

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**TESE**

**Anatomia microscópica do pâncreas e detecção de células neuroendócrinas  
imunorreativas a insulina, glucagon, somatostatina, serotonina e  
polipeptídeo pancreático de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812)  
e *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820) (Testudines, Chelidae)**

**Danielle Alcantara Vieira Lopes**

**2017**



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

**Anatomia microscópica do pâncreas e detecção de células neuroendócrinas  
imunorreativas a insulina, glucagon, somatostatina, serotonina e  
polipeptídeo pancreático de *Phrynos geoffroanus* (Schweigger, 1812)  
e *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820) (Testudines, Chelidae)**

**DANIELLE ALCANTARA VIEIRA LOPES**

*Sob orientação da Professora*

**Nadja Lima Pinheiro**

*e Co-orientação da Professora*

**Aparecida Alves do Nascimento**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em**  
**Ciências em Biologia Animal.**

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada com  
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Aa Alcantara Vieira Lopes, Danielle, 1986 Anatomia microscópica do pâncreas e detecção de células neuroendócrinas imunorreativas a insulina, glucagon, somatostatina, serotonina e polipeptídeo pancreático de *Phrynos geoffroanus* (Schweigger, 1812) e *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820) (Testudines, Chelidae) / Danielle Alcantara Vieira Lopes. - 2017.

85 f.: il.

Orientadora: Nadja Lima Pinheiro.

Coorientadora: Aparecida Alves do Nascimento.

Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Pós-graduação em Biologia Animal , 2017.

1. Répteis. 2. Histologia. 3. Imuno-histoquímica.

4. Pâncreas. I. Lima Pinheiro, Nadja, 1943-, orient. II. Alves do Nascimento, Aparecida , -, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós graduação em Biologia Animal . IV. Título.

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

**DANIELLE ALCANTARA VIEIRA LOPES**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, área de Concentração em Morfologia.

TESE APROVADA EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

---

Dra. Nadja Lima Pinheiro – UFRRJ (Orientadora)

---

Dra. Rosa Maria Marcos Mendes - UFRRJ

---

Dr. Marcos Antonio José dos Santos - UFRRJ

---

Dra. Bernadete Maria de Sousa- UFJF

---

Dr. Valdemar da Silva Costa - UERJ

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as conquistas alcançadas em minha vida e principalmente por mais esta etapa concluída, pois eu nada seria se não tivesse Ele caminhando comigo.

Aos meus pais, José Evandro Lopes Vieira e Rosiméri Alcantara Vieira, pelo voto de confiança, por verem em mim alguém capaz de derrubar obstáculos para conquistar sonhos, além de me apoiarem e transmitirem a mim todo amor e carinho.

Agradeço aos meus irmãos, Michelle Alcantara Vieira e João Vitor Alcantara Vieira, que não menos importantes, também contribuíram para o meu crescimento, através de lindos sorrisos e pequenos gestos, empurrando-me e encorajando-me a não desistir.

Ao meu marido Filipe Lopes Pereira, pela sua companhia, paciência, além de todo amor e carinho a mim dedicado.

Ao meu filho Théo Vieira Lopes que me acompanhou desde o início e que com muito carinho e a inocência de criança parecia compreender muitas vezes a minha ausência.

Aos meus mestres, que dentro de suas possibilidades tentaram ao máximo transmitir seus ensinamentos para que eu me tornasse uma boa profissional. Dentre estes destaco as professoras e amigas, Aparecida Alves do Nascimento e Nadja Lima Pinheiro, que me orientaram neste trabalho com total dedicação, sempre respondendo aos meus questionamentos e esclarecendo minhas dúvidas, fazendo-me agregar novos conhecimentos.

Aos demais docentes do Laboratório de Histologia e Embriologia da UFRRJ, os quais também me fizeram somar nesta trajetória.

Aos meus amigos, os quais caminharam ao meu lado, principalmente às estagiárias do Laboratório de histologia que cederam seu tempo e trabalho no desenvolvimento deste estudo, em especial à Adriana Ventura a qual me auxiliou na parte de imuno-histoquímica.

Ao Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), MG, o qual cedeu o material para o desenvolvimento desta pesquisa.

Não poderia me esquecer da técnica e amiga Ilza Lucas Coelho Meirelles, que com tamanha excelência, confeccionou todo o material por mim utilizado, além de também ter transmitido a mim muitos ensinamentos.

Por fim agradeço a UFRRJ, que cedeu o espaço ao meu crescimento pessoal e profissional.

Compartilho com todos e também os dedico esta explosão de felicidade na qual me encontro.

## RESUMO GERAL

VIEIRA-LOPES, Danielle Alcantara. **Anatomia microscópica do pâncreas e detecção de células neuroendócrinas imunorreativas a insulina, glucagon, somatostatina, serotonina e polipeptídeo pancreático de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) e *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1825) (Testudines, Chelidae).** 2017. 85f. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

A compreensão dos processos fisiológicos nos vertebrados é essencial para obtenção de dados sobre a biologia das espécies. O pâncreas é uma glândula mista que atua em processos digestivos e homeostáticos. Entender a morfologia e fisiologia do pâncreas em todas as classes de vertebrados é fundamental para esclarecer a função desta glândula na digestão dos alimentos, de modo a contribuir com fatores nutricionais e assim melhorar o manejo e condicionamento das espécies em seus ecossistemas. Tratando-se de espécies de quelônios brasileiros, esta atenção se redobra, uma vez que grande parte é classificada como espécie vulnerável pela IUCN (2017) devido às alterações antrópicas sofridas por seus habitats naturais. Logo, este trabalho descreve a histologia e imuno-histoquímica do pâncreas de duas espécies da família Chelidae. Para isso, o pâncreas de quatro espécimes adultos de *Phrynops geoffroanus* e quatro espécimes de *Hydromedusa maximiliani* foram fixados em formol 10% e depositados na Universidade Federal de Juiz de Fora, foram processados por técnica histológica de rotina para obtenção de cortes de 5 µm de espessura. A histologia do pâncreas das espécies *P. geoffroanus* e *H. maximiliani* é caracterizada por uma porção endócrina dispersa entre os acinos pancreáticos, formando ou não grupamentos endócrinos semelhantes a ilhotas pancreáticas. Não é observada nenhuma cápsula de tecido conjuntivo separando as ilhotas pancreáticas da porção exócrina circundante. O estudo imuno-histoquímico revelou quatro tipos de células endócrinas no pâncreas de *P. geoffroanus*, células produtoras de insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático. Na espécie *H. maximiliani* três tipos celulares foram encontrados, células produtoras de insulina, glucagon e somatostatina. A organização celular dos grupamentos endócrinos semelhantes a ilhotas pancreáticas é diferente nas duas espécies estudadas. Em *P. geoffroanus* as células produtoras de insulina posicionam-se no centro enquanto as células produtoras de glucagon ocupam a periferia. Já na espécie *H. maximiliani* os dois tipos celulares se intercalam, geralmente ao redor de vasos sanguíneos. Este estudo irá ajudar no entendimento da fisiologia digestiva da espécie investigada e fornecerá dados para análises comparativas com outros quelônios de água doce.

**Palavras chaves:** Cágados, Histologia, Imuno-histoquímica, Pâncreas.

## GENERAL ABSTRACT

VIEIRA-LOPES, Danielle Alcantara. **Microscopic anatomy of the pancreas and detection of immunoreactive neuroendocrine cells to insulin, glucagon, somatostatin, serotonin and pancreatic polypeptide of *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) and *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1825) (Testudines, Chelidae).** 2017. 85f. Thesis (Doctoral in Animal Biology). Institute of Biological and Health Sciences, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Comprehension of the physiological processes of vertebrates is essential to obtain data on the biology of the various species. The pancreas is a mixed gland that is involved in digestive and homeostatic processes. Understanding the morphology and physiology of the pancreas in all classes of vertebrates is fundamental to clarify this gland's function in the digestion of foods, to help shed light on nutritional factors that can improve the management and conditioning of species in their ecosystems. In the case of Brazilian species, this attention is particularly important, since many are classified as vulnerable by the IUCN (2017) due to anthropic alterations of their natural habitats. This article describes the histology and immunohistochemistry of the pancreas of two species of the Chelidae family. For this purpose, the pancreas of four specimens of *Phrynops geoffroanus* and four of *Hydromedusa maximiliani* that had been fixed in 10% formol and deposited in the collection of Juiz de Fora Federal University were routinely processed for histology to obtain sections with thickness of 5 µm. The histology of the pancreas of *P. geoffroanus* and *H. maximiliani* is characterized by an endocrine portion dispersed among the pancreatic acini, forming or not forming endocrine groups similar to pancreatic islets. No connective tissue capsule is observed separating the pancreatic islets from the surrounding exocrine portion. The immunohistochemical analysis revealed four types of endocrine cells in *P. geoffroanus*: cells producing insulin, glucagon, somatostatin and pancreatic polypeptide. In *H. maximiliani*, only three cell types were found, producing insulin, glucagon and somatostatin. The cellular organization of the endocrine groups similar to pancreatic islets is different in the two species. In *P. geoffroanus*, the insulin-producing cells are positioned in the center, while those producing glucagon occupy the periphery. In turn, in *H. maximiliani*, these two cell types are interspersed, generally around the blood vessels. These observations will help understand the digestive physiology of the two species and provide data for comparative analyses with other freshwater turtles.

