-immunoreactive endocrine cells in the large intestine of the opossum *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826)**

#### **Abstract**

This study was designed to investigate the morphology and distribution of argyrophil, argentaffin, and insulin-immunoreactive endocrine cells in the large intestine of the opossum *Didelphis aurita*. Fragments of the large intestine of 10 male specimens of the opossum *D. aurita* were collected, processed, and submitted for histochemistry, immunohistochemistry, and scanning electron microscopy. The tunics of the large intestine of *D. aurita* presented morphological characteristics that have already been described for eutherian mammals. The morphometric data showed that the inner circular layer of all portions and regions analyzed is thicker relative to the longitudinal layer, and these layers in the rectum are thicker compared to the cecum and ascending colon. The majority of mucus-secreting cells have acid and neutral mucins, suggesting that the production of mucus is mixed. The number of these cells increases in the region of the cecum toward the rectum. Important findings include the occurrence of argyrophil, argentaffin, and insulin-immunoreactive endocrine cells in all regions of the large intestine of the opossum (*D. aurita*). To the best of our knowledge, this is the first report about the presence of insulin-immunoreactive endocrine cells in the large intestine of the opossum (*D. aurita*).

**Keywords:** insulin-immunoreactive endocrine cells; argyrophil and argentaffin endocrine cells; opossum; histochemistry; immunohistochemistry; scanning electron microscopy.

## Introduction

The gastrointestinal tract plays a crucial role in the control of intake and absorption of nutrients, and its endocrine cells have an important regulatory mechanism, synthesizing hormones, activating and inhibiting neural circuits (Drucker, 2007). These cells constitute approximately 1% of the total intestinal epithelium and represent the largest population of hormone-producing cells in the body (Rehfeld, 1998). These cells show immunoreactivity for somatostatin, serotonin, cholecystokinin, gastrin, secretin, glucagon, motilin, histamine, gastric inhibitory peptide (Krause et al., 1989; Yaman et al., 2012), and insulin (Freitas-Ribeiro et al., 2011; 2012; Basile et al., 2012), among others.

The presence of insulin immunoreactivity have been identified in extrapancreatic regions such as the prostate (Stahler et al., 1988), nephron (Coutinho, 1985), central nervous system (Devaskar et al., 2002), retina (Meimaridis et al., 2003), and intestine (Coutinho et al., 1984; Bendayan and Park, 1991; Kendzierski et al., 2000; Freitas-Ribeiro et al., 2011; 2012; Basile et al., 2012). However, there are no studies in the literature related to insulin-immunoreactive endocrine cells in the large intestine of marsupials, highlighting the necessity and importance of this research.

According to Rodrigues (2005), morphological studies of the digestive tract are important as additional tools for studying physiological and pathological aspects of these organs. Particularly, it is important to perform studies involving endocrine cells since the control of motor and secretory events involved in digestion and absorption depend on the action of the endocrine system. Moreover, these cells have an essential role in the control of food intake and in the repair and immunity of intestinal mucosae. They are also related to severe gastrointestinal disorders, especially irritable bowel syndrome postinfection, enteric infections, inflammatory bowel diseases (Moran et al., 2008), and neoplasia (Polak et al., 1993).

Therefore, further studies are needed regarding the endocrine cells to explore the therapeutic potential in diseases of the large intestine. Thus, how the

digestive system works with didelphids is important because they promotes a histomorphometric database and provides better understanding of the digestive processes of wild mammals.

The marsupials of the genus *Didelphis* show special features that put them in evidence for research, among which the following are highlighted their ancestral origin, considered as morphologically primitive mammals, representing a link in the transition between *Prototheria* and *Eutheria* (MacAlester, 1994), their short gestation period (Samoto et al., 2006) since most of the fetal and embryonic development occurs outside the uterus, facilitating access to the various organs. However, immunohistochemical studies on endocrine cells of marsupials are more focused on the pancreas, stomach, and small intestine (Krause et al., 1985; Barbosa et al., 1987; Krause et al., 1989; Takagi et al., 1990; Fonseca et al., 2002; Barbosa et al., 2006; Freitas-Ribeiro et al., 2011; 2012; Basile et al., 2012), with no work on the presence of these cells in the large intestine of *D. aurita*.

In this context, this study was designed to investigate the morphology and distribution of argyrophil, argentaffin, and insulin-immunoreactive endocrine cells in the large intestine of the opossum *D. aurita*.

## **Material and methods**

### **Animals and ethical aspects**

Ten male specimens of the opossum *D. aurita* weighing  $1.03 \pm 0.19$  kg, crown-rump and snout-rump corporal lengths of  $32.70 \pm 3.59$  and  $46.05 \pm 12.50$  cm, perimeter and thoracic height of  $22.70 \pm 1.57$  and  $11.35 \pm 0.78$  cm, respectively, were used in this study. The animals were considered adults by having complete dentition (Macedo et al., 2006). Catches were authorized by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA, license 23204-1) in a small Atlantic forest area in the state of Minas Gerais, Brazil (S 20°45'14", W 42°52'55"). The study was approved by the

Institutional Ethics Committee for Animal Research (approval protocol 11/2010). Hooklike traps with dimensions of 75 × 31 × 31 cm were used with bananas and eggs as bait. After capture, the animals were kept in captivity for a period of 24 hours, receiving water and food used in the capture, a diet similar to their natural feed (Carvalho et al., 2005). The animals were anesthetized with sodium thiopental, 30 mg/mL, using an intraperitoneal dose of 60 mg/kg. Euthanasia of the animals was performed under anesthesia through intracardiac administration of 0.25% potassium chloride, depending on the body weight.

### **Biometry and histological processing**

After exposure of the abdominal cavity, the intestine was removed and placed in a flume, moistened with saline, allowing their measurement by caliper with no distention of the organ. The intestinal regions, cecum, colon (ascending, transverse, and descending), and rectum were identified by flexures and intestinally delimited by lashing. Three fragments were collected (proximal, middle, and distal) in each region, for a total of 15 fragments for each animal. The sections were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours, dehydrated in ethanol, cleared in xylene, embedded in paraffin, and sectioned at 5 µm thick at intervals of 50 µm in a rotary microtome (Leica Multicut 2045, Reichert-Jung Products, Germany).

### **Histochemistry, immunohistochemistry and histomorphometry**

The histological sections used in the histological description and morphometric analysis were stained with hematoxylin and eosin (Bancroft and Stevens, 1996). Alcian blue, pH 2.5 (AB) (Bancroft and Stevens, 1996), and periodic acid-Schiff (PAS) methods (McManus, 1948) were used to detect acidic and neutral mucins, respectively. Acridine orange stains were used to detect mast cells (Kawasaki et al., 1991) and pathogenic organisms. Grimelius (Grimelius and Wilander, 1980) and modified Masson-Fontana (Barbosa et al.,

1984) methods were applied for marking argyrophil and argentaffin enteroendocrine cells, respectively. Indirect immunoperoxidase (Sternberger, 1979) was used to detect insulin-immunoreactive endocrine cells, using positive and negative control sections of the pancreas from the opossum processed under the same conditions. The monoclonal antibodies used in the immunohistochemistry technique were purchased from Bethyl Laboratories (lot no. A90-117p-4). Photographic documentation of the preparations was performed under a CX31 light microscope (Olympus, Tokyo, Japan) with a SC020 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan).

The morphometrical analysis of the intestinal tunics was made using the image analysis software Image-Pro Plus 3.5 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, Maryland, USA). Ten random measurements were made from each one of three portions (proximal, middle, and distal) of each intestinal region (cecum; ascending, transverse, and descending colons; and rectum). We measured the height and thickness of 30 absorptive and mucin-secreting cells from each intestinal region. Cells secreting acidic or neutral mucins were quantified in 10 random fields of  $78.500 \mu\text{m}^2$  using the same image analysis software. The results were converted to cells per  $\text{mm}^2$ .

### **Scanning electron microscopy**

For scanning electron microscopy, fragments of the middle portion of the cecum, colon (ascending, transverse, and descending), and rectum of five animals were fixed in buffered formalin at 10% for 24 hours. The fragments were dehydrated in ethanol, submitted to critical point drying (CPD030, Bal-Tec, Witten, North Rhine-Westphalia, Germany), metallized with gold, mounted on stubs, and examined in a scanning electron microscope (Leo 1430VP, Carl Zeiss, Jena, Thuringia, Germany).

## Statistical analysis

The results were represented as mean and standard deviation (mean  $\pm$  SD). The normality of data distribution was verified using the Shapiro-Wilk test. Considering the result of this test, the Kruskal-Wallis and Dunn's test was used for multiple comparisons. Results were considered significant when  $p < 0.05$ . All the tests were performed using the GraphPad Prism 5.0 statistical software program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA).

## Results

### Anatomy

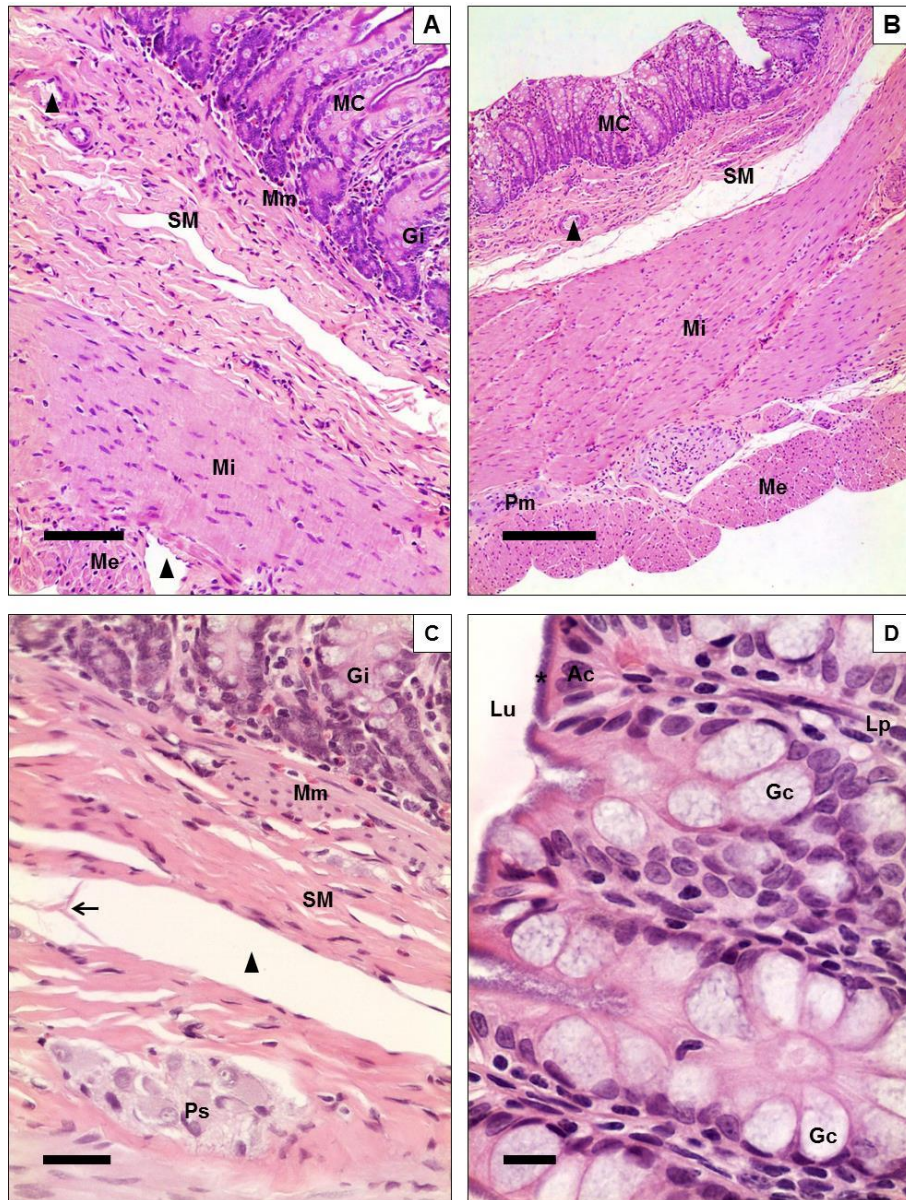
The large intestine of *D. aurita*, morphologically characterized as a tubular organ and calibrous, has three distinct regions: the cecum, colon (ascending, transverse, and descending), and rectum. The cecum is more dilated and presents a blind end, with a length and diameter of  $6.57 \pm 0.62$  and  $2.43 \pm 0.26$  cm, respectively. The colon and their respective regions are enlarged and convoluted regions of the large intestine, measuring  $16.02 \pm 0.45$  cm in length and  $1.70 \pm 0.31$  cm in diameter. The ascending colon follows the cecum toward the cranial region, and near the liver is shown curved and continues as the transverse colon. The transverse colon is a very mobile region and extends from the right colic flexure to the left colic flexure, where it initiates the descending colon. The descending colon as well as the ascending colon is fixed to the posterior wall of the abdomen, ending after a relatively vertical trajectory, being continuous with the rectum. The rectum is a short region, rectilinear, and continuous with the anal canal. The rectal length and diameter were  $3.66 \pm 0.48$  and  $1.57 \pm 0.16$  cm, respectively.

## General histology and histomorphometry

Histologically, the large intestine of *D. aurita* is characterized by the absence of villi, presence of elongated intestinal glands that open on the luminal surface, goblet cells and absorptive cells present throughout the intestinal epithelium, diffuse lymphoid nodules, blood vessels, and nerve ganglia in the tunica submucosa (submucosal plexus) and between muscle layers (myenteric plexus) (Figure 1).

The wall of the large intestine consists of the tunics mucosa, submucosa, muscular (inner circular and outer longitudinal), and serosa. The mucosa is composed of simple prismatic epithelium, lamina propria of connective tissue and muscularis mucosae constituted by smooth muscle cells. It shows fold small irregularly distributed in all regions of the gut. It contains numerous intestinal glands or crypt of Lieberkühn, which are tubular and straight, oriented perpendicular to the axis of the intestine, and extend from the surface to the muscularis mucosae (Figure 1).

The glandular epithelium is simple prismatic, composed mainly of goblet cells and absorptive cells (Figures 1 and 3) and, in lesser amounts, argyrophil, argentaffin endocrine, insulin-immunoreactive cells (Figures 4 and 5), and undifferentiated cells located at the base of the glands, which perform epithelial renewal.



**Figure 1.** Large intestine of the opossum *D. aurita*. A and B) Mucosa, submucosa, muscular (inner circular and outer longitudinal) tunics of the large intestine. Middle descending colon. C) Details of the tunica submucosa. Distal transverse colon. D) Details of the tunica mucosa. Proximal rectum. MC= mucosa; Mm= muscularis mucosae; SM= submucosa; Mi= inner circular layer; Me= outer longitudinal layer; Ig= intestinal gland; Lp= lamina propria; Ps= submucosal plexus; Pm= myenteric plexus; Arrowheads= blood vessel; Arrows= venous valve; Ac= absorptive cells; Gc= Goblet cell; Lu= lumen; asterisk= brush border. Hematoxylin-eosin. Bar: A and B= 100  $\mu$ m; C and D= 40  $\mu$ m.

The lamina propria of the intestinal mucosais composed of loose connective vascularized tissue that involves every intestinal gland (Figure 3D) besides having numerous defense cells (Figure 2).