**Keywords:** freshwater turtles, Histology, Immunohistochemistry, Pancreas.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1: Exemplar da espécie *Phrynops geoffroanus* utilizado nesse estudo, pertencente à coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG. (Fotografia de Iara A. Novelli).....22
- Figura 2: Exemplar da espécie *Hydromedusa maximiliani* utilizado nesse estudo, pertencente à coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG. (Fotografia de Iara A. Novelli).....22
- Figura 3: Representação das mensurações dos grupamentos semelhante à Ilhota pancreática (IP) das espécies pertencentes à família Chelidae usando um analisador de imagem computadorizado (Image-J software). (A) Medições dos respectivos diâmetros, maiores e menores, de um grupamento semelhante à IP do pâncreas da espécie *Hydromedusa maximiliani* (retas). (B) Linha contínua corresponde ao contorno do grupamento semelhante à IP para cálculo da área.....25

### CAPÍTULO I

- Figura 1 - Fotografia do tubo digestivo (TD) da espécie *Phrynops geoffroanus* evidenciando a posição do pâncreas lateralmente ao intestino anterior da espécie (□).....32
- Figura 2 - Fotomicrografias do pâncreas de *Phrynops geoffroanus*. Visão geral evidenciando a cápsula de tecido conjuntivo propriamente dito denso envolvendo o órgão. Porção exócrina formada por ácinos pancreáticos. Porção endócrina formada por grupamentos difusos de células (círculo). Hematoxilina-Eosina.....33
- Figura 3 - Fotomicrografias do pâncreas de *Phrynops geoffroanus*. Seta indicando grupamento difuso de células endócrinas entre os ácinos pancreáticos (□). Hematoxilina-Eosina .....33
- Figura 4 - Fotomicrografias do pâncreas de *Phrynops geoffroanus*. Evidenciação da organização do tecido conjuntivo no órgão. Tricrômico de Gomori.....34



Figura 5 - Fotomicrografias do pâncreas de <i>Phrynops geoffroanus</i> . Demonstração da distribuição de tecido conjuntivo entre as porções exócrina (ácinos) e endócrina (círculo) do pâncreas. Tricrômico de Gomori.....	35
Figura 6 - Fotomicrografias do pâncreas de <i>Phrynops geoffroanus</i> . Destaque de ducto pancreático. Tricrômico de Gomori.....	35
Figura 7 - Fotomicrografia de células IR a INS no Pâncreas de <i>Phrynops geoffroanus</i> . Células endócrinas formando aglomerados semelhantes a Ilhotas pancreáticas. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.....	38
Figura 8 - Fotomicrografia de células IR a GLUC no Pâncreas de <i>Phrynops geoffroanus</i> . Células produtoras de glucagon localizadas na porção periférica dos aglomerados celulares semelhantes a Ilhotas pancreáticas. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.....	38
Figura 9 - Fotomicrografia de células IR a GLUC no Pâncreas de <i>Phrynops geoffroanus</i> . Células endócrinas produtoras de glucagon aparentemente isoladas. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.....	39
Figura 10 - Fotomicrografia de células IR a SOM no Pâncreas de <i>Phrynops geoffroanus</i> . Células endócrinas produtoras de somatostatina localizadas na porção periférica dos aglomerados celulares semelhantes a Ilhotas pancreáticas. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.....	39
Figura 11 - Fotomicrografia de células IR a PP no Pâncreas de <i>Phrynops geoffroanus</i> . Células endócrinas isoladas. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.....	40

## CAPÍTULO II

Figura 1 - Fotografia do tubo digestivo (TD) da espécie <i>Hydromedusa maximiliani</i> evidenciando a posição do pâncreas lateralmente ao intestino anterior da espécie estudada (*)......	51
Figura 2 - Fotomicrografias do pâncreas de <i>Hydromedusa maximiliani</i> . Visão geral evidenciando porção exócrina formada por ácinos pancreáticos e porção endócrina formada	

por grupamentos difusos de células endócrinas (círculo). Setas destacando ducto pancreático. Hematoxilina-Eosina.....	52
Figura 3 - Fotomicrografias do pâncreas de <i>Hydromedusa maximiliani</i> . Setas indicando células endócrinas compondo grupamento difuso semelhante a ilhotas pancreáticas entre os ácinos. Hematoxilina-Eosina.....	52
Figura 4 - Fotomicrografias do pâncreas de <i>Hydromedusa maximiliani</i> . Setas destacando ductos pancreáticos formados por epitélio cúbico simples. Hematoxilina-Eosina.....	53
Figura 5 - Fotomicrografias do pâncreas de <i>Hydromedusa maximiliani</i> . Demonstração da distribuição de tecido conjuntivo no órgão. Setas destacando ducto pancreático. Presença de vasos sanguíneos entre os ácinos pancreáticos (vs). Tricrômico de Gomori.....	53
Figura 6 - Fotomicrografia de células IR a INS no Pâncreas de <i>Hydromedusa maximiliani</i> . Células endócrinas formando aglomerados semelhantes a Ilhotas pancreáticas. Vasos sanguíneos (vs). Contracoloração: Hematoxilina de Harris.....	56
Figura 7 - Fotomicrografia de células IR a GLUC no Pâncreas de <i>Hydromedusa maximiliani</i> . Células produtoras de glucagon compondo os aglomerados celulares semelhantes a Ilhotas pancreáticas. Vasos sanguíneos (vs). Contracoloração: Hematoxilina de Harris.....	56
Figura 8 - Fotomicrografia de células IR a SOM no Pâncreas de <i>Hydromedusa maximiliani</i> . Células endócrinas produtoras de somatostatina formando aglomerados celulares semelhantes a Ilhotas pancreáticas. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.....	57

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados do registro dos espécimes de <i>Phrynops geoffroanus</i> e <i>Hydromedusa maximiliani</i> depositados na Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da UFJF, Juiz de Fora, MG.....	23
Tabela 2 - Detalhes dos anticorpos primários usados neste estudo.....	24
Tabela 3 - Valores médios ( $\pm$ DP) de area ( $\mu\text{m}^2$ ), diâmetro maior e menor ( $\mu\text{m}$ ) dos grupamentos endócrinos nas regiões do pâncreas da espécie <i>P. geoffroanus</i> .....	40

Tabela 4 - Valores médios ( $\pm$ DP) de area ( $\mu\text{m}^2$ ), diâmetro maior e menor ( $\mu\text{m}$ ) dos grupamentos endócrinos nas regiões do pâncreas da espécie *H. maximiliani*.....55

## LISTA DE ESQUEMA

### INTRODUÇÃO GERAL

Esquema 1 - Representação do método imunoenzimático ABC - peroxidase - Complexo avidina-biotina-enzima. O complexo é formado pela ligação de uma molécula de (strept) avidina com várias de biotina associadas a uma enzima (peroxidase), que tem como função a conversão de um cromógeno incolor em um produto final, podendo conferir cor aos antígenos teciduais marcados. Fonte: [www.elmhurst.edu/~chm/vchemook/614hormone.htm](http://www.elmhurst.edu/~chm/vchemook/614hormone.htm)..... 24

### CAPÍTULO I

Esquema 1 - Esquema ilustrativo mostrando a ramificação dos ductos pancreáticos observados no parênquima do pâncreas da espécie *Phrynosops geoffroanus*. (A) Maior aumento destacando a presença de célula centroacinar no lúmen de um ácinos pancreáticos (seta). (B) Ducto intercaler (círculo) e ducto intralobular (seta) entre os ácinos pancreáticos do lóbulo. (C) Ductos interlobular observado no septo que separa em lóbulos o parênquima da glândula. HE..... 36

### CAPÍTULO II

Esquema 1: Esquema ilustrativo mostrando a ramificação dos ductos pancreáticos observados no parênquima do pâncreas da espécie *Hydromedusa maximiliani*. (A) Maior aumento destacando a presença de células centroacinares no lúmen de um ácino pancreático (seta). (B) Ductos de diâmetros distintos evidenciando o aumento gradual da camada de tecido conjuntivo que os sustenta (círculo e seta). (C) Maior aumento de um ducto pancreático mostrando a camada de tecido conjuntivo. HE. ....54

## ABREVIACOES

5-HT Serotonina

ABC – Complexo Avidina-biotina peroxidase

DP – Desvio padrão

GLUC – Glucagon

HE – Hematoxilina

INS – Insulina

IP – Ilhotas pancreáticas

IR – Imunorreativo

IUCN – The International Union for Conservation of Nature

PP – Polipeptídeo pancreático

SOM – Somatostatina

TD – Tubo digestivo

TG – Tricromico de Gomori

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

UFRRJ – Universidade federal rural do Rio de Janeiro

VS – Vaso Sanguíneo

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<i>SISTEMÁTICA DAS ESPÉCIES.....</i>	16
<i>PÂNCREAS.....</i>	<b>18</b>
Morfologia e Morfometria .....	18
Células endócrinas.....	20
<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>22</b>
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</i>	22
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<i>PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS UTILIZADOS .....</i>	22
<i>PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO .....</i>	24
<i>MÉTODO IMUNO-HISTOQUÍMICO UTILIZADO .....</i>	24
<i>OBSERVAÇÕES E FOTOMICROGRAFIAS .....</i>	25
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>27</b>
<b>Anatomia microscópica do pâncreas e detecção de células neuroendócrinas imuno-reativas a insulina, glucagon, somatostatina, serotonina e polipeptídeo pancreático no pâncreas da espécie <i>Phrynops geoffroanus</i> (Schweigger, 1812) (Testudines, Chelidae).....</b>	<b>27</b>
<b>RESUMO I.....</b>	<b>28</b>
<b>ABSTRACT I.....</b>	<b>29</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
<i>Histologia.....</i>	33
<i>Imuno-histoquímica.....</i>	38
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>46</b>

<b>Histologia do pâncreas e detecção por imunohistoquímica de células neuroendócrinas produtoras de insulina, glucagon, somatostatina, serotonina e polipeptídeo pancreático da espécie <i>Hydromedusa maximiliani</i> (Mikan, 1825) (Testudines, Chelidae).....</b>	<b>46</b>
<b>RESUMO II .....</b>	<b>47</b>
<b>ABSTRACT II .....</b>	<b>48</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>50</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
<i>Histologia</i> .....	52
<i>Imuno-histoquímica</i> .....	56
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>76</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

O pâncreas é uma glândula comum aos sistemas digestório e endócrino, a qual secreta o suco pancreático que auxilia na digestão de carboidratos, proteínas e gorduras; e produz hormônios reguladores que controlam a secreção, a absorção, a motilidade e a proliferação de células do sistema gastroenteropancreático (GEP) (RINDI *et al.*, 2004). Em humanos, a glândula é dividida em dois compartimentos distintos, com funções e morfologias diferentes: a porção exócrina é formada basicamente por estruturas denominadas ácinos pancreáticos capazes de produzir enzimas digestivas; e a porção endócrina é composta por células especializadas destinadas a produção de hormônios reguladores: célula  $\alpha$  que sintetiza glucagon (GLUC), hormônio conhecido por provocar a hiperglicemia através da glicogenólise hepática; célula  $\beta$  que produz insulina (INS), hormônio anabólico fundamental para controlar o metabolismo dos carboidratos; célula D que produz somatostatina (SOM), que tem função inibitória; e células PP produtoras de polipeptídeo pancreático (PP), hormônio que controla as secreções de ácido gástrico e enzimas, a motilidade do tubo digestivo (TD) e secreções pancreáticas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

A família Chelidae, representada pelos cágados, agrupa 58 espécies (UETZ, 2016). Entre elas as espécies *Phrynops geoffroanus* com distribuição entre o centro-oeste e nordeste do Brasil (MOURA, 2009); e a espécie *Hydromedusa maximiliani*, endêmica da Mata Atlântica (ERNEST & BARBOUR, 1989). Os integrantes desta família são animais de carapaças baixas e com patas anteriores em forma de remos, o que facilita a vida aquática (POUGH & HEISER, 2008), apresentam uma variedade de hábitos alimentares (LUZ *et al.*, 2003).

Por estar envolvido com processos digestivos e homeostáticos, estudos que se dediquem a explorar a morfologia e fisiologia do pâncreas em todas as classes de vertebrados são fundamentais para elucidar a atuação desta glândula, de modo a contribuir com fatores nutricionais e assim melhorar o manejo e condicionamento das espécies em seus ecossistemas (CASTRO *et al.*, 2003). Tratando-se de espécies de quelônios brasileiros, esta atenção se redobra, uma vez que grande parte é classificada como espécie vulnerável pela The International Union for Conservation of Nature (IUCN, 2017) devido às alterações antrópicas sofridas por seus habitats naturais.

No Brasil, criar animais selvagens visando à reintrodução dos mesmos em seu habitat natural, uma vez que este tenha sido afetado negativamente, tem sido uma alternativa para amenizar os estragos cometidos pela ação humana. Esta atividade valoriza a sustentabilidade dos recursos naturais, promovendo a prevenção da fauna nacional (SÁ *et al.*, 2004).

Entretanto, a escassez de estudos que possam agregar conhecimentos e informações acerca da produção de animais silvestres, restringe e dificulta a atividade. Havendo deficiência em abordagens mais amplas como aspectos ecológicos e evolutivos das espécies, que são primordiais em eventuais planos de conservação e manejo (SOUZA, 2004). Nesse sentido, diversos estudos têm sido conduzidos com o grupo Testudines, com o intuito de esclarecer fenômenos fisiológicos e patológicos do TD (BEREGI *et al.*, 2000, 2002 *apud* BRITO, 2007, p. 2).

Sendo assim, este estudo busca elucidar, através de técnicas histológicas e imunohistoquímicas, a morfologia e organização celular do pâncreas de quelônios pertencentes à família Chelidae, bem como observar a presença e distribuição de células neuroendócrinas produtoras de INS, GLUC, SOM, 5-HT e PP no órgão. Uma vez que os diferentes nichos ambientais levam a mudanças anatômicas e fisiológicas principalmente do sistema digestório e órgãos associados, entre e dentro das diferentes ordens de répteis (MITCHELL & DIAZ-FIGUEROA, 2005). Além disso, a busca por células endócrinas, segundo D'Este & colaboradores (1994), tem sido fundamental para estudos filogenéticos, contribuindo com dados morfológico-evolutivos.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### *Sistemática das espécies*

A ordem dos Testudines, que agrupa as tartarugas, os cágados e os jabutis, pertence à filogenia dos répteis juntamente com a ordem Lepidosauria (lagartos, serpentes, anfisbênia e tuatara) e a ordem Crocodylia (crocodilos, jacaré e gaviais). Os Testudines são únicos pelo fato de apresentarem as cinturas escapular e pélvica no interior de um casco, formado por uma parte convexa dorsal, denominada carapaça, e outra achatada ventral, denominado plastrão, coberto por escudos córneos epidérmicos.

Atualmente os Testudines são subdivididos em duas sub-ordens: Cryptodira (Grego, *crypto* = escondido, *dire* = pescoço), animais capazes de recolher a cabeça e escondê-la dentro do casco (jabutis, tartarugas marinhas e algumas tartarugas de água doce); e Pleurodira (Grego, *pleuro* = lado), indivíduos que flexionam o pescoço lateralmente, não conseguindo abrigar a cabeça no interior do casco (cágados) (POUGH & HEISER, 2008). Atualmente a ordem é formada por 14 famílias, totalizando aproximadamente, 326 espécies (UETZ, 2016). No Brasil, são encontradas 38 espécies, das quais seis são estritamente brasileiras (MOLINA, 2001; MCCORD *et al.*, 2001; COSTA & BÉRNILS, 2015).



A família Chelidae é uma representante da sub-ordem Pleurodira. São animais de carapaças baixas e com patas anteriores modificadas em forma de remos, o que se torna uma vantagem para a vida aquática, pois diminui a resistência imposta pela água ao deslocamento, potencializando assim a locomoção destes animais (POUGH & HEISER, 2008). Possuem treze escudos no plastrão, doze pares de escudos marginais e pescoço frequentemente muito longo (PRITCHARD & TREBBAU, 1984). São 15 os gêneros que fazem parte desta família, as quais agrupam 58 espécies (UETZ, 2016), destas 20 são encontradas no Brasil (BÉRNILS & COSTA, 2015).

No Brasil, o gênero *Phrynops* (WAGLER, 1830) é representado por quatro espécies: *Phrynops geoffroanus* (SCHWEIGGER, 1812), *Phrynops hilarii* (DUMÉRIL & BIBRON, 1835), *Phrynops tuberosus* (PETERS, 1870) e *Phrynops williamsi* (RHODIN & MITTERMEIER, 1983). A espécie *P. geoffroanus* (SCHWEIGGER, 1812) possui carapaça achatada e larga com coloração preta ou cinza esverdeada. O plastrão possui um entalhe anal e tem uma coloração vermelha rosada com manchas irregulares e pretas. A cabeça é larga e lisa, com coloração preta, linhas brancas e irregulares. A parte inferior é branca com linhas e pontos pretos. A característica mais proeminente dessa espécie é uma linha preta e larga que se estende longitudinalmente pelo olho. Possui também um par de “barbelas” no “queixo”, e os membros são cinza com manchas brancas. É observada com frequência em rios, lagos e lagoas de correnteza lenta (ERNEST & BARBOUR, 1989). Possui hábito diurno, expondo-se sobre margens dos rios nos picos temperaturas (MEDEM, 1960). É encontrada desde a Colômbia, Venezuela, Guiana, extremo sul do Paraguai até sudeste, centro-oeste e nordeste do Brasil (MOURA, 2009). O “Cágado de Barbicha”, nome vulgar dado à espécie, chega a medir 35 cm de comprimento, tem hábito alimentar carnívoro, consumindo peixes, crustáceos e insetos, (MEDEM, 1960), fato justificado pela morfohistologia do sistema digestório (VIEIRA-LOPES, 2013).

O cágado *P. geoffroanus* não possui importância econômica, pois não é consumido com regularidade pelo homem, devido à carne por vezes causar reações alérgicas. Mas, apesar de não ser frequentemente predada pelo homem, esta espécie tem sido afetada negativamente por mudanças em seu hábitat natural. Ao longo do Rio Guaporé, curso de água da Bacia Amazônica, no Brasil e na Bolívia, por exemplo, o desmatamento para criação de gado, além de modificar o nicho ecológico da espécie *P. geoffroanus*, interfere na reprodução, uma vez que por ação mecânica o gado destrói seus ninhos e altera seu hábitat de nidificação. Além disso, o desmatamento também provoca mudanças na oferta de alimentos da região, o que pressiona os organismos a buscar novas alternativas, como o lagarto *Tupinambis teguxin* que

aumentou a predação aos ovos de *P. geoffroanus* (SCHNEIDER *et al.*, 2011). Em outras cidades brasileiras é a poluição a causa das alterações no ambiente utilizado pela espécie. Um estudo realizado por Souza & Abe (2000) registrou espécimes de *P. geoffroanus* em rios poluídos, incluindo o Rio Preto e alguns de seus afluentes (Bacia Rio Grande, SP).

A espécie *H. maximiliani* (MIKAN, 1825), vulgarmente conhecido como tartaruga-pescoço-de-cobra é uma espécie endêmica da Mata Atlântica (ERNEST & BARBOUR, 1989), que tem distribuição geográfica desde a Bahia (ARGÔLO & FREITAS, 2002), São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo (ERNEST & BARBOUR, 1989; SOUZA *et al.*, 2003) até Minas Gerais (MOREIRA, 1994; CHAGAS & RAPOSO-FILHO, 1999; NOVELLI *et al.*, 2013; SOUZA *et al.* 2013; ROCHA-BARBOSA *et al.*, 2014). Habita preferencialmente riachos de águas claras, arenosos e rochosos, com margens cobertas por floresta preservada (IVERSON, 1992; ARGÔLO & FREITAS, 2002; SOUZA, 2005; SOUZA & MARTINS, 2009). Possui maior atividade durante períodos chuvosos (SOUZA & ABE 1997). Cágado de hábito alimentar carnívoro, alimentando-se de larvas de insetos, crustáceos, anelídeos, aranhas, anfíbios, lagartos e carniça (YASHIMITA, 1990; GUIX *et al.*, 1992; NOVELLI *et al.*, 2013). As características morfológicas mais marcantes da espécie são: carapaça oval com dorso de coloração marrom escura a cinza-oliva, laterais e região ventral do corpo de coloração creme; Presença de uma quilha baixa mediana na forma de protuberâncias posteriores nas vertebrais 1-4 e como protuberâncias anteriores na quinta vértebra (NOVELLI, 2011). Esta espécie encontra-se, atualmente, na lista de vulnerabilidade da IUCN (2017). Esta ameaça à espécie é devida a perda de seu hábitat natural ocasionada pelo desmatamento das margens dos rios, o assoreamento do leito, poluição e envenenamento resultado do despejo de lixo industrial e doméstico e de produtos agroquímicos (RODRIGUES *et.al.*, 2005).