The muscularis mucosae are poorly developed in some regions and, in other regions, have two layers of smooth muscle fibers, a circular and a longitudinal (Figure 1).

The tunica submucosa is thick and composed of dense irregular connective tissue, abundant blood and lymph vessels, and nerve ganglia, which are components of the submucosal plexus (Meissner)(Figure 1), besides lymphoid nodules. The submucosal plexus nerve ganglion was generally smaller and more dispersed than the myenteric plexus.

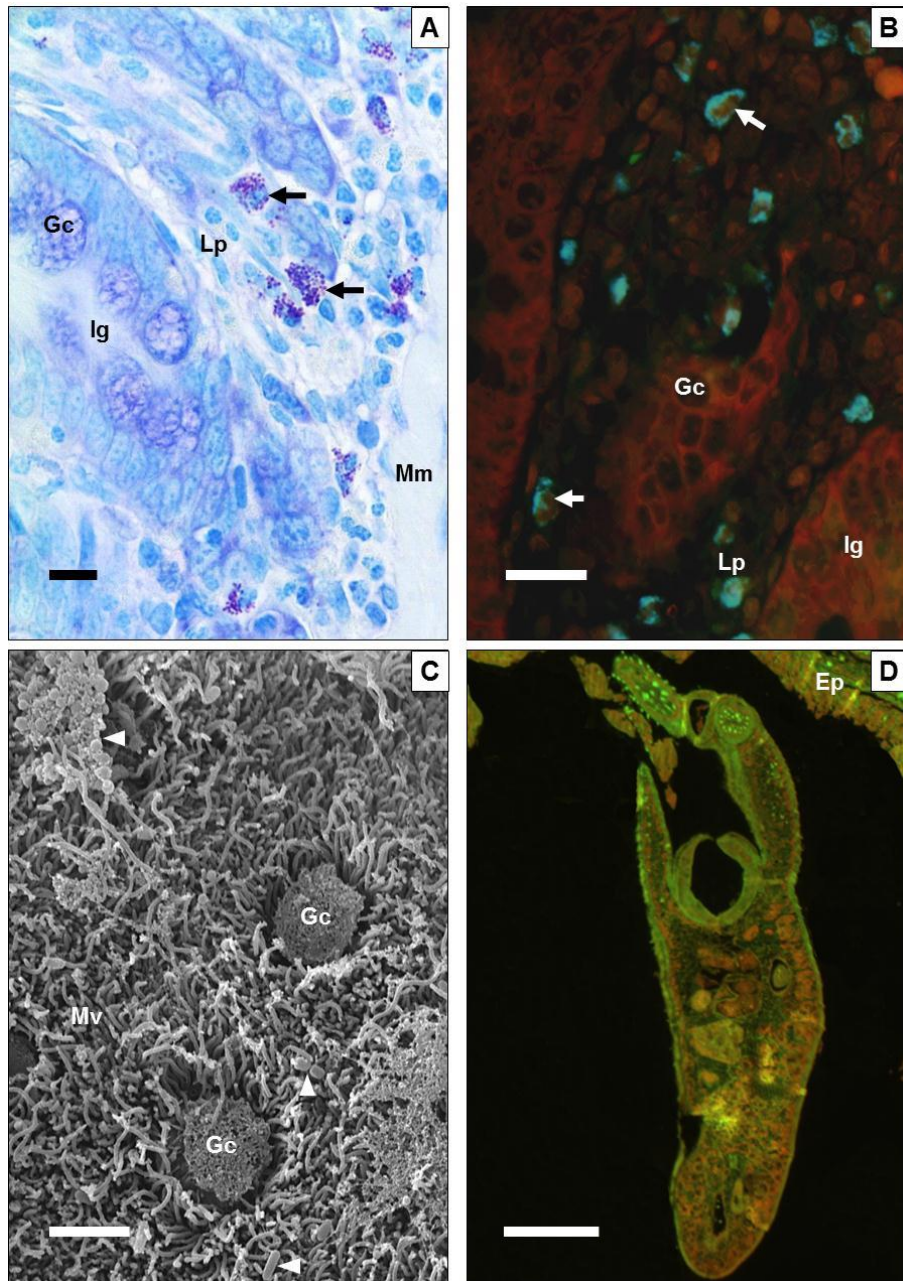
The tunica muscularis is composed of two layers of smooth muscle, inner circular and outer longitudinal, with thicknesses that vary according to the region (Figure 1). The myenteric plexus (Auerbach) is situated between the two layers of muscle and shows evident nerve ganglia with large cell bodies of neurons (Figure 1). The tunica serosa presents a simple squamous epithelium called the mesothelium, associated with loose connective tissue (Figure 3E).

The thickness of the tunics of cecum and ascending, transverse, and descending colon in the proximal, middle, and distal portion showed no difference ( $P>0,05$ ). The epithelium/lamina propria of the mucosa and submucosa tunica in the proximal portion of the rectum were thicker ( $P<0,05$ ), and the middle and distal portions showed no difference between them ( $P>0,05$ ). The muscularis mucosae and muscularis, circular and longitudinal layers, showed no difference between the portions analyzed ( $P>0,05$ ) (Table 2).

The inner circular layer of all portions and regions analyzed showed increased thickness relative to the longitudinal layer. Among the regions examined, the muscle layers, circular and longitudinal, of the rectum were thicker compared with the cecum and ascending colon ( $P>0,05$ ), while the mucosa and submucosa showed no difference ( $P<0,05$ ) (Table 3).

In the lumen of the cecum and colon, especially the ascending colon, were commonly observed nematodes adherent to the tunica mucosa in some

specimens. Different species of bacteria on the surface of the intestinal wall, which are possibly part of normal intestinal microbiota, were also observed throughout the regions analyzed; however, in high amounts, they can become potentially pathogenic. These animals were observed in the lamina propria of the mucosa and submucosa tunic, mast cells apparently in increased amounts with the cytoplasm full of metachromatic granules (Figure 2).



**Figure 2.** Large intestine of the opossum *D. aurita*. A and B) Mast cells in the lamina propria. Middle colon ascending. C) Bacteria in surface of the large intestine wall. D) Nematode attached to intestinal wall. MC= mucosa; Mm= muscularis mucosae; Ig= intestinal gland; Ep= epithelium, Lp= lamina propria; Arrowheads= Bacteria; Arrows= mast cell; Gc= Goblet cell; A= Toluidine Blue; B and D= Acridine Orange - Fluorescence microscopy; C= Scanning electron microscopy. Bar: A= 15  $\mu$ m; B= 20  $\mu$ m; C= 3  $\mu$ m and D= 40  $\mu$ m.

**Table 1.** Thickness ( $\mu\text{m}$ ) of the intestinal tunics at the regions and portions of the large intestine of the opossum *D. aurita*.

Region	Portion	tunic				
		Mucosa		Submucosa	Muscularis	
		Ep/Lp	Mm		Mi	Me
Cecum	Proximal	264.60 $\pm$ 68.94 <sup>a</sup>	27.86 $\pm$ 5.97 <sup>a</sup>	315.23 $\pm$ 133.26 <sup>a</sup>	192.41 $\pm$ 69.39 <sup>a</sup>	99.21 $\pm$ 38.44 <sup>a</sup>
	Middle	298.56 $\pm$ 51.52 <sup>a</sup>	39.32 $\pm$ 12.41 <sup>a</sup>	343.86 $\pm$ 76.18 <sup>a</sup>	179.44 $\pm$ 39.34 <sup>a</sup>	86.90 $\pm$ 25.37 <sup>a</sup>
	Distal	307.32 $\pm$ 49.89 <sup>a</sup>	36.81 $\pm$ 9.70 <sup>a</sup>	295.15 $\pm$ 26.63 <sup>a</sup>	229.81 $\pm$ 39.54 <sup>a</sup>	106.34 $\pm$ 32.89 <sup>a</sup>
Ascending colon	Proximal	281.17 $\pm$ 42.40 <sup>a</sup>	35.21 $\pm$ 14.57 <sup>a</sup>	358.64 $\pm$ 101.56 <sup>a</sup>	267.03 $\pm$ 47.88 <sup>a</sup>	115.07 $\pm$ 30.19 <sup>a</sup>
	Middle	299.65 $\pm$ 30.06 <sup>a</sup>	34.65 $\pm$ 7.87 <sup>a</sup>	343.72 $\pm$ 130.57 <sup>a</sup>	261.19 $\pm$ 63.81 <sup>a</sup>	99.57 $\pm$ 44.64 <sup>a</sup>
	Distal	300.71 $\pm$ 63.80 <sup>a</sup>	39.60 $\pm$ 8.45 <sup>a</sup>	391.49 $\pm$ 64.46 <sup>a</sup>	304.30 $\pm$ 56.89 <sup>a</sup>	138.09 $\pm$ 40.43 <sup>a</sup>
Transverse colon	Proximal	276.97 $\pm$ 65.71 <sup>a</sup>	38.11 $\pm$ 8.64 <sup>a</sup>	294.79 $\pm$ 79.62 <sup>a</sup>	313.50 $\pm$ 86.22 <sup>a</sup>	139.96 $\pm$ 35.42 <sup>a</sup>
	Middle	279.00 $\pm$ 70.29 <sup>a</sup>	38.92 $\pm$ 7.86 <sup>a</sup>	377.19 $\pm$ 143.12 <sup>a</sup>	369.49 $\pm$ 67.17 <sup>a</sup>	174.26 $\pm$ 37.69 <sup>a</sup>
	Distal	263.72 $\pm$ 44.25 <sup>a</sup>	38.06 $\pm$ 8.11 <sup>a</sup>	332.96 $\pm$ 84.56 <sup>a</sup>	345.99 $\pm$ 108.51 <sup>a</sup>	142.51 $\pm$ 29.99 <sup>a</sup>
Descending colon	Proximal	283.46 $\pm$ 49.51 <sup>a</sup>	38.15 $\pm$ 10.86 <sup>a</sup>	366.42 $\pm$ 86.22 <sup>a</sup>	351.10 $\pm$ 53.30 <sup>a</sup>	181.30 $\pm$ 43.12 <sup>a</sup>
	Middle	275.09 $\pm$ 61.86 <sup>a</sup>	36.06 $\pm$ 14.74 <sup>a</sup>	404.73 $\pm$ 103.00 <sup>a</sup>	384.53 $\pm$ 142.17 <sup>a</sup>	156.37 $\pm$ 64.21 <sup>a</sup>
	Distal	278.51 $\pm$ 48.36 <sup>a</sup>	35.60 $\pm$ 10.06 <sup>a</sup>	357.30 $\pm$ 63.87 <sup>a</sup>	314.42 $\pm$ 63.74 <sup>a</sup>	167.63 $\pm$ 72.87 <sup>a</sup>
Rectum	Proximal	294.73 $\pm$ 40.73 <sup>a</sup>	31.60 $\pm$ 3.59 <sup>a</sup>	469.61 $\pm$ 55.40 <sup>a</sup>	475.63 $\pm$ 92.03 <sup>a</sup>	270.84 $\pm$ 37.74 <sup>a</sup>
	Middle	215.07 $\pm$ 13.68 <sup>b</sup>	30.02 $\pm$ 3.57 <sup>a</sup>	384.86 $\pm$ 19.36 <sup>b</sup>	639.51 $\pm$ 105.43 <sup>a</sup>	268.59 $\pm$ 43.19 <sup>a</sup>
	Distal	224.44 $\pm$ 70.30 <sup>ab</sup>	33.18 $\pm$ 4.55 <sup>a</sup>	384.20 $\pm$ 79.69 <sup>ab</sup>	567.96 $\pm$ 139.79 <sup>a</sup>	234.70 $\pm$ 21.13 <sup>a</sup>

Means followed by the same letter, in the column, do not differ ( $p > 0.05$ ) by the Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison tests. Ep= epithelium;Lp= lamina propria;Mm= muscularis mucosae;Mi= inner circular layer; Me= outer longitudinal layer.

**Table 2.** Thickness ( $\mu\text{m}$ ) of the tunics in the large intestine of the opossum *D. aurita*.

Region	Tunic			
	Mucosa	Submucosa	Muscularis	
			Mi	Me
Ceco	324.82 $\pm$ 40.21 <sup>a</sup>	318.08 $\pm$ 56.16 <sup>a</sup>	200.55 $\pm$ 41.63 <sup>a</sup>	97.48 $\pm$ 24.51 <sup>a</sup>
Ascending	330.33 $\pm$ 39.23 <sup>a</sup>	364.62 $\pm$ 74.83 <sup>a</sup>	277.50 $\pm$ 26.78 <sup>ab</sup>	117.57 $\pm$ 17.57 <sup>a</sup>
Colon Transverse	311.59 $\pm$ 58.65 <sup>a</sup>	334.98 $\pm$ 86.94 <sup>a</sup>	342.99 $\pm$ 64.96 <sup>bc</sup>	152.25 $\pm$ 20.59 <sup>ab</sup>
Descending	315.62 $\pm$ 41.36 <sup>a</sup>	376.15 $\pm$ 76.21 <sup>a</sup>	350.01 $\pm$ 74.91 <sup>bc</sup>	168.43 $\pm$ 47.37 <sup>ab</sup>
Rectum	276.35 $\pm$ 32.58 <sup>a</sup>	412.89 $\pm$ 36.98 <sup>a</sup>	561.03 $\pm$ 63.50 <sup>c</sup>	258.05 $\pm$ 27.23 <sup>b</sup>

Means followed by the same letter, in the column, do not differ ( $p > 0.05$ ) by the Dunn's multiple comparison tests. Mi= inner circular layer; Me= outer longitudinal layer.

## **Absorptive and mucus-secreting cells**

Mucin-secreting cells are prismatic, tall and voluminous, and they are in contact with the lamina propria, with height and thickness of  $29.10 \pm 4.38 \mu\text{m}$  and  $13.22 \pm 2.27 \mu\text{m}$ , respectively. These cells have an ovoid nucleus of basal localization and secretion granules occupying the middle portion and apical cytoplasm, which renders the apical region very expanded (Figures 3, 4, and 6).

The number of cells secreting acidic or neutral mucins in the region of the cecum was less than in the transverse colon, descending colon, and rectum. The ascending colon produced lower number of PAS cells compared to the descending colon and rectum and the lowest number for AB cells if compared to the region of the rectum (Table 3). In the combined PAS and AB technique, most of the mucus-secreting cells have acidic and neutral mucins, suggesting that the production of mucus is mixed (Figure D).