## ***Pâncreas***

### **Morfologia e Morfometria**

O pâncreas é uma glândula mista com funções endócrinas e exócrinas importante para o metabolismo dos nutrientes absorvidos no processo de digestão. Durante o desenvolvimento embrionário, este órgão surge a partir de dois brotamentos endodérmicos na porção caudal do intestino anterior, um broto dorsal (maior) e outro broto ventral (menor). O broto ventral forma a parte inferior da cabeça e o processo uncinado do pâncreas e o restante da glândula é produto do broto dorsal. (GARCIA & FERNÁNDEZ, 2012).

Em humanos, é um órgão de coloração amarelada, dividido em cabeça, processo uncinado, corpo e cauda (NAGAI, 2003), e envolto por uma delgada cápsula de tecido conjuntivo, que emite septos para dentro do órgão, formando lóbulos (FALKMER, 1995; SLACK, 1995; FRIESS *et al.*, 1996).

A porção exócrina é responsável pela produção de enzimas e pré-enzimas digestivas, como o tripsinogênio, quimiotripsinogênio, proteinases, carboxipeptidase, nucleases, lipase, fosfolipase, elastase e amilase, as quais são armazenadas nos ácinos pancreáticos, estruturas constituídas por células serosas que se agrupam formando um lúmen central (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Os ductos pancreáticos são finos canais que se encarregam de levar as secreções da porção exócrina até o duodeno durante a digestão. (MOORE & PERSAUD, 1998).

A porção endócrina desempenha um papel importante na síntese de hormônios reguladores produzidos por células especializadas:  $\alpha$  (GLUC),  $\beta$  (INS), D (SOM) e PP (PP). A porção endócrina está organizada em estruturas denominadas ilhotas de Langerhans ou pancreáticas inseridas no parênquima da glândula, entremeadas nos ácinos pancreáticos, em geral próximo a capilares sanguíneos (FALKMER, 1995). As ilhotas pancreáticas estão distribuídas ao longo do parênquima do pâncreas, embora alguns estudos apontem uma maior concentração desta estrutura nas regiões da cauda e outros na região da cabeça (WITTINGEN & FREY, 1974; MUKAI, 1983).

A organização das células endócrinas varia entre as espécies, principalmente se forem de classes diferentes. No pâncreas de humanos e de ratos, por exemplo, as células  $\beta$  ocupam o centro das ilhotas pancreáticas, enquanto que as células  $\alpha$ , D e PP localizam-se na periferia (GOLDSMITH *et al.*, 1975; NAKAMURA *et al.*, 1980). Em cães, dois tipos de ilhotas são observadas: ilhotas com mais de um tipo de célula endócrina; e ilhotas com apenas células  $\beta$  (GOVENDIR *et al.*, 1999). Em macacos (JONES *et al.*, 1980) e cavalos (HELMSTAEDTER *et al.*, 1976; ITO *et al.*, 1978; FURUOKA *et al.*, 1989) as células  $\alpha$  estão localizadas no centro, enquanto que as outras posicionam-se na periferia. Já em cobras, as células  $\alpha$  e  $\beta$  estão localizadas centralmente e as D e PP estão na periferia (RHOTEN, 1984).

Alguns estudos dedicados a investigar a morfologia e organização celular do pâncreas já foram realizados com espécies de répteis. Pelo menos quatro tipos celulares são observados: células  $\alpha$ , células  $\beta$ , células D e células PP (RHOTEN, 1984; AGULLEIRO *et al.*, 1985; GARCIA AYALA *et al.*, 1987, 1989; PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989; PUTTI *et al.*, 1991a, b, c, 1992, 1996; DELLA ROSSA & PUTTI, 1995; LOZANO, 2000). Mudanças estacionais da morfologia e atividade pancreática também já foram observadas em espécies

pertencentes a esta classe (AGID *et al.*, 1961; GODET *et al.*, 1983, 1984; GARCIA AYALA *et al.*, 1987, 1989).

### **Células endócrinas**

As células endócrinas do sistema GEP, por possuírem características similares às de neurônios (POLAK, 1993), acreditou-se ter origem ectoderma, sendo derivadas da crista neural (PEARSE, 1969; FUJITA & KOBAYASHI, 1977; POLAK, 1993), uma vez que alguns de seus mensageiros químicos são encontrados também no sistema nervoso, como por exemplo, a substância P, serotonina, colecistoquinina, somatostatina, dentre outros (FUJITA & KOBAYASHI, 1977). No entanto, alguns estudos têm sido contrários a esta origem ectodérmica, devido algumas destas células não serem capazes de metabolizar aminas. Além disso, alguns indícios apontam que estas células surgem de células-tronco capazes de se diferenciar e dar origem também às células calciformes, aos enterócitos e às células de Paneth, sendo derivadas, então, do endoderma (SANTOS & ZUCOLOTO, 1996; RINDI *et al.*, 1999; MUTOH, 2000; YANG *et al.*, 2001; HASSAN & SHAFI, 2002; MONTUEGA *et al.*, 2003; PUZYREV *et al.*, 2003; RINDI *et al.*, 2004; SCHONHOFF *et al.*, 2004).

As células endócrinas têm como principal função sintetizar hormônios reguladores que controlam a secreção, a absorção, a motilidade, a proliferação de células do sistema GEP (RINDI *et al.*, 2004), além de operarem na manutenção da homeostase do organismo. As principais funções das células endócrinas investigadas no presente estudo estão discriminadas abaixo:

**Insulina** (INS) – a INS é um hormônio anabólico fundamental para o controle da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. Produzido pelas células  $\beta$ , regula a variação de glicose por meio da redução da produção hepática (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e também ampliando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. Este peptídeo também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação protéica (CARVALHEIRA *et al.*, 2002).

**Glucagon** (GLUC) - É um hormônio polipeptídico sintetizado pelas células  $\alpha$  do pâncreas e também por células dispersas no TD. Os principais fatores que estimulam a secreção de GLUC é a baixa concentração de glicose sanguínea, a ingestão de proteína e exercício físico (ALLEN, 1987; CUNNINGHAM, 1993). O sistema nervoso autônomo e vários hormônios gastrointestinais regulam a secreção do GLUC (SMITH *et al.*, 1988). A somatostatina, a insulina, a secretina, ácidos graxos e corpos cetônicos inibem a secreção de

GLUC, enquanto que a colecistoquinina e a gastrina aumentam (GANONG, 1998). De acordo com Foa *et al.*, (1957), uma das ações mais relevantes do GLUC, é o aumento da glicemia, por meio da glicogenólise hepática, mas este hormônio possui outras ações biológicas, tais como estimular a secreção de INS e de SOM, e também a lipólise e a cetogênese.

**Somatostatina (SOM)** - A SOM, sintetizada pelas células D, é considerada um pan-inibidor, pois age inibindo a secreção de outros hormônios, como INS e GLUC no pâncreas, bem como hormônios gastrointestinais como gastrina, colecistoquinina, secretina, polipeptídeo pancreático, enteroglucagon e motilina (TWEDT, 1987). A SOM também inibe a secreção de ácido gástrico, a motilidade gástrica e duodenal, a secreção pancreática exócrina, a contração da vesícula biliar e a absorção de nutrientes (GANONG, 1998). Elevadas concentrações de SOM são encontradas no pâncreas, estômago e duodeno (ARIMURA *et al.*, 1975). A secreção de SOM é incitada pela acidez no interior do estômago, de glicose, aminoácidos e gordura no intestino, além dos hormônios colecistoquinina e do GLUC pancreático (ALLEN, 1987; DICKSON, 1996).

**Serotonina (5-HT)** - Também conhecido como 5-hidroxitriptamina, é um neurotransmissor produzido por neurônios serotoninérgicos do Sistema Nervoso Central e por células do Sistema Neuroendócrino distribuídas no tubo digestivo, as quais produzem mais de 90% da serotonina do corpo (AHLMAN & NILSSON, 2001). Este hormônio tem ação moduladora geral da conduta afetiva associada a ações sobre cognição e comportamentos homeostáticos. Regula o humor, o sono, a atividade sexual, o apetite, o ritmo circadiano, as funções neuroendócrinas e autonômicas, a temperatura corporal, a sensibilidade à dor, a atividade motora, as funções cognitivas (RESNICK *et al.*, 1961). É secretada em resposta a estímulos no lume duodenal, como acidificação, instilação de glicose hipertônica ou solução de sacarose, estimulação vagal, aumento da pressão intraluminal, obstrução mecânica do intestino e isquemia intestinal (LI *et al.*, 2000). A 5-HT estimula a contração da musculatura lisa do aparelho gastroentérico e provocar a secreção exócrina (CECCARELLI *et al.*, 1995), além de estimular os neurônios mioentéricos promovendo respostas vasodilatadoras na submucosa (VANNER, 2000).

**Polipeptídeo pancreático (PP)** - De acordo com Smith & colaboradores (1988), o PP é observado em células acinares e células das ilhotas pancreáticas (células PP). A secreção de PP é estimulada pelos hormônios colecistoquinina, gastrina e secretina, e também pelo nervo vago. Este atua na musculatura do tubo digestivo estimulando o esvaziamento gástrico (RODRIGUES *et al.*, 2005). Os níveis de PP aumentam após a alimentação, a ingestão de proteínas, o jejum, o exercício e a hipoglicemia, sendo inibida pela SOM e glicose intravenosa

(GANONG, 1998). Este hormônio controla as secreções de ácido gástrico e enzimas, a motilidade do tubo digestivo e as secreções pancreáticas (RODRIGUES *et.al.*, 2005).