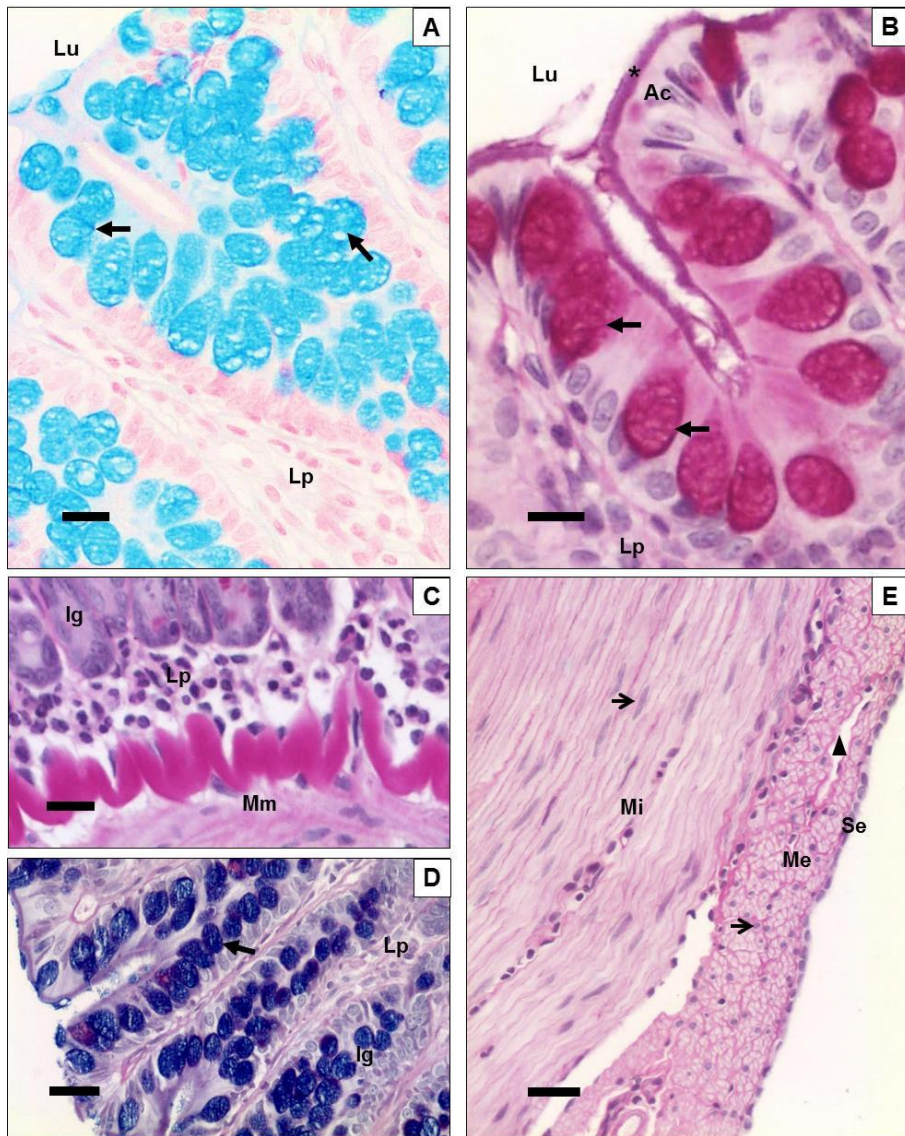
The absorptive cells are also prismatic, tall, and thin, with a height and thickness of  $25.43 \pm 3.86$  and  $5.74 \pm 1.21 \mu\text{m}$ , respectively. Its ovoid nucleus is positioned near the basal pole of the cell, showing prominent nucleoli. The apical pole has microvilli, which are observed as a whole, such as a brush border that surrounds the epithelium (Figures 1, 2, 3, and 4).

Mucin-secreting cells are visually more numerous than the absorptive cells, being found mainly directed to the glandular lumen, whereas the absorptive cells predominate in the upper portion of the epithelium.

**Table 3.**Total goblet cells PAS and AB positive for intestinal area (mm<sup>2</sup>) in the tunica mucosa of the large intestine of the opossum *D. aurita*.

	Cecum	Colon			Rectum
		Ascending	Transverse	Descending	
PAS(+)	633.23±36.68 <sup>a</sup>	1188.71±88.28 <sup>ab</sup>	1418.68±61.76 <sup>bc</sup>	1550.20±135.52 <sup>c</sup>	1613.62±133.40 <sup>c</sup>
AB(+)	886.64±58.49 <sup>a</sup>	1185.23±94.13 <sup>ab</sup>	1329.59±74.74 <sup>bc</sup>	1390.08±93.17 <sup>bc</sup>	1635.47±128.12 <sup>c</sup>

Means followed by the same letter, minuscule on the line and uppercase in the column, do not differ ( $p > 0.05$ ) by the Dunn's multiple comparison tests.

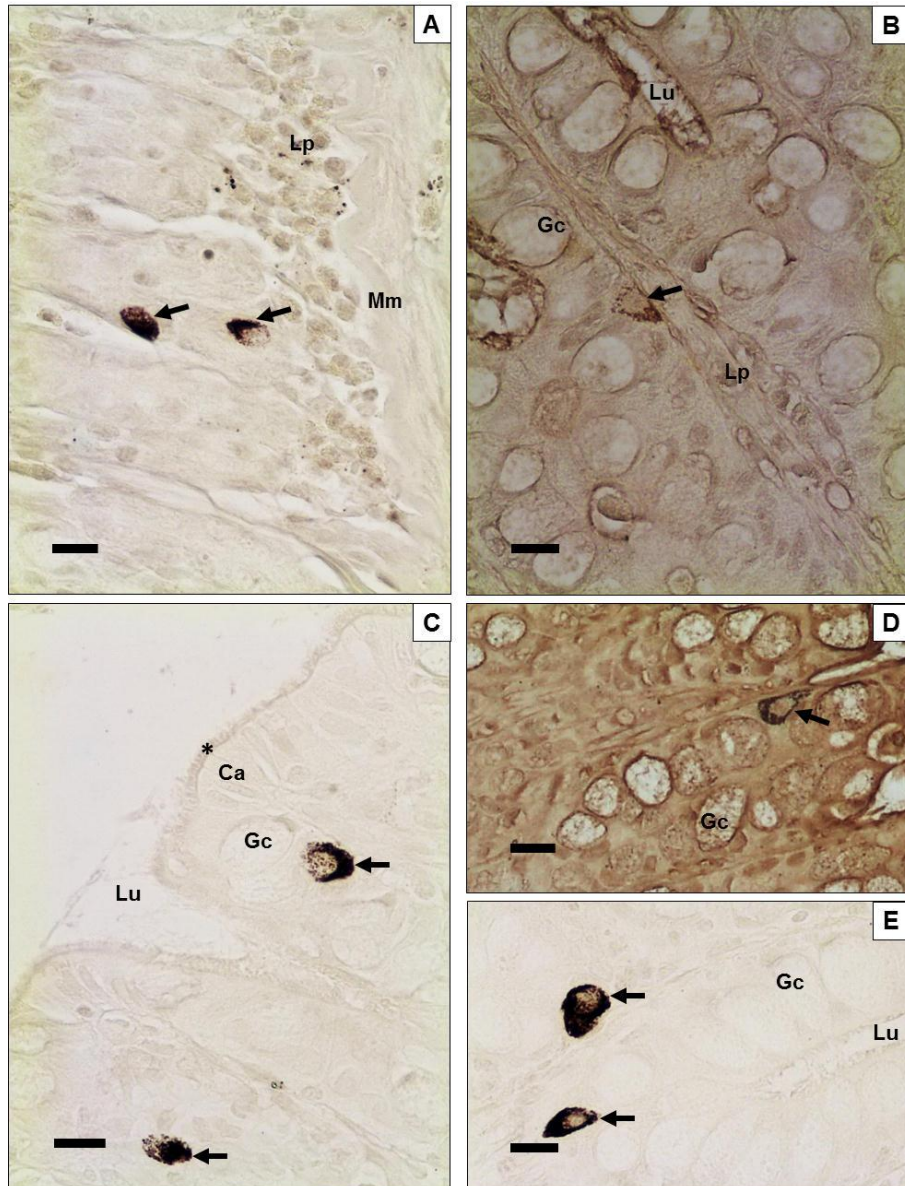


**Figure 3.** Large intestine of the opossum *D. aurita*. A) Alcian blue-positive mucus-secreting cells. Middle transverse colon. B) PAS-positive mucus-secreting cells. Proximal ascending colon. C) Details of the lamina propria. Middle ceco. D) PAS/Alcian blue-positive mucus-secreting cells. Proximal descending colon. E) Details of the muscularis and serosaturonica. Middle ascending colon. Ac= absorptive Cell; asterisk= brush border; Mm= muscularis mucosae; Ig= intestinal gland; Arrows= nucleus of smooth muscle cell; Mi= inner circular layer; Me= outer longitudinal layer; Arrowheads= blood vessel; Lp= lamina propria; Arrow filled= goblet cell. A= Alcian Blue; B, C and E= PAS; D= PAS/AB combined. Bar: A, B and C= 15; D and E= 30  $\mu$ m.

## **General enteroendocrine cells and insulin-immunoreactive cells**

The argyrophil and argentaffin endocrine cells are sparsely distributed throughout the intestinal epithelium, showing elongated shapes, pyramidal or rounded, possessing an ovoid nucleus. Some cells have apical prolongations, long and narrow, allowing contact with the lumen. The cells have a large amount of granules that concentrate on apical and basal poles of the cell and are classified as closed or open type.

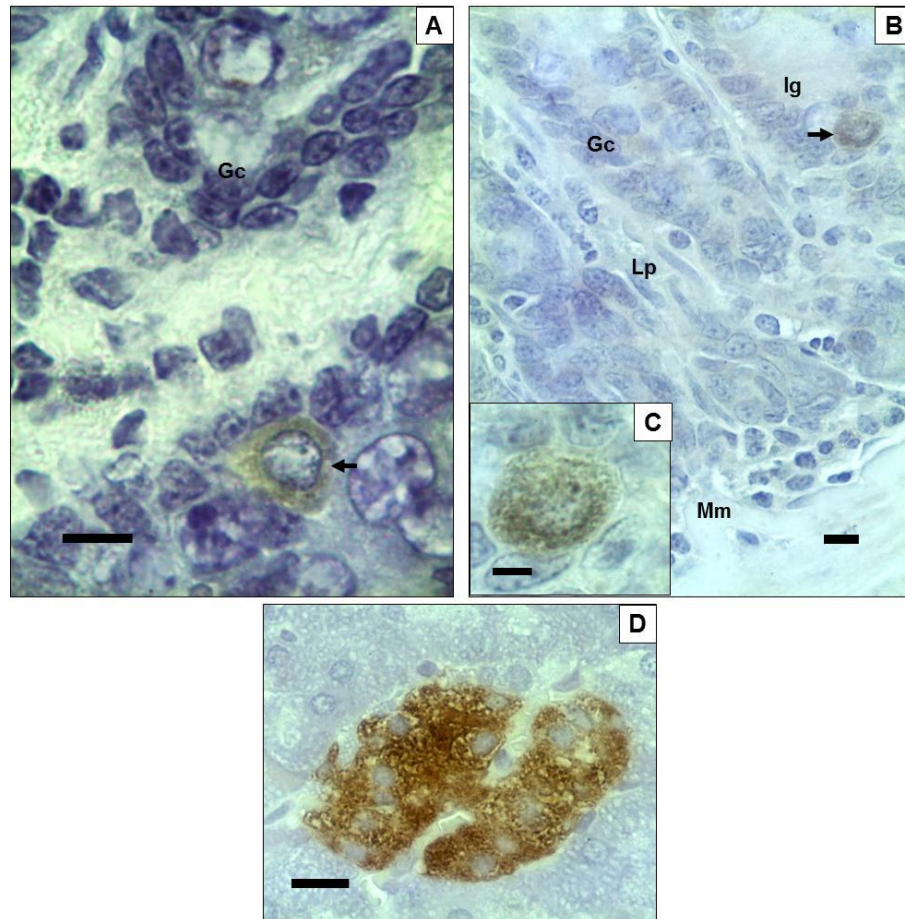
These cells are located at the basal, middle, and apical regions of the mucosa. In most cases, endocrine cells of the basal and middle regions are closed type, while cells of the open type are found in the apical portions of the intestinal gland (Figure 4).



**Figure 4.** Large intestine of the opossum *D. aurita*. A) Argentaffin endocrine cells in basal region the tunica mucosa. Distal ascending colon. B) Argyrophil endocrine cell in middle region of the tunica mucosa. Proximal rectum. C) Argentaffin endocrine cells in the apical region of the tunica mucosa. Distal ascending colon. D) Argyrophil endocrine cell "open type". Middle Descending colon. E) Argentaffin endocrine cells "closed type". Distal ascending colon. Arrow= endocrine cell; Ac= absorptive cell; Gc= goblet cell; Lu= lumen; Lp= lamina propria; Mm= muscularis mucosae; asterisk= brush border of the absorptive cells. A, C and E= Modified Fontana-Masson, B and D= Grimelius. Bar: 15  $\mu$ m.

The insulin-immunoreactive endocrine cells, such as argyrophil and argentaffin cells, are sparsely distributed throughout the intestinal epithelium. They are mainly located at the base of the intestinal glands, being classified

as the “closed” type. They have an elongated or pyramidal shape, a rounded nucleus, and a large amount of secretion granules distributed throughout the cytoplasm. These cells are located at the basal and mid regions of the mucosa (Figure 5).



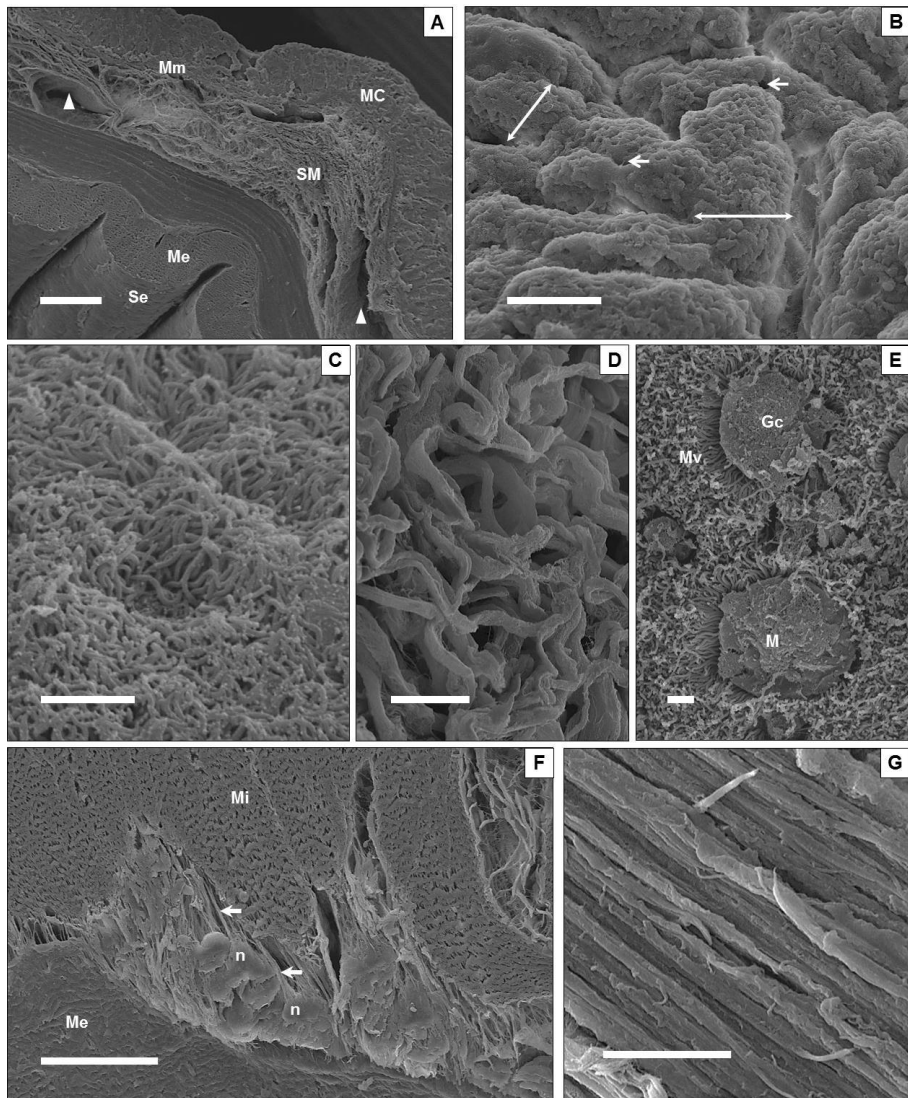
**Figure 5.** Large intestine of the opossum *D. aurita*. A and B) Insulin-immunoreactive endocrine cells C) Detail of secretory granules of insulin-immunoreactive endocrine cells. Middle Ascending colon. D)  $\beta$ -cells in pancreatic islet used as a positive control of insulin-producing cells. Indirect immunoperoxidase. Gc= goblet cell; Lp= lamina propria; Mm= muscularis mucosae; Ig= intestinal gland. Bar: A and B= 10  $\mu$ m, C= 5  $\mu$ m and D= 20  $\mu$ m.