## **OBJETIVO GERAL**

Os conhecimentos morfológicos do sistema GEP da maioria dos Testudines, principalmente das espécies que ocorrem no Brasil são escassos. Visando ampliar esta linha de pesquisa, o atual trabalho objetiva comparar através de técnicas histológicas, a morfologia e organização da porção endócrina e exócrina do pâncreas de duas espécies de quelônios da família Chelidae. Bem como evidenciar a produção hormonal da glândula a partir de técnicas de imuno-histoquímica.

### ***Objetivos Específicos***

- Analisar a histologia do pâncreas de duas espécies pertencentes à família Chelidae: *P. geoffroanus* e *H. maximiliani*.
- Verificar a presença e distribuição de células neuroendócrinas produtoras de insulina (INS), glucagon (GLUC), polipeptídeo pancreático (PP), somatostatina (SOM) e serotonina (5-HT) no pâncreas destas mesmas espécies.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Procedência dos Animais Utilizados***

No presente estudo foram analisados quatro espécimes adultos de *P. geoffroanus* (Figura 1) e quatro espécimes de *H. maximiliani* (Figura 2) que se encontravam acondicionados em meio líquido (formol 10%) e depositados na Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), MG (Tabela 1).



**Figura 1:** Exemplar da espécie *Phrynops geoffroanus* utilizado nesse estudo, pertencente à coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG. (Fotografia de Iara A. Novelli).



**Figura 2:** Exemplares da espécie *Hydromedusa maximiliani* utilizado nesse estudo, pertencente à coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG. (Fotografia de Iara A. Novelli).

**Tabela 1** - Dados do registro dos espécimes de *Phrynops geoffroanus* e *Hydromedusa maximiliani* depositados na Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da UFJF, Juiz de Fora, MG.

Nº de tombo	Espécie	Sexo	Procedência
565	<i>Phrynops geoffroanus</i>	Macho	Museu Mariano Procópio
567	<i>Phrynops geoffroanus</i>	Macho	Museu Mariano Procópio
568	<i>Phrynops geoffroanus</i>	Fêmea	Museu Mariano Procópio
570	<i>Phrynops geoffroanus</i>	Macho	Museu Mariano Procópio
509	<i>Hydromedusa maximiliani</i>	Macho	Fazenda Experimental de Água Lima EMBRAPA CNPGL- Coronel Pacheco
510	<i>Hydromedusa maximiliani</i>	Macho	Fazenda Experimental de Água Lima EMBRAPA CNPGL- Coronel Pacheco
511	<i>Hydromedusa maximiliani</i>	Macho	Fazenda Experimental de Água Lima EMBRAPA CNPGL- Coronel Pacheco
512	<i>Hydromedusa maximiliani</i>	Fêmea	Fazenda Experimental de Água Lima EMBRAPA CNPGL- Coronel Pacheco

**P**

### ***rocessamento Histológico***

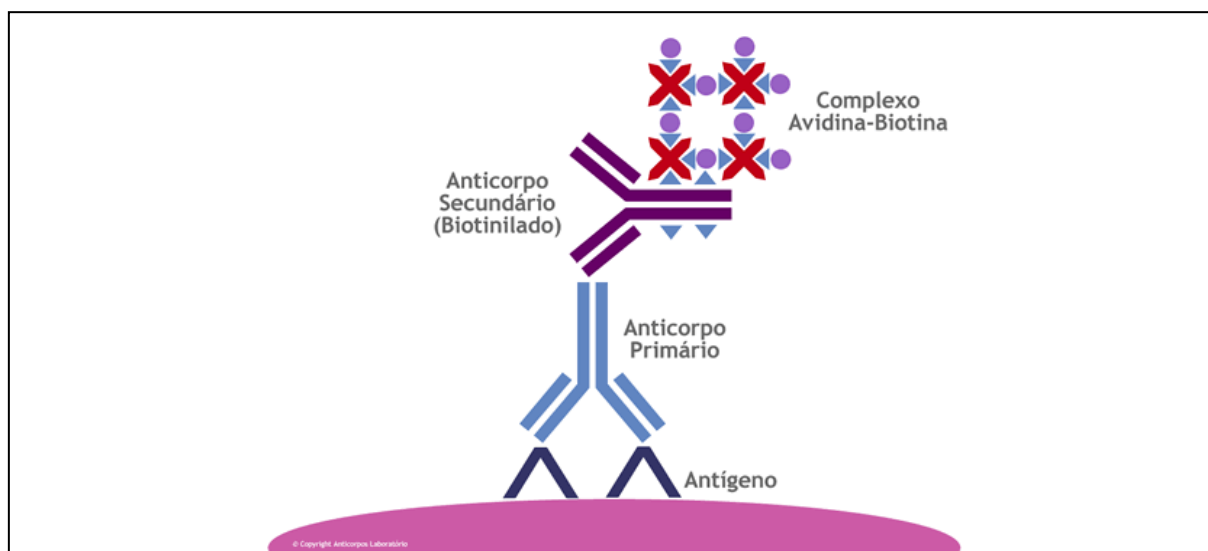
No Laboratório de Histologia e Embriologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), o pâncreas de cada espécime foi dividido em duas porções: região duodenal e região esplênica, as quais foram clivadas em cortes seriados transversais e longitudinais e posteriormente processados por técnica histológica de rotina: desidratação (em uma série de concentração crescente de etanol de 70° GL a 100° GL), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina para obtenção de cortes histológicos de 5 µm de espessura em micrótomo. As lâminas foram submetidas a colorações de rotina pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE), para observação da arquitetura tecidual; e Tricrômico de Gomori (TG), para visualização diferencial de colágeno e fibras musculares.

### ***Método Imuno-histoquímico Utilizado***

O complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) foi o método aplicado neste trabalho. Nesta técnica são usados três reagentes: Um anticorpo primário, que se liga ao receptor do hormônio específico, o qual se deseja evidenciar; Um anticorpo secundário, que é produzido ligado a uma molécula da vitamina biotina (C) e que se une aos receptores do anticorpo primário; e o complexo de glicoproteínas - Avidina pronta a partir da biotina e peroxidase - (AB), que se liga ao reagente anterior, o anticorpo secundário (Esquema 1). O protocolo contendo as etapas do processo foi anexado ao final deste trabalho (Anexo A).



Neste estudo imuno-histoquímico os cortes histológicos foram submetidos às etapas de processamento de rotina da técnica de imuno-histoquímica, entre as quais inclui-se a incubação com os anticorpos específicos listados na Tabela 2.



**Esquema 1.** Representação do método imunoenzimático ABC - peroxidase - **Complexo avidina-biotina-enzima**. O complexo é formado pela ligação de uma molécula de (strept) avidina com várias de biotina associadas a uma enzima (peroxidase), que tem como função a conversão de um  **Cromógeno** incolor em um produto final que pode conferir cor aos antígenos teciduais marcados. Fonte: [www.elmhurst.edu/~chmvchemook614hormone.htm](http://www.elmhurst.edu/~chmvchemook614hormone.htm).

**Tabela 2** - Detalhes dos anticorpos primários usados neste estudo.

Anticorpos primários	Doador	Código	Diluição	Laboratório
Insulina (INS)	rato	I2018	1:1.000	Sigma-Aldrich, Inc. USA
Glucagon (GLUC)	rato	G2654	1:2.000	Sigma-Aldrich, Inc. USA
Somatostatina (SOM)	coelho	A566	1:300	Dako Corp., CA, USA
Serotonina (5HT)	coelho	S5545	1:8.000	Sigma-Aldrich, Inc. USA
Polipeptídeo Pancreático (PP)	coelho	RP030	1:25	Diagnostic Biosystems, Inc. CA, USA

### **Observações e Fotomicrografias**

Todas os cortes foram observadas e fotografadas com auxílio do microscópio Olympus BX41 e câmera digital Sony Cybershot DSCW 230. Para cada espécime analisado, foram capturadas fotomicrografias de ilhotas pancreáticas de três cortes distintos de cada região do pâncreas. De cada corte, foram feitas mensurações semi-automática da área, dos diâmetros maiores e menores das ilhotas pancreáticas (Figura 3), no aumento de 400X, usando um analisador de imagem computadorizado (Image-J software) com o cálculo da média  $\pm$  SD (desvio padrão) por unidade de área (mm<sup>2</sup>). Foi definido como ilhota pancreática

um conglomerado de células, composto por no mínimo quatro células. A frequência relativa de células endócrinas foi avaliada para cada anticorpo, de maneira semi-quantitativa, e classificada em: imunorreatividade ausente (-) ou discreta (+), média (++) acentuada (+++).



**Figura 3:** Representação das mensurações dos grupamentos semelhante à Ilhota pancreática (IP) das espécies pertencentes à família Chelidae usando um analisador de imagem computadorizado (Image-J software). (A) Medições dos respectivos diâmetros, maiores e menores, de um grupamento semelhante à IP do pâncreas da espécie *Hydromedusa maximiliani* (retas). (B) Linha contínua corresponde ao contorno do grupamento semelhante à IP para cálculo da área.

## CAPÍTULO I

**Anatomia microscópica do pâncreas e detecção de células neuroendócrinas imunorreativas a insulina, glucagon, somatostatina, serotonina e polipeptídeo pancreático na espécie *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines, Chelidae)**

## RESUMO I

VIEIRA-LOPES, Danielle Alcantara. **Anatomia microscópica do pâncreas e detecção de células neuroendócrinas imunorreativas a insulina, glucagon, somatostatina, serotonina e polipeptídeo pancreático na espécie *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines, Chelidae) 2017.** 85f. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Este trabalho visa investigar, através de métodos histológicos e imuno-histoquímico a morfologia e organização de células neuroendócrinas produtoras de insulina (INS), glucagon (GLUC), somatostatina (SOM), serotonina (5-HT) e polipeptídeo pancreático (PP) no pâncreas da espécie *Phrynops geoffroanus*. Para isso, quatro espécimes de *P. geoffroanus*, fixados em formol 10% e depositados na Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Juiz de Fora, foram processados por técnica histológica de rotina para obtenção de cortes de 5 µm de espessura. Utilizou-se para detecção de células endócrinas o método imuno-histoquímico Avidina-biotina peroxidase (ABC) com anticorpos específicos para cada hormônio investigado. Posteriormente, os cortes foram contracolorados pela hematoxilina de Harris para melhor visualização ao microscópio de luz. Histologicamente, o ácino é a unidade histológica funcional da porção exócrina do pâncreas, composta por células serosas de formato piramidal, núcleo esférico localizado perifericamente e citoplasma com grânulos de zimogênios. Ao contrário dos mamíferos, não foi observado tecido conjuntivo distinto separando em ilhotas pancreáticas a porção endócrina da porção exócrina circundante. A porção endócrina do órgão se organiza em grupamentos difusamente distribuídos entre os ácinos pancreáticos, formados por células poligonais ou arredondadas, com núcleo esférico localizado centralmente. Células endócrinas aparentemente isoladas também são observadas. Em *P. geoffroanus* as células  $\beta$  posicionam-se no centro, enquanto as células  $\alpha$  ocupam a periferia dos grupamentos endócrinos. As células D são visualizadas na periferia dos grupamentos celulares ou aparentemente isoladas no parênquima da glândula. Células PP são encontradas apenas distribuídas isoladamente no órgão. Não são observadas células produtoras de 5-HT, nas porções endócrinas e exócrinas. A busca por células endócrinas, segundo D'Este & colaboradores (1994), tem sido fundamental para estudos filogenéticos. Este estudo é fundamental no entendimento da fisiologia digestiva da espécie investigada e fornecerá dados para análises comparativas com outros quelônios.

**Palavras chaves:** *Quelônios, Histologia, Imuno-histoquímica, células endócrinas.*

## ABSTRACT I

VIEIRA-LOPES, Danielle Alcantara. **Microscopic anatomy of the pancreas and detection of immunoreactive neuroendocrine cells to insulin, glucagon, somatostatin, serotonin and pancreatic polypeptide in the turtle *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines, Chelidae)** 2017. 85f. Thesis (Doctorate in Animal Biology). Institute of Biological and Health Sciences, Department of Animal Biology, Rio de Janeiro Federal Rural University, Seropédica, RJ, 2017.

This study investigated, through histologic and immunohistochemical methods, the morphology and organization of neuroendocrine cells producing insulin (INS), glucagon (GLUC), somatostatin (SOM), serotonin (5-HT) and pancreatic polypeptide (PP) in the pancreas of the turtle *Phrynops geoffroanus*. For this purpose, the pancreas of four specimens of *P. geoffroanus*, fixed in 1% formol and deposited in the herpetology collection of Juiz de Fora Federal University, were routinely processed for histology to obtain sections with thickness of 5  $\mu\text{m}$ . The avidin-biotin peroxidase (ABC) method with specific antibodies for each hormone investigated was used to detect the endocrine cells. The sections were counterstained with Harris hematoxylin for better visualization under a light microscope. Histologically, the acinus is the functional histological unit of the exocrine portion of the pancreas, composed of pyramidal serous cells with spherical nuclei located in the periphery and an acidophilic cytoplasm, due to zymogen granules. Unlike in mammals, no distinct connective tissue was observed separating the pancreatic islets from the surrounding exocrine portion. The endocrine portion of the organ is organized in groups diffusely distributed among the pancreatic acini, formed by polygonal or rounded cells, with spherical nuclei located centrally and weakly acidophilic cytoplasm. Apparently isolated endocrine cells were also observed. In *P. geoffroanus*, the  $\beta$  cells are positioned in the center, while the  $\alpha$  cells occupy the periphery of the endocrine groups. The D cells are visualized in the periphery of the cell groups or apparently isolated in the glands parenchyma. PP cells are only found distributed sparsely in the organ. No cells producing 5-HT were observed in the endocrine and exocrine portions. The search for endocrine cells, according to D'Este et al (1994), has been fundamental for phylogenetic studies. This study provides important information to understand the digestive physiology of this species and will supply data for comparative analysis with other turtles.

**Keywords:** *Turtles, Histology, Immunohistochemistry, Endocrine cells.*

## INTRODUÇÃO

O pâncreas é um importante órgão endócrino que tem sido extensivamente estudado, tanto em nível de conhecimento da sua morfologia e organização, já que a investigação por células endócrinas gastroenteropancreáticas (GEP) é considerada uma parte importante dos estudos filogenéticos (D'ESTE *et al.*, 1994), quanto à nível patológico, uma vez que estudos comparativos podem elucidar sinais celulares que regulam a proliferação e função de células endócrinas, informações que podem conduzir a novas abordagens para o tratamento da diabetes (JANSSON & SANDLER, 1988; STEINER *et al.*, 2010).

Os estudos realizados com répteis mostraram que pelo menos quatro tipos de células endócrinas são encontradas no pâncreas: células  $\alpha$  produtoras de GLUC, células  $\beta$  produtoras de INS, células D produtoras de SOM e células PP produtoras de PP (RHOTEN, 1984; AGULLEIRO *et al.*, 1985; GARCIA AYALA *et al.*, 1987, 1989; PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989; PUTTI *et al.*, 1991a, b, c, 1992, 1996; DELLA ROSSA & PUTTI, 1995; LOZANO, 2000). Mas divergências são observadas quanto a organização destas células no parênquima do órgão (FALKMER & PATENT, 1972; EPPLE & BRINN, 1975; FALKMER & OSTBERG, 1977).

*Phrynops geoffroanus* (SCHWEIGGER, 1812) (Testudines, Chelidae) é uma espécie conhecida popularmente por cágado-de-barbicha. Quelônio onívoro, consumidor de sementes, frutos, peixes e insetos (MEDEM, 1960; FACHÍN-TERÁN *et al.*, 1995), de hábito diurno, expondo-se durante as horas de sol nas margens e em pedras e troncos emersos nos rios, remansos e lagoas (MEDEM, 1960; MONTEIRO & DIEFENBACH, 1987; SOUZA & ABE, 1999). Possui ampla distribuição geográfica, encontrado desde a Colômbia, Venezuela, Guiana, extremo sul do Paraguai até sudeste, centro-oeste e nordeste do Brasil (ERNEST & BARBOUR, 1989), sendo frequentemente encontrada em áreas alteradas pela ação antrópica (SOUZA & ABE, 2000; RIBAS & MONTEIRO FILHO, 2002). Apesar da ampla distribuição geográfica, são escassas as informações a respeito da história natural desta espécie (LISBOA *et al.*, 2004). Os dados sobre a biologia e a ecologia deste cágado são produtos de estudos com animais mantidos em cativeiro (MOLINA, 1992a, b, 1996a, b, 1998; GUIX *et al.*, 1989, LISBOA *et al.*, 2004).

O objetivo deste trabalho é analisar, por imuno-histoquímica, o pâncreas de *P. geoffroanus*, localizando as células produtoras de INS, GLUC, SOM, 5-HT e PP por células endócrinas de modo a avaliar a organização, a presença e a distribuição destas células,

possibilitando uma futura comparação com outras espécies para maior compreensão dos aspectos evolutivos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram analisados quatro espécimes de *P. geoffroanus* (Tabela 1) que se encontravam acondicionados em meio líquido (formol 10%) e depositados na Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), MG. No Laboratório de Histologia e Embriologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), o pâncreas de cada espécime foi dividido em duas porções: região duodenal e região esplênica, as quais foram clivadas em cortes seriados transversais e longitudinais e posteriormente processados por técnica histológica de rotina: desidratação (em uma série de concentração crescente de etanol de 70° GL a 100° GL), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina para obtenção de cortes histológicos de 5 µm de espessura em micrótomo. Para análise da microscopia do órgão as lâminas com os fragmentos foram coradas pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE), para análise da arquitetura tecidual e Tricrômico de Gomori (TG), para visualização diferencial de colágeno e fibras musculares. Lâminas previamente tratadas com Poli-L-lisina 0.1% (Sigma Chemical Co., Saint Quentin Fallavier, France) foram utilizadas para o processamento imuno-histoquímico dos fragmentos. Os cortes desparafinados e hidratados foram incubados em tampão citrato (pH 6,0 – 0,01M) e aquecimento por 15 minutos em forno microondas para efetivar a recuperação antigênica dos tecidos. Posteriormente, bloqueou-se a enzima peroxidase endógena pela incubação em uma solução de peróxido de hidrogênio a 3 % em metanol durante 15 minutos. Feito o bloqueio, as lâminas foram armazenadas em câmara úmida a temperatura ambiente e tratadas com soro normal por 30 minutos. Em seguida, as seções foram incubadas por 1 hora com os seguintes anticorpos primários: rato anti-insulina (Sigma-Aldrich, Inc. USA - I2018) 1:1.000; rato anti-glucagon (Sigma-Aldrich, Inc. USA - G2654) 1:2.000; coelho anti-somatostatina (Dako Corp., CA, USA - A566) 1:300; coelho anti-serotonina (Sigma-Aldrich, Inc. USA - S5545) 1:8.000; coelho anti-polipeptídeo pancreático (Diagnostic Biosystems, Inc. CA, USA - RP030) 1:25. Depois foram tratadas com anticorpo biotilado “universal” secundário diluído a 1: 200 durante 30 minutos, logo após com complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC), diluído a 1: 200, por mais 30 minutos (ambos da PK 6200, Vector Laboratories, Inc., EUA). A revelação foi feita por reação com Diaminobenzidina (DAB) (Diagnostic Biosystems, Inc., EUA, cod. K 047). Todas as diluições foram feitas com um diluente específico (Antibody Diluent - Spring Bioscience, cod. ADS-125) e para as lavagens entre fases utilizou-se tampão

PBS (pH 7,4). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris, desidratadas em séries de concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e montadas com entelan (Merck e Co., EUA). Para garantir a especificidade das reações, controles positivos e negativos foram utilizados. Por substituição do anticorpo primário com soro não imune o controle negativo foi definido. Os controles positivos foram produzidos usando cortes de tecido para cada anticorpo respectivo, conforme indicado na bula do produto.