### Scanning electron microscopy

The surface of the large intestine of *D. aurita* presents regular relief with folds of different thicknesses and opening intestinal glands or crypts of Lieberkühn. The intestinal folds are flattened, ramified, and anastomosed

invarious regions. The lining epithelium is composed of cells showing a brush border with apical microvilli and cells with a convex edge. The brush border cells are absorptive, and the convex-edge cells are represented by mucin-secreting cells. The brush border of absorptive cells form a continuous coating of microvilli on the intestinal surface, and the boundary between cells cannot be identified. Goblet cells are scattered among the absorptive cells and are rounded and of varying diameters. On the surface of goblet cells, one can observe a buildup of mucus (Figure 6).

The tunica submucosa contains sinuous collagen fibers, thick and thin, irregularly arranged and intertwined which merge and form a web. In the tunica muscularis, smooth muscle cells of the internal circular layer are fusiform with the central perinuclear portion thicker and becoming thinner as it approaches the edges. The longitudinal layer has small folds that accompany the folds of mucosa and submucosa tunica. The myenteric plexus, situated between circular and longitudinal muscle layers, presents rounded neurons and elongated nerve fibers facing the internal muscle (Figure 6).



**Figure 6.** Scanning electron microscopy of the large intestine of opossum *D. aurita*. A) Mucosa, submucosa, muscular and serosa tunics of the large intestine. Distal descending colon. B) Folds of the luminal surface. Middle Ceco. C) Microvilli of the absorptive cells. Distal ascending colon. D) Fibers of the tunica submucosa. Proximal cecum. E) Surface of the goblet cells. Proximal cecum. F) Myenteric plexus. Rectum. G) Smooth muscle fibers of the circular layer. Proximal cecum. MC= Mucosa; Mm= muscularis mucosae; SM= submucosa; Mi= Muscular inner circular; Me= outer longitudinal muscular; arrowhead= Blood vessel; Double Arrow= intestinal folds; Arrow= opening of the intestinal gland; Mv= microvilli; Gc= goblet cells; M= mucus; n= cell body of neuron; Arrow full= nerve fibers. Bars: A= 300  $\mu$ m; G and B= 30  $\mu$ m; C= 3  $\mu$ m; D= 20  $\mu$ m; E= 2  $\mu$ m; F= 100  $\mu$ m.

## Discussion

According to our research, this is the first study that discusses the presence of insulin-immunoreactive endocrine cells in all regions of the large intestine of mammals. Attempts to locate these cells were performed in the carabao (*Bubalus bubalis*) and deer (*Muntiacus muntjak*) (Baltazar et al., 1998; Adnyane et al., 2011) but without success.

The lengths of the cecum and large intestine of *D. aurita* were 6.6 and 26.5 cm, respectively, similar to those found by Cáceres (2005) in the same species, whose lengths were 7.5 and 33.6 cm, representing 4.2% and 18.6% of the total gut length, respectively. The presence of cecum in most didelphid marsupials is attributed to omnivorous diet exhibited by group (Astúa de Moraes et al., 2003; Santori et al., 2004) since the large and dilated cecum is used for storage and microbial fermentation of food residue, especially those of plant origin. Moreover, the opossum's intestine is almost equally divided between a small intestine and large intestine (Stevens and Hume, 1998), which gives more relevance to studying endocrine cells in the large intestine.

The large intestine of *D. aurita* can be considered developed and is characterized by the absence of villi, the presence of elongated intestinal glands, a large amount of absorptive and goblet cells, diffuse lymphoid nodules, blood vessels, and nervous ganglia in the tunica submucosa and between muscle layers. These characteristics were also reported by Santori et al. (2004), who correlated data with the habits of omnivorous species.

Histologically, the different regions of the large intestine of *D. aurita* have the same general structure of placental mammals, consisting of the tunics mucosa, submucosa, muscularis (inner circular and outer longitudinal muscular layers) and serous (Eurell and Frappier, 2007; Kierszenbaum and Tres, 2012). This general structure has also been described of the small intestine in this species (Ribeiro, 2009; Basile, 2011).

The mucosa consists of epithelium, lamina propria, and muscularis mucosae. The epithelium is simple prismatic with a large amount of goblet cells and absorptive cells and fewer endocrine and undifferentiated cells. These characteristics are described for mammals in general (Eurell and Frappier, 2007).

The muscularis mucosae has two layers of smooth muscle fibers, one longitudinal and one circular, in some portions of the regions, it is thin or discontinuous and arranged circularly. Contraction of this muscle region facilitates the circulation of blood and lymph after intestinal absorption (Samuelson, 2007).

We observed that, the tunica submucosa consists of dense irregular connective tissue, with fibers more compact compared to those observed in the lamina propria of the mucosa. According to Samuelson (2007), connective tissue that the tunica is well developed near their limits muscle, comprised of the muscular layer and muscularis mucosae respectively.

The submucosa also has nerve ganglia and a constituent submucosal plexus, besides participating in innervation of the muscular layer and regulating blood flow, mucus secretion, and absorption of water, Na<sup>+</sup>, and Cl<sup>-</sup> by the intestinal mucosa (Hudson et al., 2000; Hens et al., 2002).

In *D. aurita*, the circular muscle layer in all regions and portions analyzed showed greater thickness in relation to the longitudinal. In general, the tunica muscularis promotes motility for subsequently blending intake as well as for propulsion of nondigestibles and excrement toward the anus (Samuelson, 2007). The circular layer constricts and dilates the intestines, and the outer longitudinal layer shortens the intestine to contract (Eurell and Frappier, 2007). Among the regions analyzed, the circular and longitudinal layers of the rectum were thicker, indicating the need for greater control of peristalsis in this region.

Ganglia of the myenteric plexus are located between the two muscle layers, are more evident than those of the submucosal plexus, and have apparently submitted nerve ganglia with the highest number of neuron bodies, these being well developed. According to Bressan et al. (2004), the larger size of the myenteric plexus reflects its importance in the control of intestinal motility. The myenteric plexus controls the peristaltic movements of the intestine and submucosal plexus, besides participating in the innervation of muscle layer and regulating gastrointestinal secretion and blood flow (Hudson et al., 2000; Hens et al., 2002).

The tunica serosa is composed of loose connective tissue coated by mesothelium, as in the small intestine of same species (Ribeiro, 2009).

The mucin-secreting cells of *D. aurita* show themselves replete with granules containing acidic and neutral mucins. These cells play several key roles in the homeostasis of the digestive process, including lubrication, modulation of water and electrolyte absorption, and protection of the epithelium from mechanical and chemical stress (Bansil and Turner, 2006; Kim and Ho, 2010). Mucus also plays key role in the accommodation of commensal intestinal microorganisms with essential metabolic functions (Becker and Lowe, 2003). The mucus layer of the colon also provides protection against pathogenic bacteria (Robbe et al., 2004).

In the lamina propria was observed in *D. aurita* in the mucosa and submucosa tunic, mast cells apparently in increased amounts, these findings may be due to the presence of bacteria and nematodes adhered to the intestinal wall. Stone et al. (2010) confirm that there is an increase of these cells in parasitic diseases. Mast cells also play a protective role in defense against parasitic and microbial infections (Galli, 2000). These cells sense the entry of foreign matter or antigen into the lamina propria, and respond by releasing soluble mediators and cytokines that initiate a defensive inflammatory response to prevent the foreign matter from gaining access to the systemic circulation (Wallace, 1996).

The digestive tract is the largest hormone-producing organ in the body, both in terms of number of endocrine cells and number of hormones (Rehfeld, 1998). Enteroendocrine cells are related to local regulation of tissues and organs, which adapt to the secretion and motility of the digestive tract (Bishop, 1982). Through the release of peptides, these cells act in regulating the secretion, absorption, motility, and proliferation of intestinal epithelial cells (Rindi et al., 2004). These cells in the gastrointestinal tracts appear labeled different, depending on regional distribution, relative frequency, cell types within animal species (Yaman et al., 2012).

Argyrophil and argentaffin endocrine cells were observed diffusely throughout the intestinal epithelium and in the intestinal glands, distributed between the absorptive and goblet cells in all regions of the large intestine of *D. aurita*. In a study of several species of vertebrates, from frogs to mice, it was observed that according to evolution, the amount of the argyrophil and argentaffin endocrine cells in the epithelium of the large intestine increases in

both the initial and the terminal portions (Mutovkina and Ivanova, 1987). These cells have elongated, pyramidal, or rounded shapes and an ovoid nucleus, showing a great amount of granules concentrated at the poles apical and basal. These were classified as open type, where the cytoplasmic prolongations reach the luminal surface, and closed type, without continuity with the lumen. These features were also verified by Krause et al., (1986), Ribeiro-Freitas et al. (2011; 2012), Adnyane et al. (2011), Basile et al. (2012) and (Yaman et al., 2012).

Serotonin-producing cells are argentaffin, constituting the predominant population of the endocrine system of the digestive tract. Although its main secretion product is serotonin, immunoreactivity to peptides such as substance P, leucine-enkephalin, motilin and secretin have been described by Sjölund et al.(1983), Fujita and Kobayashi (1977) and Schonhoff et al. (2004). Serotonin is known to stimulate the contraction of smooth muscles of the digestive tract and cause exocrine secretion (Ceccarelli et al., 1995). Vanner (2000) asserted that serotonin stimulates neurons by promoting myenteric vasodilator responses in the submucosa.

Differently from the argentaffin reaction, the argyrophilic reaction detects large numbers of endocrine cells and this have been detected in the stomach, ileum, colon, and pancreas of the opossum *D. albiventris* (Fonseca et al., 1998; 2002); throughout the digestive tract of the capybara (*H. hydrochaeris*) (Bressan et al., 2004); and small intestine of *D. aurita* (Freitas-Ribeiro et al., 2011; 2012; Basile et al., 2012).

The insulin-immunoreactive endocrine cells, distributed throughout the intestinal epithelium, were found mainly on the bases of the glands and are classified as the closed type in *D. aurita*. They have an elongated or pyramidal shape, rounded nuclei, and a large amount of secretion granules distributed throughout the cytoplasm. Those characteristics were also observed in the small intestine in the same species (Freitas-Ribeiro et al., 2012; Basile et al., 2012).

Intestinal insulin has paracrine or autocrine functions of great importance in the control of cell division, in the secretion of peptides, and in intestinal absorption and motility (Kendzierski et al., 2000; Basile et al., 2012), unlike the endocrine function of pancreatic insulin.

In this way, the presence of argyrophil, argentaffin, and insulin-immunoreactive endocrine cells in all regions of the large intestine of *D. aurita* indicates an important contribution of these cells in the homeostasis of gastrointestinal functions.

## **Conclusion**

The tunics of the large intestine of *D. aurita* presented morphological characteristics already described for eutherian mammals. As for the morphometric data, the inner circular layer of all portions and regions analyzed showed increased thickness relative to the longitudinal layer, and these layers in the rectum were thicker compared to the cecum and ascending colon.

The majority of mucus-secreting cells have acid and neutral mucins, suggesting that the production of mucus is mixed. The number of these cells has increased in the region of the cecum toward the rectum.

Important findings include the occurrence of argyrophil, argentaffin, and insulin-immunoreactive endocrine cells in all regions of the large intestine of the opossum (*D. aurita*). To the best of our knowledge, this is the first report about the presence of insulin-immunoreactive endocrine cells in the large intestine of the opossum (*D. aurita*).

## **References**

Adnyane, I.K., Zuki, A.B., Noordin, M.M., Agungpriyono, S., 2011. Immunohistochemical study of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the barking deer, *Muntiacus muntjak*. *Anat. Histol. Embryol.* 40, 365-374.

Astúa de Moraes, D., Santori, R.T., Grelle, C.E.V., Cerqueira, R., 2003. Nutritional and fibre contents of laboratory established diets of neotropical opossums. In: Jones, M., Dickman, C., Archers, M. (Eds). *Predators with pouches: the biology of carnivorous marsupials*. Collingwood, CSIRO Publishing. 486p.

Baltazar, E.T., Kitamura, N., Hondo, E., Yamada, J., Maala, C.P., Simborio, L.T., 1998. Immunohistochemical Study of Endocrine Cells in the Gastrointestinal Tract of the Philippine Carabao (*Bubalus bubalis*). *Anat. Histol. Embryol.* 27, 407-411.

Bancroft, J.D., Stevens, A., 1996. Theory and practice of histological techniques. New York: Churchill Livingstone. 776p.

Bansil, R; Turner, B.S., 2006. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11, 164-170.

Barbosa, A.J., Castro, L.P., Margarida, A., Nogueira, M.F., 1984. A simple and economical modification of the Masson-Fontana method for staining melanin granules and enterochromaffin cells. *Stain Technol.* 59, 193-196.

Barbosa, A.J., Nogueira, J.C., Penna, F.J., Polak, J.M., 1987. Distribution of enteroglucagon- and polypeptide YY-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the white-belly opossum (*Didelphis albiventris*). *Histochemistry.* 88: 37-40.

Barbosa, A.J.A., Nogueira, J.C., Fonseca, C.C., 2006. Células endócrinas (APUD) do sistema digestivo do gambá *Didelphis albiventris*. In: Cáceres, N.C., Monteiro-Filho, E.L.A. (Org.). Os Marsupiais do Brasil: Biologia, ecologia e evolução. Campo Grande: Ed. UFMS, p.89-98.

Basile, D.R.S., 2011. Estudo morfológico, imuno-histoquímico do intestino delgado e aspectos ultraestruturais dos grânulos secretores de células imunorreativas à insulina no gambá *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826) adulto. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa. 111p.

Basile, D.R.S., Novaes, R.D., Marques, D.C.S., Fialho, M.C.Q., Neves, C.A., Fonseca, C.C., 2012. Analysis of the morphology and distribution of argentaffin, argyrophil and insulin-immunoreactive endocrine cells in the small intestine of the adult opossum *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). *Tissue & Cell*. 44: 301-307.

Becker, D.J., Lowe, J.B., 2003. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology*. 13, 41-53.

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

Bishop, A.E., Ferri, G.L., Probert, L., Bloom, S.R., Polak, J.M., 1982. Peptidergic nerves. *Scand. J. Gastroenterol*. 71, 43-59.

Bressan, M.S., Fonseca, C.C., Menin, E., Paula, T.A.R. 2004. Identificação e quantificação de gânglios nervosos, células argentafins, argirófilas e imunorreativas à serotonina no ceco de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Rev. Ceres*. 51, 729-739.

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

Carvalho, F.M.V., Fernandez, F.A.S., Nessimian, J.L., 2005. Food habits of sympatric opossums coexisting in small Atlantic Forest fragments in Brazil. *Mamm. Biol*. 70, 366-375.

Ceccarelli, P., Pedini, V., Gargiulo, A.M., 1995. The endocrine cells in the gastro-enteric tract of adult fallow deer (*Dama dama* L.). *Anat. Histol. Embryol*. 24, 171-174.

Coutinho, H.B., Sewell, H.F., Coutinho, V.B., 1985. Immunocytochemical demonstration of insulin in the mesonephros and metanephros of the Brazilian opossum *Didelphis albiventris*). *Ann. Anz.* 159: 97-103.

Coutinho, H.B., Sewell, H.F.; Smith, D.I., Coutinho, V.B., Pinheiro, P.B., 1984. Demonstration of insulin in the pancreas of the *Didelphis albiventris* (opossum) by immunocytochemical techniques. *Ann. Anz.* 157: 167-175.

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

Drucker, D.J., 2007. The role of gut hormones on glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 1, 24-32.

Eurell, J.A., Frappier, B.L., 2007. Textbook of Veterinary Histology. 6th Edition. Wiley-Blackwell. 416p.

Fonseca, C.C., Nogueira, J.C., Barbosa, A.J.A., 1998. Ultrastructural pattern of glucagon producing-cells in the gastric mucosa of the developing opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). *Ann. Anat.* 180, 477-480.

Fonseca, C.C., Nogueira, J.C., Barbosa, A.J.A., 2002. Argyrophilic and Glucagon-Immunoreactive Cells in the Ileum and Colon of the Developing Opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). *Cells Tissues Organs.* 170, 29-33.

Freitas-Ribeiro, G.M., Fonseca, C.C., Rodrigues, S.S., Matta, S.L.P., Neves, C.A., 2011. Quantification of argyrophilic, argentaffin and insulin immunoreactive cells in the small intestine in the opossum *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). *Acta Sci. Biol. Sci.* 33, 479-485.

Freitas-Ribeiro, G.M., Fonseca, C.C., Sartori, S.S.R., Loures-Ribeiro, A., Neves, C.A., 2012. Endocrine cells and nerve ganglia of the small intestine of

the Opossum *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Mammalia: Didelphidae).An. Acad. Bras. Cienc. 84: 747-757.

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

Galli, S.J., 2000. Mast cells and basophils. Curr. Opin. Hematol. 7, 32-39.

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

Hens, J., Gajda, M., Scheuermann, D.W., Adriaensen, D., Timmermans, J.P., 2002. The longitudinal smooth muscle layer of the pig small intestine is innervated by both myenteric and submucous neurons. Histochem. Cell Biol. 117, 481-492.

Hudson, N.P., Pearson, G.T., Mayhew, I.G., 2000. Tissue culture of the enteric nervous system from equine ileum. Vet. Res. Commun. 24, 299-307.

Kawasaki, Y., Saitoh, T., Okabe, T., Kumakura, K., Ohara-Imaizumi, M., 1991. Visualization of exocytotic secretory processes of mast cells by fluorescence techniques. Biochim. Biophys. Acta. 1067, 71-80.

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

Kierszenbaum, A.L., Tres, L.L., 2012. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. 3rd ed. Philadelphia, PA, Saunders Elsevier. 701p.

Kim, Y.S., Ho, S.B., 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. Curr. Gastroenterol. Rep. 12, 319-330.

Krause, W.J., Cutts, J.H. 3rd, Cutts, J.H., Yamada, J., 1989. Immunohistochemical study of the developing endocrine pancreas of the opossum (*Didelphis virginiana*). *Acta Anat.* 135, 84-96.

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

Krause, W.J., Yamada, J., Cutts, J.H., 1986. Enteroendocrine cells in the developing opossum stomach. *J. Anat.* 148, 47-56.

MacAlester, A.L., 1994. História Geológica da vida. São Paulo: E. Blucher. 173p.

Macedo, J., Loretto, D., Vieira, M.V., Cerqueira, R., 2006. Classes de desenvolvimento em marsupiais: um método para animais vivos. *Mastozool. Neotrop.* 13, 133-136.

McManus, J.F., 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* 23, 99-108.

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

Moran, G.W., Leslie, F.C., Levison; S.E., McLaughlin, J.T. 2008. Enteroendocrine cells: Neglected players in gastrointestinal disorders? *Therap. Adv. Gastroenterol.* 1, 51-60.

Mutovkina, T.N., Ivanova, V.F., 1987. Endocrine cells in the large intestine epithelium in various vertebrate species. *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.* 92, 93-95.

Polak, J.M., Bishop, A.E.; Barbosa, A.J.A.; Bloom, S.R., 1993. Hormônios gastrointestinais. In: Dani, R., Paula Castro, L. (Eds.). Gastroenterologia Clínica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p.1446-1465.

Rehfeld, J.F., 1998. The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiol. Rev.* 78, 1087-1102.

Ribeiro, G.M.F., 2009. Análise histológica e morfométrica de componentes neuroendócrinos do intestino delgado do gambá *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa. 60p.

Rindi, G., Leiter, A.B., Kopin, A.S., Bordi, C., Solcia, E., 2004. The “normal” endocrine cells of the gut changing concepts and new evidences. *Ann. NY Acad. Sci.* 1014, 1-12.

Robbe, C., Capon, C., Coddeville, B., Michalski, J.C., 2004. Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochem. J.* 384, 307-316.

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

Samoto, V.Y., Miglino, M.A., Ambrosio, C.E., Pereira, F.T.V., Lima, M.C., Carvalho, A.F., 2006. Opossum (*Didelphis sp*) mammary gland morphology associated to the marsupial model. *Biota Neotrop.* v. 6, n. 2.

Samuelson, D.A., 2007. Tratado de Histologia veterinária. Rio de Janeiro, Elsevier. 527p.

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

Schonhoff, S.E., Giel-Moloney, M., Leiter, A.B., 2004. Minireview: Development and Differentiation of Gut Endocrine Cells. *Endocrinology*. 145, 2639-2644.

Sjölund, K., Sandén, G., Hakanson, R., Sundler, F., 1983. Endocrine cells in human intestine: an immunocytochemical study. *Gastroenterology*. 85: 1120.

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

Sternberger, L.A., 1979. *Immunocytochemistry*. John Wiley and Sons, New York. 354p.

Stevens, C.E., Hume, I.D., 1995. Contributions of Microbes in Vertebrate Gastrointestinal Tract to Production and Conservation of Nutrients. *Physiol. R.* 78, 393-427.

Stone, K.D., Prussin, C., Metcalfe, D.D., 2010. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 73-80.

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

Vanner, S., 2000. Myenteric neurons activate submucosal vasodilator neurons in guinea pig ileum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, 380-387.

Yaman, M., Bayrakdar, A., Tarakçi, B.G., 2012. Existence of serotonin and neuropeptides-immunoreactive endocrine cells in the small and large intestines of the mole-rats (*Spalax leucodon*). *Tissue & Cell*. 44, 257-263.

Wallace, J.L., 1996. Cooperative modulation of gastrointestinal mucosal defence by prostaglandins and nitric oxide. *Clin. Invest. Med.* 19, 346-351.

## ARTIGO 2

### **Quantificação das células endócrinas e estudo ultraestrutural dos grânulos de insulina no intestino grosso de gambá *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826)**

#### **Resumo**

Objetivou-se verificar a distribuição de células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina no intestino grosso de gambás *D. aurita* e descrever a ultraestrutura dos grânulos secretores das células imunorreativas a insulina. Fragmentos do intestino grosso de dez espécimes machos de *D. aurita* foram coletados, processados e submetidos à histoquímica, imunohistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão. As células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina estão dispersamente distribuídas nas glândulas intestinais da camada mucosa, entre os demais tipos celulares do epitélio, em todas as regiões estudadas. Proporcionalmente, as células argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina representam 62,75%, 36,26% e 0,99% do total determinado de células endócrinas do intestino grosso, respectivamente. Quantitativamente, não houve diferença entre as células endócrinas argirófilas e argentafins, enquanto as células imunorreativas à insulina foram as menos numerosas. As células endócrinas imunorreativas à insulina são alongadas ou piramidais e apresentam núcleo arredondado de contorno irregular, além de grande quantidade de grânulos de secreção distribuídos pelo citoplasma. Os grânulos apresentam diferentes tamanhos e densidades eletrônicas, sendo classificados em imaturos e maduros, sendo os maduros a forma predominante na população granular total. De modo geral, o grânulo mostra-se com halo externo eletrolúcido e núcleo eletrodenso. O padrão ultraestrutural dos grânulos das células imunorreativas à insulina foi semelhante ao das células B das ilhotas pancreáticas.

**Palavras-chave:** células endócrinas imunorreativas à insulina; células endócrinas argirófilas; células endócrinas argentafins; imunohistoquímica; microscopia eletrônica de transmissão.

## Introdução

O aparelho digestório possui função crucial no controle da homeostase energética, através de sua ação na digestão e absorção de nutrientes ingeridos. Este mecanismo regulador é desenvolvido em partes pelas células enteroendócrinas (Drucker, 2007).

Essas células, distribuídas no estômago e nos intestinos dos vertebrados, correspondem a 1% do total das que estão presentes no epitélio intestinal e representam a maior população de células produtoras de hormônios do corpo (Rehfeld, 1998; Sternini et al., 2008). Elas atuam no controle da secreção, absorção, motilidade e proliferação das células epiteliais (Rindi et al., 2004; Drucker, 2007).

Adicionalmente, atribui-se a estas células papel essencial na regulação da ingestão de alimentos, na homeostase da glicose através de suas ações em órgãos-alvo periféricos (Drucker, 2007), na imunidade e manutenção da integridade da barreira da mucosa intestinal (Moran et al., 2008, Zhang et al., 2012). Em situações patológicas, elas estão também relacionadas com doenças gastrointestinais severas, como síndrome do intestino irritado pós-infecções, infecções entéricas, doenças inflamatórias intestinais (Moran et al., 2008) e neoplasias (Polak et al., 1993).

As células endócrinas podem ser classificadas de acordo com a sua morfologia (Fujita e Kobayashi, 1977; Dayal et al., 1987; Sjölund et al., 1983), capacidade de absorver determinados sais (Grimelius e Wilander, 1980), morfologia e conteúdo dos seus grânulos secretores (Polak et al., 1993) e presença de moléculas marcadoras específicas (Rindi et al., 2004; Schönhoff et al., 2004). De acordo com a morfologia, as células endócrinas são consideradas do tipo aberto, quando há prolongamento citoplasmático que alcança a superfície luminal, e do tipo fechado, sem comunicação com o lúmen (Fujita e Kobayashi, 1977). De acordo com a capacidade de absorver sais de prata, as células endócrinas são consideradas argentafins, quando absorvem e reduzem diretamente os sais de prata, ou argirófilas, quando os sais absorvidos são reduzidos pela ação de uma substância exógena redutora (Grimelius e Wilander, 1980).

Imunorreatividade à insulina tem sido localizadas em regiões extrapancreáticas, como na próstata (Stahler et al., 1988), no néfron (Coutinho et al., 1985), no sistema nervoso central (Devaskar et al., 2002), na retina (Meimaridis et al., 2003), na glândula submandibular (Égéa et al., 2000) e no intestino (Coutinho et al., 1984; Bendayan e Park, 1991; Kendzierski et al., 2000, Freitas-Ribeiro et al., 2011; 2012; Basile et al., 2012).

Foi observado por Fonseca et al. (1998) a existência de células imunorreativas ao glucagon na mucosa gástrica de *D. albiventris*, com características ultraestruturais semelhantes às células produtoras de glucagon das ilhotas pancreáticas. No entanto, não há na literatura trabalhos referentes às células imunorreativas à insulina no intestino grosso de marsupiais, o que ressalta a necessidade e importância desta pesquisa.

Os didelfídeos vêm se destacando como modelo em pesquisas de ontogênese devido à diferenciação simultânea do aparelho digestório quando o animal ainda se encontra em período intramarsupial (Krause et al., 1989; Fonseca et al., 2002b). Além disso, os marsupiais do gênero *Didelphis* apresentam particularidades que os colocam em destaque para pesquisa, entre as quais se destacam: a origem ancestral comum com os mamíferos eutérios, sendo considerados mamíferos morfologicamente primitivos (MacAlester, 1994); o curto período de gestação (Samoto et al., 2006) e a facilidade de acesso aos embriões, visto que o desenvolvimento embrionário se completa fora do útero.

A espécie *Didelphis aurita* possui hábito noturno, escansorial, e é muito ágil (Loretto e Vieira, 2005; Cunha e Vieira, 2005). Distribui-se na porção leste do Brasil, do estado de Alagoas ao norte do estado do Rio Grande do Sul, estendendo-se a oeste até o Mato Grosso do Sul, ocupando ainda o sudeste do Paraguai e a província de Misiones, na Argentina (Cerqueira e Lemos, 2000; Cerqueira e Tribe, 2008).

Pesquisas imunohistoquímicas das células endócrinas estão focadas no pâncreas, estômago e intestino delgado de marsupiais (Krause et al., 1985; Barbosa et al., 1987; Krause et al., 1989; Takagi et al., 1990; Fonseca et al., 2002a; Barbosa et al., 2006; Freitas-Ribeiro et al., 2011; 2012; Basile et al., 2012), não havendo qualquer trabalho referente a células endócrinas

no intestino grosso da espécie *D. aurita*. Na tentativa de preencher esta lacuna, objetivou-se verificar a distribuição de células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina no intestino grosso de gambás *D. aurita* e descrever a ultraestrutura dos grânulos secretores das células imunorreativas a insulina.

## **Material e métodos**

### **Coleta e eutanásia dos animais**

Foram utilizados dez espécimes machos de gambás *Didelphis aurita*, com peso médio de  $1,03 \pm 0,19$  kg, comprimentos vértice-caudal e ápice-caudal de  $32,70 \pm 3,59$  e  $46,05 \pm 12,50$  cm, respectivamente, e perímetro e altura torácicos de  $22,70 \pm 1,57$  e  $11,35 \pm 0,78$  cm, respectivamente. Os animais foram considerados adultos por possuírem dentição completa (Macedo et al., 2006).

As capturas foram autorizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (licença 23204-1) em pequena região de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais, Brasil (S  $20^{\circ}45'14''$ , W  $42^{\circ}52'55''$ ). A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (protocolo 11/2010).

Foram usadas armadilhas tipo gancho com dimensões de 75 x 31 x 31 cm, utilizando como iscas banana e ovos. Após a captura, os animais permaneceram em cativeiro por um período de 24 horas, recebendo água e dieta semelhante a sua alimentação natural (Carvalho et al., 2005). Estes foram anestesiados com Tiopental sódico 30 mg/mL na dose de 60 mg/kg, por via intraperitoneal. A eutanásia foi realizada sob anestesia, por meio de administração intracardíaca de cloreto de potássio 0,25%, em função do peso corporal.