Todas as lâminas foram observadas e fotografadas com auxílio do microscópio Olympus BX41 e câmera digital Sony Cybershot DSCW 230. Para cada espécime analisado, foram capturadas fotomicrografias de ilhotas pancreáticas de três cortes distintos de cada região do pâncreas. De cada corte, foram feitas mensurações semi-automática da área, dos diâmetros maiores e menores das ilhotas pancreáticas, no aumento de 400X, usando um analisador de imagem computadorizado (Image-J software) com o cálculo da média  $\pm$  SD (desvio padrão) por unidade de área ( $\text{mm}^2$ ). Foi definido como ilhota pancreática um conglomerado de células, composto por no mínimo quatro células. A frequência relativa de células endócrinas foi avaliadas para cada anticorpo, de maneira semi-quantitativa, e classificada em: imunorreatividade ausente (-) ou discreta (+), média (+ +) acentuada (+ + +).

## **RESULTADOS**

Anatomicamente, o pâncreas da espécie *P. geoffroanus* é compacto, de cor acastanhada, posicionado lateralmente ao intestino anterior (Figura 1), dividido em duas regiões: região duodenal e região esplênica. O órgão é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, a qual por vezes envia septos para o interior do órgão separando-o em lóbulos. Histologicamente, se observam duas porções diferenciadas quanto à morfologia e função no órgão: uma porção exócrina, a qual sintetiza enzimas digestivas a serem lançadas no interior do intestino anterior do animal; e uma porção endócrina, cuja função é produzir hormônios que atuam na manutenção da homeostase.

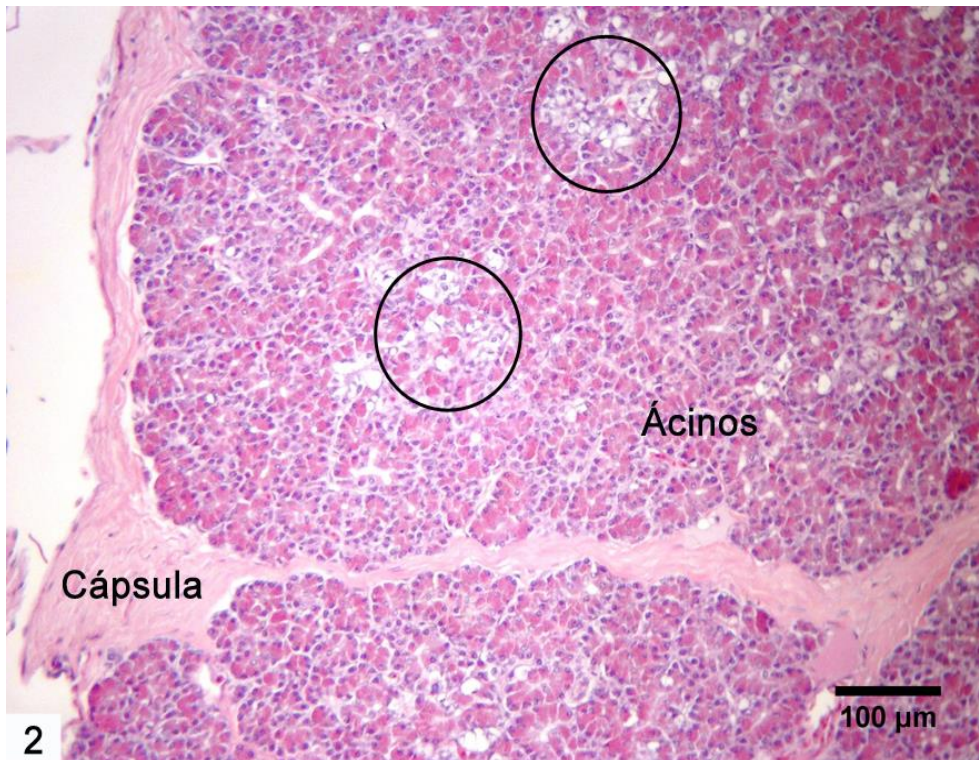




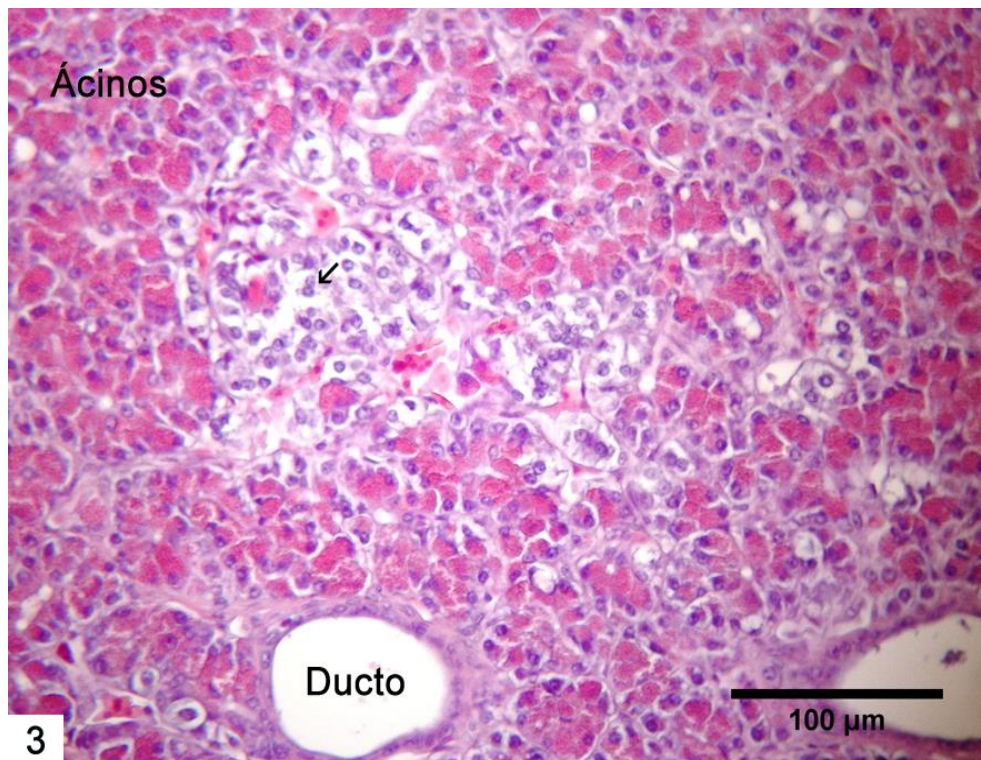
**Figura 1** - Fotografia do tubo digestivo (TD) da espécie *Phrynops geoffroanus* evidenciando a posição do pâncreas lateralmente ao intestino anterior da espécie estudada (↓).

### ***Histologia***

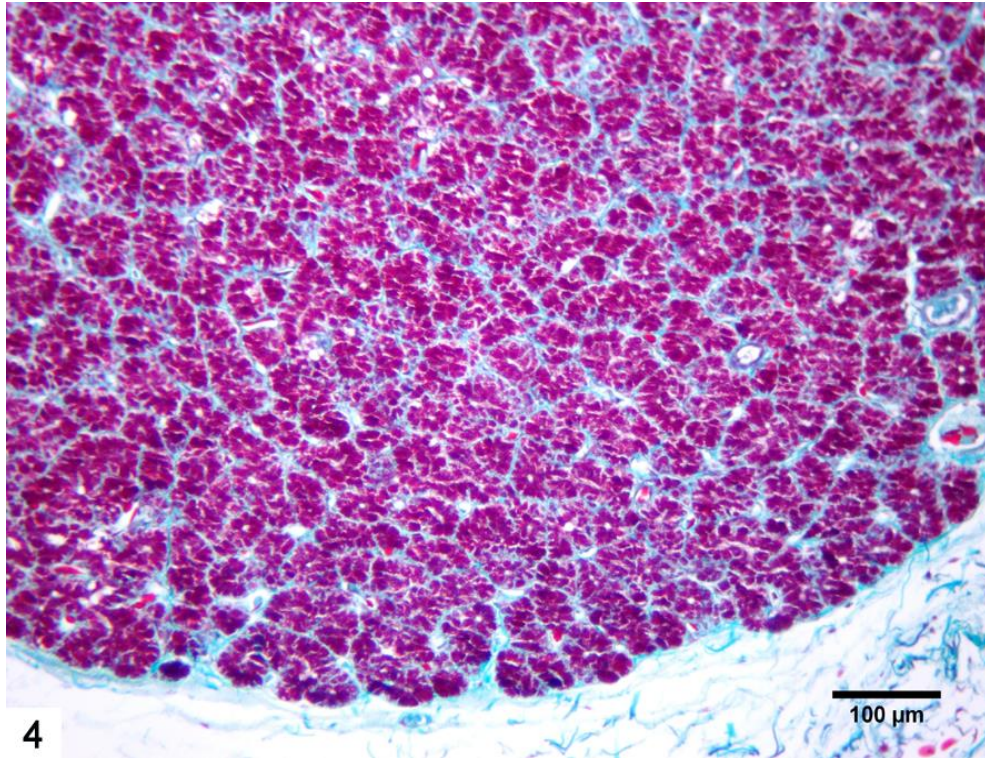
O ácino pancreático é a unidade funcional da porção exócrina do pâncreas, composta por células serosas de formato piramidal, com núcleo esférico localizado perifericamente e citoplasma com grânulos de zimogênios (Figuras 2 e 3). Ductos pancreáticos são observados no parênquima da glândula (Figuras 3 e 6). Ductos menores denominados ductos intercalares convergem formando os ductos intralobulares que por sua vez unem-se formando os ductos interlobulares encontrados nos septos que separam em lóbulos o parênquima da glândula. Os ductos intercalares são formados por epitélio simples cúbico, que se torna epitélio estratificado cúbico nos ductos maiores. De acordo com o aumento de tamanho dos ductos a camada de tecido conjuntivo que reveste os ductos aumenta progressivamente. Células centroacinares são observadas no centro dos ácinos pancreáticos. São células claras, cubóides com núcleos pálidos e citoplasma escasso (Esquema 1). A porção endócrina do órgão encontra-se organizada em grupamentos difusamente distribuídos entre os ácinos pancreáticos. Foi definido como ilhota pancreática um conglomerado de células, composto por no mínimo quatro células poligonais ou arredondadas, com núcleo esférico localizado centralmente (Figuras 2 e 3). Não foi observado tecido conjuntivo distinto separando as ilhotas pancreáticas da porção exócrina circundante pelas técnicas histológicas utilizadas. Células endócrinas individualizadas também são observadas compondo a parte endócrina da glândula.