## **Biometria e coleta de fragmentos do intestino grosso**

Após exposição da cavidade abdominal, o intestino grosso foi retirado e colocado sobre uma calha umedecida com solução fisiológica, o que possibilitou sua mensuração por paquímetro sem que houvesse distensão do órgão.

As regiões intestinais, ceco, cólons (ascendente, transverso e descendente) e reto foram identificadas através das flexuras intestinais e delimitadas por amarraduras. Foram coletadas três porções (proximal, média e distal) de cada região, totalizando quinze fragmentos de cada animal.

## **Histoquímica e imunohistoquímica**

Fragmentos do material coletado foram fixados em formol tamponado 10% por 24 horas, desidratados em série etílica crescente, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e seccionados na espessura de 5  $\mu\text{m}$ , com intervalo de 50  $\mu\text{m}$  entre as secções, utilizando micrótomo rotativo (Leica Multicut 2045, Reichert-Jung Products, Germany).

Os cortes obtidos foram corados segundo as técnicas de Grimelius (Grimelius e Wilander, 1980) e Masson-Fontana modificado (Barbosa et al., 1984) para detecção de células endócrinas argirófilas e argentafins, respectivamente.

Para detecção das células endócrinas imunorreativas à insulina foi utilizado anticorpo monoclonal produzido pelo Bethyl Laboratories (lote nº. A90-117P-4) e realizada a técnica de Imunoperoxidase indireta (Sternberger, 1979). Como controles positivo e negativo, foram utilizadas secções de pâncreas da mesma espécie processadas nas mesmas condições.

A documentação fotográfica das secções foi realizada em microscópio de luz CX31 (Olympus, Tokyo, Japan) com câmera digital SC020 (Olympus, Tokyo, Japan). As células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina foram quantificadas com auxílio do software Image-Pro Plus 3.5 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, Maryland, USA), analisando-se dez campos aleatórios de 78,500  $\mu\text{m}^2$  da túnica mucosa, sendo os resultados convertidos em células por  $\text{mm}^2$ .

Foram consideradas positivas as células endócrinas argirófilas e argentafins que apresentaram grânulos citoplasmáticos impregnados pelos sais de prata e núcleo negativo; e as imunorreativas à insulina com o citoplasma de aspecto granular de coloração marrom.

### **Análise ultraestrutural**

Fragmentos dos cólons ascendente e descendente foram fixados em glutaraldeído a 2,5% durante 24 horas, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas, em seguida, desidratados em série crescente de acetona e incluídos em resina Epon 812. Secções semifinas de 500 nm de espessura foram obtidas por meio de micrótomo rotativo (Leica Multicut 2045, Reichert-Jung Products, Germany) e submetidas à técnica de desplastificação (Lane e Europa, 1965). Posteriormente, procedeu-se a técnica de Imunoperoxidase indireta (Sternberger, 1979) para identificar as células endócrinas imunorreativas à insulina. Nesta técnica, utilizou-se anticorpo policlonal produzido pelo Laboratório Dakocytomation (A0564).

Os blocos que apresentavam as células identificadas foram delimitados segundo o método descrito por Fonseca et al. (1998) e, posteriormente, foram obtidas secções ultrafinas com auxílio de ultramicrótomo (Du Pont-Sorvall, Porter-Blum MT2-B). Essas secções foram contrastadas com acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo a 0,2% e observadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109).

Os grânulos das células endócrinas imunorreativas à insulina foram quantificados por unidade de área em  $\mu\text{m}^2$  e qualificados de acordo com a eletrodensidade em imaturos e maduros (Fukuma, 1974). Além disso, calculou-se o diâmetro, área e volume destes grânulos. Estas análises foram realizadas com auxílio do software Image-Pro Plus 3.5 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, Maryland, USA).

### **Análise estatística**

Os resultados foram expressos com média e desvio padrão (média  $\pm$  desvio padrão). A distribuição da normalidade dos dados foi verificada pelo

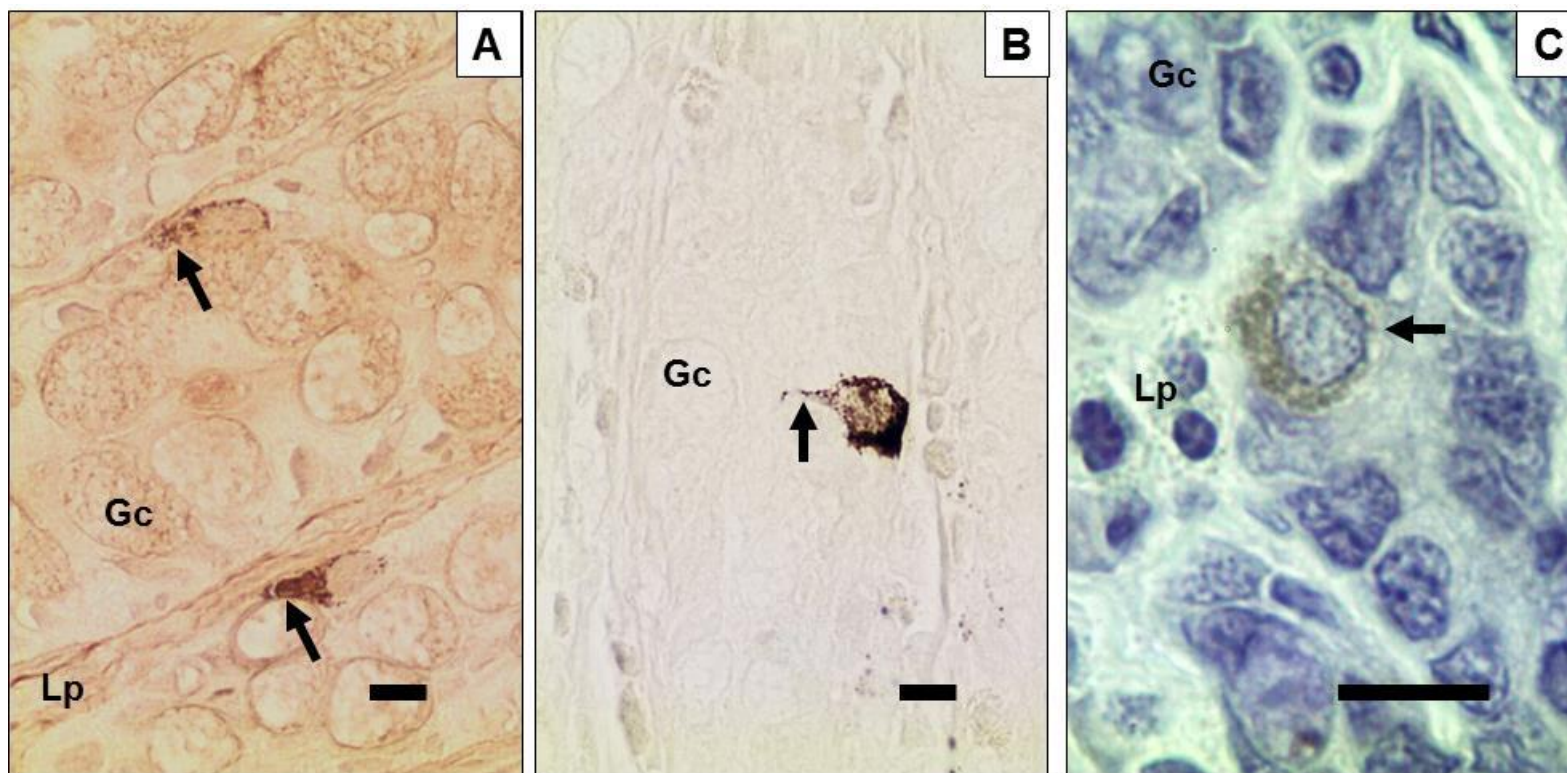
teste de Shapiro-Wilk. Considerando-se o resultado deste teste, os testes de Kruskal-Wallis e Dunn foram utilizados para comparações múltiplas. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Todos os testes foram realizados usando o software estatístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA).

## **Resultados**

As células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina estão dispersamente distribuídas ao longo das glândulas intestinais, entre os demais tipos celulares do epitélio, em todas as regiões estudadas (Figura 1).

Essas células apresentam as formas alongada, piramidal ou arredondada. Possuem núcleo ovóide e citoplasma com grande quantidade de grânulos de secreção, particularmente na porção infranuclear (Figura 1). Foram localizadas nas regiões basais, médias e apicais das glândulas intestinais.

A maioria das células endócrinas é do tipo aberto e apresenta prolongamento apical, longo e estreito (Figura 1B), alcançando a superfície luminal. Outras são do tipo fechado, sem comunicação aparente com o lúmen, e estão localizadas geralmente na base das glândulas intestinais (Figura 1A e C). A porção basal dessas células apresenta-se, muitas vezes, dilatada e em contato com a porção basal de células adjacentes (Figura 1A).



**Figura 1** - Túnica mucosa do intestino grosso de *Didelphis aurita*. A) Células endócrinas argirófilas com a porção basal dilatada (seta), classificada como do tipo fechado. Cólon descendente distal. B) Célula endócrina argentafin com prolongamento apical (seta), classificada como do tipo aberto. Cólon transversal distal. C) Célula endócrina imunorreativa à insulina na base da glândula intestinal, classificada como tipo fechado. Cólon ascendente distal. Seta = célula endócrina; Gc = Célula mucossecretora; Lp = lâmina própria; A = Grimelius; B = Masson-Fontana modificado; C = Imunoperoxidase indireta. Barra: 10  $\mu$ m.

O número de células endócrinas argirófilas e imunorreativas à insulina não apresentou diferença entre as porções analisadas na região do ceco (Tabelas 1 e 3). Porém, as células endócrinas argentafins, estavam em maior número de células na porção proximal em relação à distal (Tabela 2).

Os cólons ascendente, transverso e descendente não apresentaram diferença no número de células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina nas porções analisadas (Tabelas 1, 2 e 3).

Na região do reto, o número de células endócrinas argirófilas e argentafins foi maior nas porções proximal e média (Tabelas 1 e 2). Nesta mesma região, não houve diferença no número de células imunorreativas à insulina entre as porções analisadas (Tabela 3).

Na porção proximal, o número de células endócrinas argirófilas na região do ceco foi menor que nos cólons ascendente e transverso, e na região do reto, o número dessas células foi menor que no cólon transverso (Tabela 1). Nesta mesma porção, o número de células endócrinas argentafins foi maior no cólon transverso quando comparado com a região do reto (Tabela 2).

Na porção média o número de células endócrinas argirófilas na região do cólon transverso foi maior que na região do reto (Tabela 1).

Na porção distal, o número de células endócrinas argirófilas na região do reto foi menor quando comparado às regiões do ceco, cólon ascendente e transverso (Tabela 1). Nessa mesma porção, o número de células endócrinas argentafins foi maior no cólon ascendente quando comparado ao reto (Tabela 2).

As porções proximal, média e distal de todas as regiões estudadas, não apresentaram diferença para as células endócrinas imunorreativas à insulina (Tabela 3), sendo estas células igualmente distribuídas ao longo do intestino grosso.

**Tabela 1** – Número de células endócrinas argirófilas por área (mm<sup>2</sup>) da camada mucosa do intestino grosso de gambá *D. aurita*.

	Proximal	Média	Distal
Ceco	26,94±8,62 <sup>aA</sup>	30,11±9,17 <sup>aAB</sup>	34,23±7,08 <sup>aA</sup>
Ascendente	43,67±9,16 <sup>aBC</sup>	39,73±9,04 <sup>aAB</sup>	35,65±8,21 <sup>aA</sup>
Cólon Transverso	50,54±9,27 <sup>aBD</sup>	48,92±12,97 <sup>aA</sup>	37,53±12,02 <sup>aA</sup>
Descendente	40,44±11,47 <sup>aACD</sup>	31,64±9,06 <sup>aAB</sup>	29,21±7,99 <sup>aAB</sup>
Reto	28,75±5,99 <sup>aAC</sup>	26,77±7,13 <sup>aB</sup>	16,86±4,30 <sup>bB</sup>

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

**Tabela 2** – Número de células endócrinas argentafins por área (mm<sup>2</sup>) da camada mucosa do intestino grosso de gambá *D. aurita*.

	Proximal	Média	Distal
Ceco	21,71±6,46 <sup>aAB</sup>	15,49±5,11 <sup>abA</sup>	12,00±3,55 <sup>bAB</sup>
Ascendente	24,18±6,91 <sup>aAB</sup>	20,63±4,60 <sup>aA</sup>	25,62±6,41 <sup>aA</sup>
Cólon Transverso	27,32±9,74 <sup>aA</sup>	19,95±10,50 <sup>aA</sup>	24,09±11,92 <sup>aAB</sup>
Descendente	23,17±10,94 <sup>aAB</sup>	18,63±10,37 <sup>aA</sup>	26,41±14,64 <sup>aAB</sup>
Reto	17,02±2,96 <sup>aB</sup>	15,69±2,39 <sup>aA</sup>	10,96±4,21 <sup>bB</sup>

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

**Tabela 3** – Número de células endócrinas imunorreativas à insulina por área (mm<sup>2</sup>) da camada mucosa do intestino grosso de gambá *D. aurita*.

	Proximal	Média	Distal
Ceco	0,61±0,99 <sup>aA</sup>	0,31±0,33 <sup>aA</sup>	0,54±1,02 <sup>aA</sup>
Ascendente	0,89±1,07 <sup>aA</sup>	0,38±0,24 <sup>aA</sup>	1,09±1,13 <sup>aA</sup>
Cólon Transverso	1,20±1,40 <sup>aA</sup>	0,61±0,85 <sup>aA</sup>	0,86±0,85 <sup>aA</sup>
Descendente	0,74±0,93 <sup>aA</sup>	0,59±1,01 <sup>aA</sup>	1,01±0,95 <sup>aA</sup>
Reto	0,31±0,38 <sup>aA</sup>	0,26±0,58 <sup>aA</sup>	0,19±0,26 <sup>aA</sup>

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

Não houve diferença para o número médio de células endócrinas argirófilas e argentafins, e o número destas foi predominante em relação às células endócrinas imunorreativas à insulina. Proporcionalmente, as células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina representam 62,75%, 36,26% e 0,99% do total determinado de células endócrinas do intestino grosso, respectivamente (Tabela 4).

Na região do ceco foram quantificadas 47,32 células/mm<sup>2</sup>, sendo que destas, 64,31% são argirófilas, 34,66% são argentafins e 1,03% são imunorreativas à insulina. Nos cólons ascendente, transverso e descendente foram quantificadas 63,85 células/mm<sup>2</sup>, sendo 61,97% argirófilas, 36,74% argentafins e 1,29% imunorreativas à insulina. No reto foram quantificadas 38,94 células/mm<sup>2</sup>, constituídas por 61,96% de argirófilas, 37,39% de argentafins e 0,65% de imunorreativas à insulina (Tabela 4).

**Tabela 4** – Número total e percentual de células endócrinas argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina (CII) por área (mm<sup>2</sup>) da túnica mucosa do intestino grosso de gambá *D. aurita*.

Região	Argirófilas		Argentafins		CII	
	N/mm <sup>2</sup>	%	N/mm <sup>2</sup>	%	N/mm <sup>2</sup>	%
Ceco	30,43±8,29	64,31	16,40±5,04	34,66	0,49±0,78	1,03
Cólons	39,70±9,91	61,97	23,33±9,07	36,74	0,82±0,94	1,29
Reto	24,13±5,81	61,96	14,56±3,19	37,39	0,25±0,41	0,65
Média	31,42±8,00 <sup>a</sup>	62,75	18,10±5,77 <sup>a</sup>	36,26	0,52±0,71 <sup>b</sup>	0,99

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si (p > 0,05) pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

### Ultraestrutura das células endócrinas imunorreativas à insulina

As células endócrinas imunorreativas à insulina estão distribuídas em todo epitélio do intestino grosso de *D. aurita*. Estas foram localizadas na base das glândulas intestinais e comumente não apresentam contato com o lúmen, sendo classificadas como tipo fechado (Figura 2).

Estas células são alongadas ou piramidais com núcleo arredondado de contorno irregular, além de grande quantidade de grânulos de secreção

distribuídos em todo o citoplasma, geralmente concentrados nos polos apical e basal da célula (Figura 2).

Os grânulos apresentam diferentes tamanhos e densidades eletrônicas, e foram classificados em imaturos e maduros. De modo geral, os grânulos mostram-se com halo externo eletrolúcido e núcleo eletrodense (Figura 2).

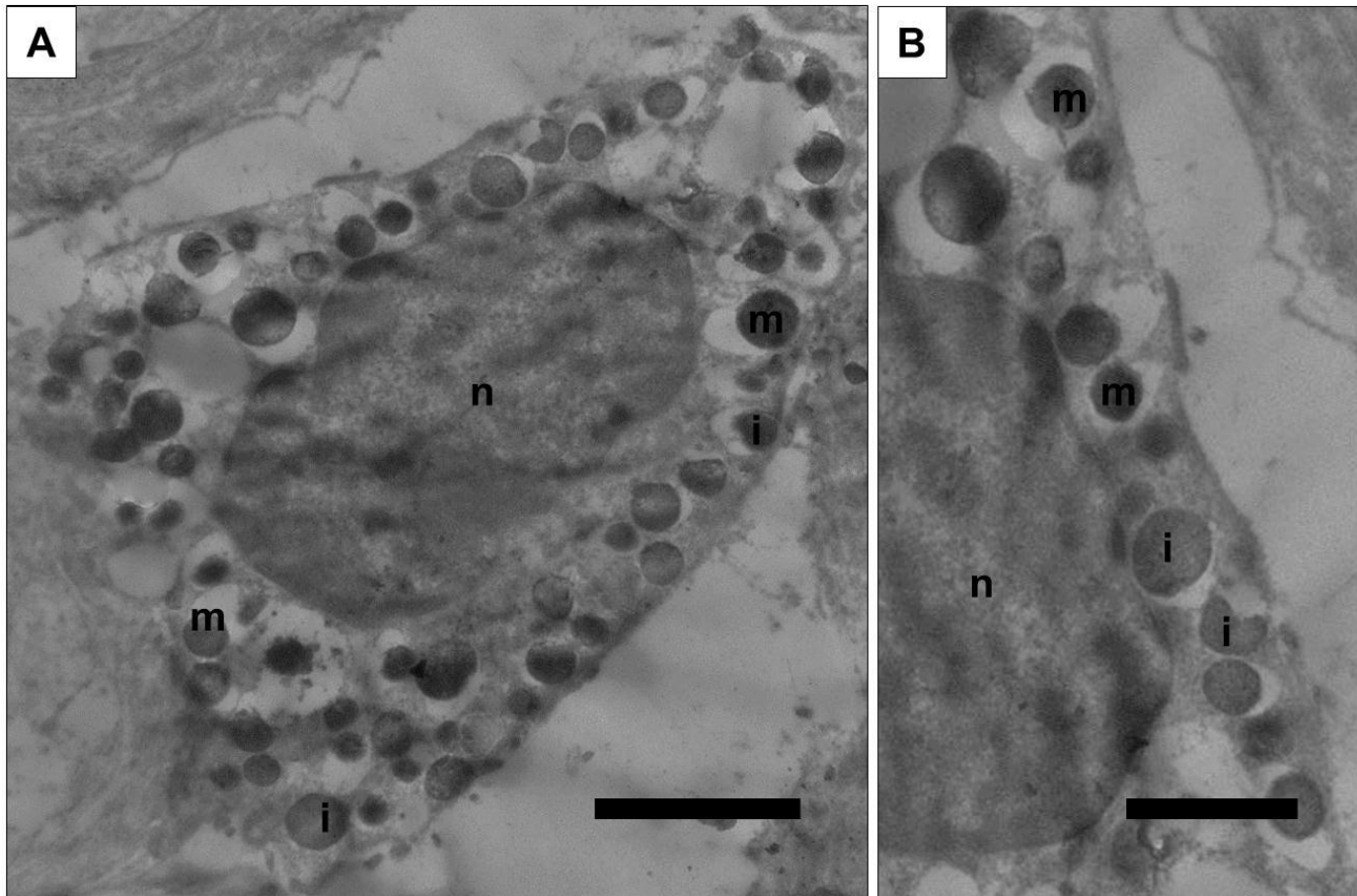
Os grânulos maduros dessas células apresentam núcleo eletrodense central ou excêntrico envolvidos por amplo halo eletrolúcido. Os grânulos imaturos são semelhantes ao maduro, porém o núcleo menos eletrodense e amorfo, ou apresenta núcleo eletrodense homogêneo e estreito halo eletrolúcido (Figura 2).

Os grânulos maduros são predominantes e representam 65% do total dos grânulos de secreção. Esses grânulos apresentam diâmetro de  $0,56 \pm 0,07 \mu\text{m}$ , área de  $0,25 \pm 0,06 \mu\text{m}^2$  e volume de  $0,09 \pm 0,04 \mu\text{m}^3$ ; enquanto os grânulos imaturos representam 35% do total dos grânulos de secreção, com diâmetro, área e volume de  $0,45 \pm 0,07 \mu\text{m}$ ,  $0,16 \pm 0,05$  e  $0,05 \pm 0,02$ , respectivamente (Tabela 5).

As células endócrinas imunorreativas à insulina apresentam  $1,75 \pm 0,44$  grânulos de secreção/ $\mu\text{m}^2$ , sendo que,  $1,13 \pm 0,35$  grânulos de secreção/ $\mu\text{m}^2$  são maduros e  $0,63 \pm 0,52$  grânulos de secreção/ $\mu\text{m}^2$  são imaturos (Tabela 5).

**Tabela 5** – Morfometria dos grânulos secretores das células endócrinas imunorreativas à insulina do intestino grosso de gambá *D. aurita*.

Grânulos	%	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	N/ $\mu\text{m}^2$
Imaturos	35	$0,45 \pm 0,07$	$0,16 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,02$	$1,13 \pm 0,35$
Maduros	65	$0,56 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,06$	$0,09 \pm 0,04$	$0,63 \pm 0,52$



**Figura 2** – Ultraestrutura da célula endócrina imunorreativa à insulina do intestino grosso de gambá *D. aurita*. A) Grânulos secretores distribuídos em todo citoplasma da célula. B) Detalhes dos grânulos de insulina imaturos (i) e maduros (m). n = núcleo da célula. Microscopia eletrônica de transmissão. Barra: A = 2  $\mu$ m; B = 1  $\mu$ m.

## Discussão

No presente trabalho, as células endócrinas argirófilas e argentafins foram localizadas no epitélio da camada mucosa em todas as regiões e porções do intestino grosso de *D. aurita*, sendo a maioria delas do tipo aberto. Ascélulas do tipo fechado se restringiam à base das glândulas. Células argirófilas e argentafins do tipo aberto e fechado foram também verificadas no intestino delgado desta mesma espécie (Freitas-Ribeiro et al., 2011; 2012; Basile et al., 2012) e no estômago de outros gambás como em *Didelphis virginiana* (Krause et al., 1986), além de em todo aparelho digestório do veado (*Muntiacus muntjak*) (Adnyane et al., 2011), no estômago e intestinos delgado e grosso de babirusa (*Babyrousa babyrussa*) (Agungpriyono et al., 2000), e nos intestinos delgado e grosso de roedor (*Spalax leucodon*) (Yaman et al., 2012).

Funcionalmente, as células endócrinas estão intimamente ligadas ao sistema nervoso entérico e podem atuar como reguladores locais nos processos digestivos (Grube, 1986). Conforme Polak et al. (1993), os prolongamentos citoplasmáticos são típicos de células que possuem função parácrina, pois amplia seu contato com as células vizinhas. As células endócrinas observadas no intestino grosso de *D. aurita* certamente podem atuar por meio dos mecanismos endócrino, parácrino ou autócrino, em especial de modo parácrino naquelas que apresentam dilatação na sua porção basal.

No presente estudo, não houve diferença entre o número de células endócrinas argirófilas e argentafins no intestino grosso de *D. aurita*. No intestino delgado da mesma espécie em animais adultos e pós-púberes, houve predomínio de células endócrinas argirófilas, particularmente no duodeno, região que apresentou maior número destas células (Freitas-Ribeiro et al., 2011). Rodrigues (2005) trabalhando com intestino delgado de capivara (*Hydrochaerishydrochaeris*) também relatou maior número de células argirófilas que argentafins, enquanto Bressan et al. (2004) verificaram no ceco da capivara (*H. hydrochaeris*) a inexistência de diferença no número de células endócrinas argirófilas e argentafins.

Diferenças no padrão de distribuição das células endócrinas nos segmentos intestinais estão relacionadas com suas funções fisiológicas na região ou segmento intestinal. Segundo Kendzierski et al. (2000), as células endócrinas do intestino delgado estão envolvidas principalmente no controle da liberação de enzimas digestivas e no intestino grosso, controlando a motilidade intestinal.

No presente trabalho, os cólons apresentaram a maior proporção de células endócrinas, tanto argirófilas como argentafins, diferentemente da hipótese estabelecida por Kitamura et al. (1982) e Ito et al. (1987), que afirmaram que altas concentrações de células endócrinas estão presentes nas regiões terminais de cada segmento intestinal, sendo no intestino grosso a região do reto com maior proporção de células endócrinas, envolvidas no controle *feedback* da secreção e motilidade intestinal.

Nas regiões intestinais, as células endócrinas argentafins apresentaram predomínio na porção proximal do ceco e nas porções proximal e média do reto. As células endócrinas argirófilas também apresentaram predomínio na porção proximal do reto. Conforme Sjölund et al. (1983) as células produtoras de serotonina são argentafins. A serotonina é conhecida por estimular à contração da musculatura lisa do aparelho gastroentérico, à secreção de água e eletrólitos, além de estimular os neurônios mioentéricos promovendo respostas vasodilatadoras na submucosa (Vanner, 2000; Ahlmane Nilsson, 2001). Diante desses resultados, pode-se inferir que o controle de secreção e motilidade no intestino grosso em *D. aurita* é mais efetivo nas porções iniciais e médias de cada região.

O total das células endócrinas argirófilas no intestino grosso em *D. aurita* foi de  $94,26 \pm 8,02$  células/mm<sup>2</sup>. As células argirófilas representam uma população heterogênea de células endócrinas, apresentando diversos tipos de peptídeos e aminas biogênicas como produto de secreção (Polak et al., 1993). De acordo com esses mesmos autores, a técnica de Grimelius para células argirófilas marca quase todos os tipos de células enteroendócrinas, com exceção daquelas produtoras de insulina do pâncreas, colecistocinina e

somatostatina. Fonseca et al. (2002a), ao identificarem células argirófilas no cólon de gambás da espécie *D. albiventris* em diferentes fases de desenvolvimento, encontraram médias de  $45,8 \pm 6,2$  a  $84,4 \pm 23,9$  células/mm<sup>2</sup>.

Embora apresenta-se em menor proporção de células, as células endócrinas imunorreativas à insulina também estão distribuídas em todas as regiões e porções do intestino grosso de *D. aurita*. Foram localizadas na base das glândulas intestinais e comumente não apresentam contato com o lúmen sendo consideradas como fechadas. Estas células são alongadas ou piramidais, com núcleo arredondado, além de apresentarem grande quantidade de grânulos distribuídos em todo o citoplasma. Basile et al. (2012) também descreveram estas características morfológicas para estas células em diferentes regiões do intestino delgado da mesma espécie.

Foi observado elevada proporção de células endócrinas argirófilas e argentafins em relação às células endócrinas imunorreativas à insulina do intestino grosso de *D. aurita*. No intestino delgado desta mesma espécie, Freitas-Ribeiro et al. (2011; 2012) e Basile et al. (2012) também observaram menores proporções das células endócrinas imunorreativas à insulina em relação às células argirófilas e argentafins. Tais células imunorreativas à insulina não foram localizadas no estômago e intestinos delgado e grosso de búfalo (*Bubalus bubalis*) e em veado (*Muntiacus muntjak*) (Baltazar et al., 1998; Adnyane et al., 2011).

Justificando as diferenças nos padrões de distribuição e frequência das células endócrinas, Forssmann et al. (1969) constataram que, os diferentes tipos dessas células ocorrem com frequência variada de acordo com a área de investigação e que, algumas delas, são encontradas somente em regiões específicas. Complementando, Yaman et al. (2012) consideram que as células endócrinas aparecem notavelmente diferentes dependendo ainda da espécie animal.

O intestino de gambás (*Didelphis virginiana*) apresenta características semelhantes a do pâncreas em relação à presença de células endócrinas (Krause et al., 1986), no entanto, o mecanismo de atuação desses

hormônios é distinto. A insulina intestinal possui funções parácrinas ou autócrinas de grande importância no controle da divisão celular, na secreção de peptídeos, na absorção e na motilidade intestinal (Bendayan e Park, 1991; Kendzierski et al. 2000; Basile et al., 2012).

Os grânulos secretores das células imunorreativas à insulina verificados nesta pesquisa apresentam características ultraestruturais semelhantes aos das células B das ilhotas pancreáticas. Deste modo, a síntese desse hormônio deve seguir a mesma via: a insulina pancreática é sintetizada inicialmente como um precursor de cadeia única (pré-pró-insulina), que é convertida rapidamente em pró-insulina no retículo endoplasmático. A pró-insulina é transportada para o complexo de Golgi, onde é empacotada em grânulos secretores. A pró-insulina é convertida para insulina e armazenada, aguardando liberação por estímulos específicos (Steiner, 2000; Pfützner e Forst, 2011).

No presente estudo, estes grânulos apresentaram diferentes tamanhos e densidades eletrônicas em relação a outros tipos celulares endócrinos. Estudos ultraestruturais confirmam a natureza heterogênea das células endócrinas, pela demonstração de que os grânulos diferem de um tipo celular para o outro em relação ao tamanho, forma, densidade eletrônica (Forssmann et al., 1969) e distribuição no citosol (Polak et al., 1993). Grânulos secretores de glucagon na mucosa gástrica de gambás e em cultura de células em ratos apresentam núcleo grande eletrodenso e região periférica eletrolúcida estreita (Fonseca et al., 1998; El-Naggar, 2000). Forssmann et al. (1969) descreveram, em intestino de ratos, grânulos secretores de células produtoras de serotonina com alta densidade e polimorfos.

Os grânulos secretores das células imunorreativas à insulina foram classificados em maduros e imaturos. De acordo com Fukuma (1974) existe uma relação direta entre o polimorfismo ultraestrutural e a maturação dos grânulos de insulina. No presente trabalho, os grânulos maduros apresentaram núcleo eletrodenso central ou excêntrico cercados com halo eletrolúcido de tamanho variado entre o núcleo e a membrana limitante. Essas características

foram semelhantes aos grânulos secretores maduros das células B das ilhotas pancreáticas em ratos (Grube, 1986; Tahir et al., 1992; El-Naggar, 2000).

Já os grânulos imaturos analisados apresentaram halo eletrolúcido estreito e centro eletrodense arredondado, ou núcleo com menor densidade de tamanho variável e espaço variado entre a membrana limitante. Em cultura de células B das ilhotas pancreáticas descritas por El-Naggar (2000), os grânulos imaturos apresentam núcleo homogêneo ou moderadamente denso com membrana limitante ajustada. Fukuma (1974) descreve duas formas de grânulos secretores imaturos, sendo a primeira forma semelhante aos grânulos maduros, mas com núcleo amorfo com eletrodensidade menor. A segunda forma, pouco observada, apresenta núcleo eletrodense homogêneo e espaço estreito entre esse e a membrana limitante.

Estas formas dos grânulos secretórios imaturos são consideradas precursoras da forma madura, observadas frequentemente próximas ao complexo de Golgi das células B quando estimulada por glicose. A maturação foi atribuída à condensação do material de secreção em um núcleo central acompanhado por resolução da zona periférica (Fukuma, 1974).

Neste trabalho, as formas maduras dos grânulos das células endócrinas imunorreativas à insulina foram predominantes, representando 65% do total dos grânulos de secreção, enquanto que os grânulos imaturos representam 35% do total dos grânulos de secreção. El-Naggar (2000) em cultura de células B das ilhotas pancreáticas de ratos encontrou uma proporção de 44% de grânulos maduros e 56% de imaturos.

O diâmetro médio dos grânulos de insulina imaturo e maduro foi de  $0,50 \pm 0,07 \mu\text{m}$ . Estes valores foram iguais aos encontrados por Fukuma (1974) em cultura de células B pancreáticas de ratos ( $0,50 \pm 0,11 \mu\text{m}$ ), e maiores quando comparados com o diâmetro dos grânulos de células B das ilhotas pancreáticas em cultura de ratos ( $0,27 \pm 0,05 \mu\text{m}$ ) (El-Naggar, 2000).

## Conclusão

As células endócrinas imunorreativas à insulina, assim como as células endócrinas argirófilas e argentafins, estão distribuídas em todas as regiões e porções do intestino grosso de *D. aurita*.

Não houve diferença para o número médio de células endócrinas argirófilas e argentafins no intestino grosso, e o número destas foi maior relação às células endócrinas imunorreativas à insulina.

O padrão ultraestrutural dos grânulos das células imunorreativas a insulina no intestino grosso de *D. aurita* foi semelhante ao das células B de ilhotas pancreáticas.

## Referências

Adnyane, I.K., Zuki, A.B., Noordin, M.M., Agungpriyono, S., 2011. Immunohistochemical study of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the barking deer, *Muntiacus muntjak*. *Anat. Histol. Embryol.* 40, 365-374.

Agungpriyono, S., Macdonald, A.A., Leus, K.Y., Kitamura, N., Adnyane, I.K., Goodall, G.P., Hondo, E., Yamada, J., 2000. Immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the babirusa, *Babyrusa babyrussa* (Suidae). *Anat. Histol. Embryol.* 29, 173-178.

Ahlman, H., Nilsson, O., 2001. The gut as the largest endocrine organ in the body. *Ann. Oncol.* 2, 63-68.

Baltazar, E.T., Kitamura, N., Hondo, E., Yamada, J., Maala, C.P., Simborio, L.T., 1998. Immunohistochemical study of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the Philippine carabao (*Bubalus bubalis*). *Anat. Histol. Embryol.* 27, 407-411.

Barbosa, A.J., Castro, L.P., Margarida, A., Nogueira, M.F., 1984. A simple and economical modification of the Masson-Fontana method for staining melanin granules and enterochromaffin cells. *Stain Technol.* 59, 193-196.

Barbosa, A.J., Nogueira, J.C., Penna, F.J., Polak, J.M., 1987. Distribution of enteroglucagon- and polypeptide YY-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the white-belly opossum (*Didelphis albiventris*). *Histochemistry.* 88: 37-40.

Barbosa, A.J.A., Nogueira, J.C., Fonseca, C.C., 2006. Células endócrinas (APUD) do sistema digestivo do gambá *Didelphis albiventris*. In: Cáceres, N.C., Monteiro-Filho, E.L.A. (Org.). *Os Marsupiais do Brasil: Biologia, ecologia e evolução.* Campo Grande: Ed. UFMS, p.89-98.

Basile, D.R.S., Novaes, R.D., Marques, D.C.S., Fialho, M.C.Q., Neves, C.A., Fonseca, C.C., 2012. Analysis of the morphology and distribution of argentaffin, argyrophil and insulin-immunoreactive endocrine cells in the small intestine of the adult opossum *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). *Tissue & Cell.* 44: 301-307.

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

Bressan, M.S., Fonseca, C.C., Menin, E., Paula, T.A.R. 2004. Identificação e quantificação de gânglios nervosos, células argentafins, argirófilas e imunorreativas à serotonina no ceco de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Rev. Ceres.* 51, 729-739.

Carvalho, F.M.V., Fernandez, F.A.S., Nessimian, J.L., 2005. Food habits of sympatric opossums coexisting in small Atlantic Forest fragments in Brazil. *Mamm. Biol.* 70, 366-375.

Cerqueira, R., Lemos, B., 2000. Morphometric differentiation between neotropical black-eared opossums, *Didelphis marsupialis* and *D. aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). *Mammalia*.64, 319-327.

Cerqueira, R., Tribe, C.J., 2008. Genus *Didelphis* Linnaeus, 1758. In: Gardner, A.L. (ed.) *Mammals of South America*. Vol. 1. Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats. Chicago: Chicago University Press. p. 17-25.

Coutinho, H.B., Sewell, H.F., Coutinho, V.B., 1985. Immunocytochemical demonstration of insulin in the mesonephros and metanephros of the Brazilian opossum (*Didelphis albiventris*). *Ann. Anz.* 159: 97-103.

Coutinho, H.B., Sewell, H.F.; Smith, D.I., Coutinho, V.B., Pinheiro, P.B., 1984. Demonstration of insulin in the pancreas of the *Didelphis albiventris* (opossum) by immunocytochemical techniques. *Ann. Anz.* 157: 167-175.

Cunha, A.A., Vieira, M.V., 2005. Age, season, and vertical use of the Atlantic rainforest by the common opossum, *Didelphis aurita* - Wied, 1826. *Acta Theriol.*50, 551-560.

Dayal, Y., DeLellis, R.A., Wolfe, H.J., 1987. Hyperplastic lesions of the gastrointestinal endocrine cells. *Am J Surg Pathol.* 11, 87-101.

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

Drucker, D.J., 2007. The role of gut hormones on glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 1, 24-32.

Égéa, J-C., HirtZ, C., Gross, R., Lajoix, A-D., Traskawka, E., Ribes, G., Deville de Périère, D., 2000. Preproinsulin I and II mRNA expression in adult rat submandibular glands. *Eur. J. Oral Sci.* 108, 292-296.

El-Naggar, M.M., 2000. Ultrastructural immunogold study on the various cell types of cultured pancreatic islets of adult rats. *Folia Morphol.* 59, 253-262.

Fonseca, C.C., Nogueira, J.C., Barbosa, A.J., 1998. Ultrastructural pattern of glucagon producing-cells in the gastric mucosa of the developing opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). *Ann. Anat.* 180, 477-480.

Fonseca, C.C., Nogueira, J.C., Barbosa, A.J.A., 2002a. Argyrophilic and Glucagon-Immunoreactive Cells in the Ileum and Colon of the Developing Opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia). *Cells Tissues Organs.* 170, 29-33.

Fonseca, C.C., Nogueira, J.C., Barbosa, A.J.A., 2002b. Diâmetro das ilhotas pancreáticas do gambá *Didelphis albiventris* em desenvolvimento intramarsupial. *Arch. Vet. Sci.* 7, 129-134.

Forssmann, W.G., Orci, L., Pictet, R., Renold, A. E., Rouiller, C., 1969. The endocrine cells in the epithelium of the gastrointestinal mucosa of the rat. An electron microscope study. *J. Cell Biol.* 40, 692–715.

Freitas-Ribeiro, G.M., Fonseca, C.C., Rodrigues, S.S., Matta, S.L.P., Neves, C.A., 2011. Quantification of argyrophilic, argentaffin and insulin immunoreactive cells in the small intestine in the opossum *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). *Acta Sci. Biol. Sci.* 33, 479-485.

Freitas-Ribeiro, G.M., Fonseca, C.C., Sartori, S.S.R., Loures-Ribeiro, A., Neves, C.A., 2012. Endocrine cells and nerve ganglia of the small intestine of the

Opossum *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Mammalia: Didelphidae). An. Acad. Bras. Cienc. 84: 747-757.

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

Fukuma, M., 1974. Electron microscopic studies on the granule release from the rat pancreatic B-cells in organ culture. J. Electron Microsc. 23, 167-183.

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

Grube, D., 1986. The endocrine cells of the digestive system: amines, peptides, and modes of action. Anat. Embryol. 175, 151-162.

Ito, H., Yamada, J., Yamashita, T., Hashimoto, Y., Kudo, N., 1987. An immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the pig. Jpn. J. Vet. Sci. 49, 105-114.

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

Kitamura, N., Yamada, J., Yamashita, T., Yanaihara, N., 1982. Endocrine cells in the gastrointestinal tract of the cat. Biomed. Res. 3, 612-622.

Krause, W.J., Cutts, J.H. 3rd, Cutts, J.H., Yamada, J., 1989. Immunohistochemical study of the developing endocrine pancreas of the opossum (*Didelphis virginiana*). Acta Anat. 135, 84-96.

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

Krause, W.J., Yamada, J., Cutts, J.H., 1986. Enteroendocrine cells in the developing opossum stomach. J. Anat. 148, 47-56.

Lane, B.P., Europa, D.L., 1965. Differential staining of ultrathin sections of epon-embedded tissues for light microscopy. J. Histochem. Cytochem. 13, 579-582.

Loretto, D., Vieira, M.V., 2005. The effects of reproductive and climatic seasons on movements in the black-eared opossum (*Didelphis aurita*Wied-Neuwied, 1826).J. Mammal. 86, 287-293.

MacAlester, A.L., 1994. História Geológica da vida. São Paulo: E. Blucher. 173p.

Macedo, J., Loretto, D., Vieira, M.V., Cerqueira, R., 2006. Classes de desenvolvimento em marsupiais: um método para animais vivos. Mastozool. Neotrop. 13, 133-136.

Meimaridis, D.G., Morse, D.E., Pansky, B.; Budd, G.C., 2003. Insulin immunoreactivity in the fetal and neonatal rat retina. Neurosci.Lett. 118, 116-119.

Moran, G.W., Leslie, F.C., Levison, S.E., McLaughlin, J.T., 2008. Enteroendocrine cells: Neglected players in gastrointestinal disorders? Therap. Adv. Gastroenterol. 1, 51-60.

Pfützner, A., Forst, T., 2011. Elevated intact proinsulin levels are indicative of Beta-cell dysfunction, insulin resistance, and cardiovascular risk: impact of the antidiabetic agent pioglitazone. J Diabetes Sci Technol. 1, 784-793.

Polak, J.M., Bishop, A.E.; Barbosa, A.J.A.; Bloom, S.R., 1993. Hormônios gastrointestinais. In: Dani, R., Paula Castro, L. (Eds.). Gastroenterologia Clínica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p.1446-1465.

Rehfeld, J.F., 1998. The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiol. Rev.* 78, 1087-1102.

Rindi, G., Leiter, A.B., Kopin, A.S., Bordi, C., Solcia, E., 2004. The “normal” endocrine cells of the gut changing concepts and new evidences. *Ann. NY Acad. Sci.* 1014, 1-12.

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

Samoto, V.Y., Miglino, M.A., Ambrosio, C.E., Pereira, F.T.V., Lima, M.C., Carvalho, A.F., 2006. Opossum (*Didelphis sp*) mammary gland morphology associated to the marsupial model. *Biota Neotrop.* v. 6, n. 2.

Schönhoff, S.E., Giel-Moloney, M., Leiter, A.B., 2004. Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology.* 145, 2639-2644.

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

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

Steiner, D.F., 2000. New aspects of proinsulin physiology and pathophysiology. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 13, 229-239.

Sternberger, L.A. *Immunocytochemistry*. 2a ed., New York: Ed. John Wiley & Sons, 1979.

Sternini, C., Anselmi, L., Rozengurt, E., 2008. Enteroendocrine cells: a site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 15, 73-78.

Tahir, M., Elayat, A.A., Jalalah, S., El-Naggar, M.M. 1992. Isolated pancreatic islets of the rat: an ultrastructural study. *Acta Anat.* 145, 93-100.

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

Vanner, S., 2000. Myenteric neurons activate submucosal vasodilator neurons in guinea pig ileum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, 380-387.

Yaman, M., Bayrakdar, A., Tarakci, B.G., 2012. Existence of serotonin and neuropeptides-immunoreactive endocrine cells in the small and large intestines of the mole-rats (*Spalax leucodon*). *Tissue & Cell.* 44, 257-263.

Zhang, W.J., Duan, J.Z., Lei, N., Xing, H., Shao, Y., Yang, G.B., 2012. Cellular bases for interactions between immunocytes and enteroendocrine cells in the intestinal mucosal barrier of rhesus macaques. *Cell Tissue Res.* 350, 135-141.

## CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Embora considerado um mamífero primitivo, o gambá *D. aurita* apresenta as túnicas do intestino grosso com características morfológicas gerais descritas para mamíferos eutérios.

A camada muscular circular interna em todas as porções e regiões analisadas é mais espessa em relação à camada longitudinal externa, e entre as regiões analisadas, esta camada no reto apresentou-se mais espessa que no ceco e cólon ascendente.

O número das células mucossecretoras aumentou da região do ceco em direção ao reto. Estas células apresentam mucinas neutras e ácidas, indicando que a produção de muco é mista.

As células argirófilas, argentafins e imunorreativas à insulina estão presentes em todas as regiões e porções estudadas.

Não houve diferença quantitativa entre as células endócrinas argirófilas e argentafins, enquanto as células imunorreativas à insulina foram as menos numerosas.

As células endócrinas imunorreativas à insulina são alongadas ou piramidais, com núcleo arredondado de contorno irregular, além de grande quantidade de grânulos de secreção distribuídos pelo citoplasma.

O padrão ultraestrutural dos grânulos das células imunorreativas à insulina no intestino grosso foi semelhante aos das células B de ilhotas pancreáticas.

Espera-se que esses resultados sirvam de base para pesquisas no campo das patologias digestivas, em especial, a *diabetes mellitus*, de espécies domésticos e silvestres.

Permanece ainda a necessidade de mais estudos sobre as células endócrinas imunorreativas à insulina associados com a biogênese e sequenciamento de nucleotídeos para possível obtenção de insulina natural.