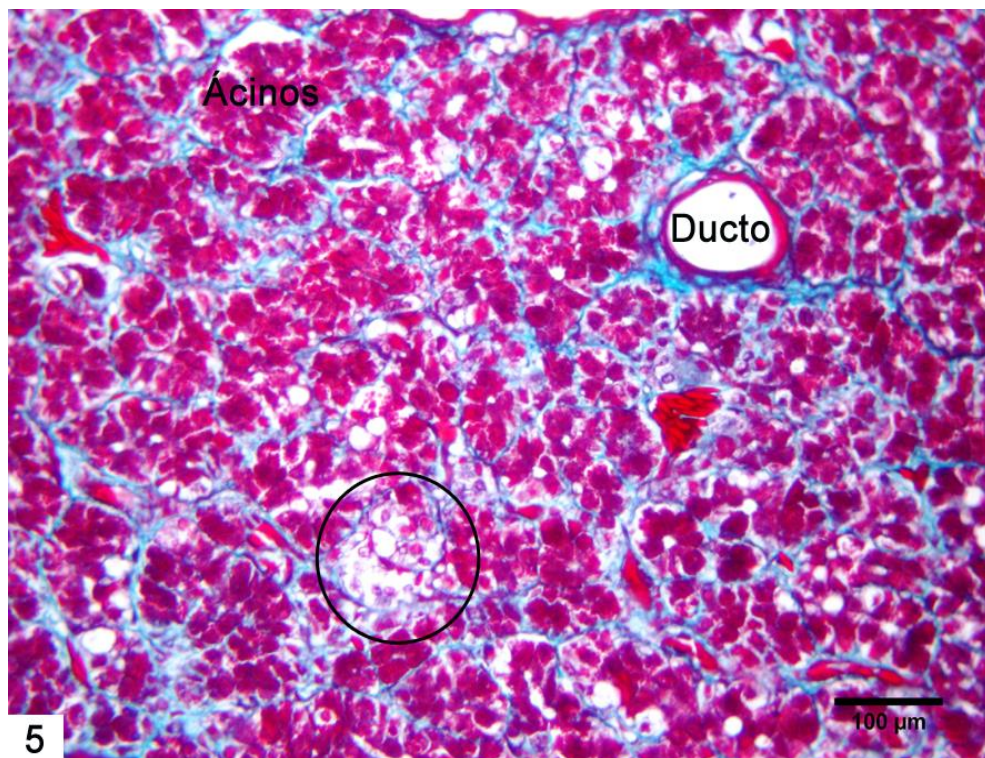
**Figura 2** - Fotomicrografias do pâncreas de *Phrynops geoffroanus*. Visão geral evidenciando a cápsula de tecido conjuntivo propriamente dito denso envolvendo o órgão. Porção exócrina formada por ácidos pancreáticos. Porção endócrina formada por grupamentos difusos de células (círculo). Hematoxilina-Eosina



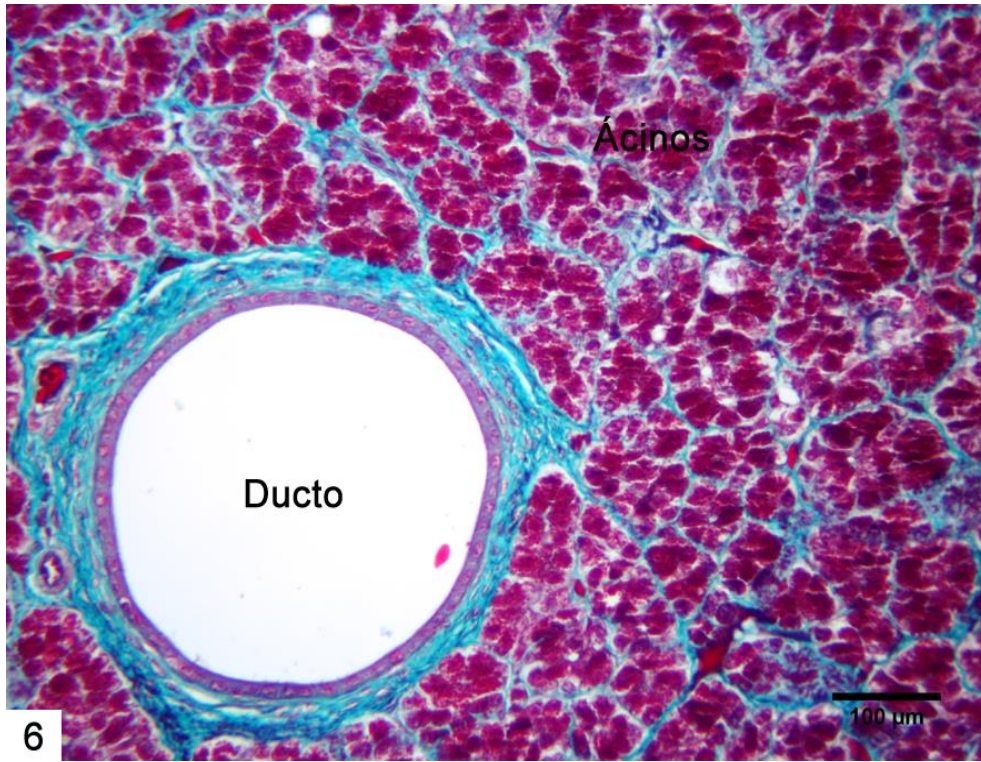
**Figura 3** - Fotomicrografias do pâncreas de *Phrynops geoffroanus*. Setas indicando grupamento difuso de células endócrinas entre os ácidos pancreáticos (↙). Hematoxilina-Eosina



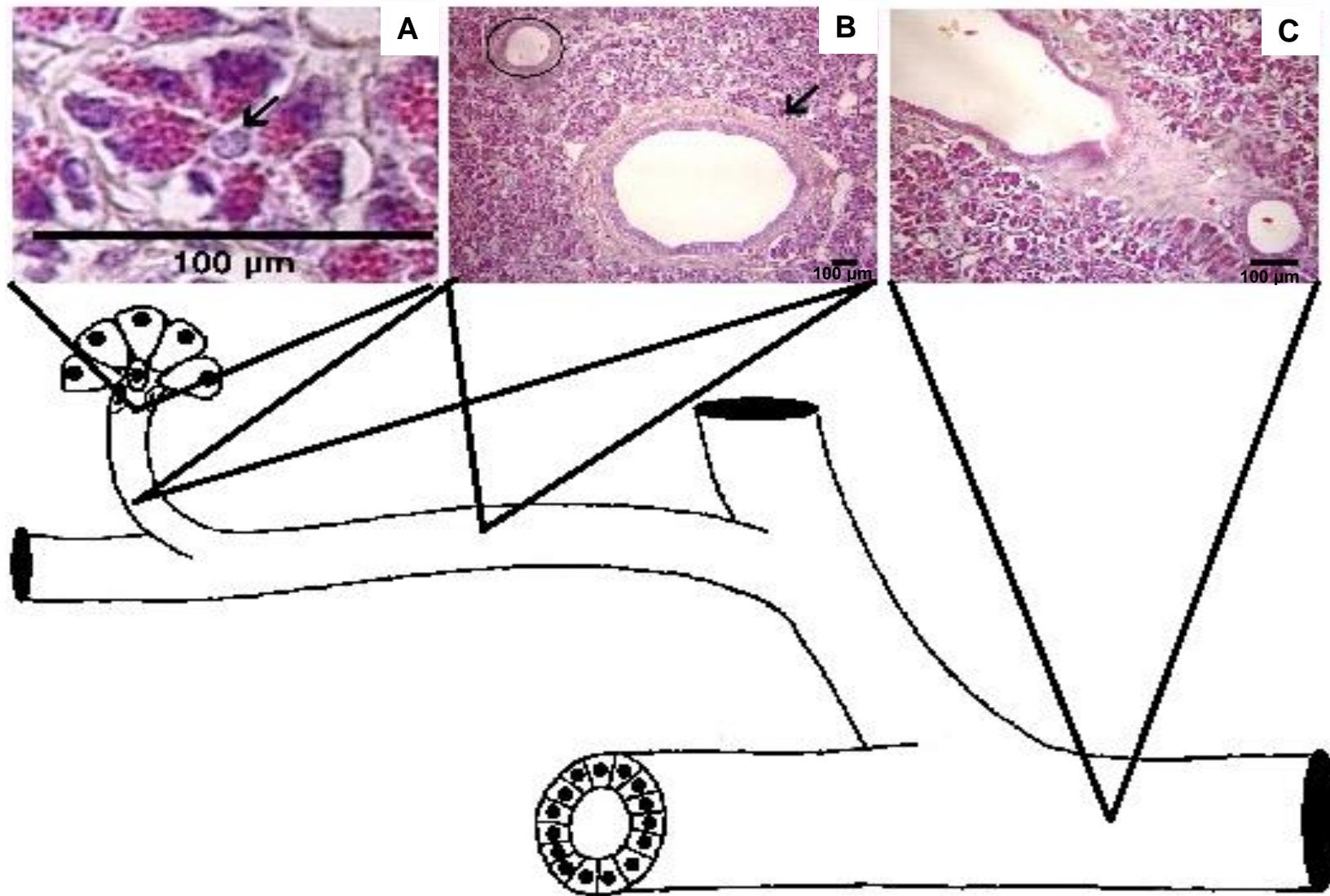
**Figura 4** - Fotomicrografias do pâncreas de *Phrynosops Geoffroyi*. Evidenciação da organização do tecido conjuntivo no órgão. Tricrômico de Gomori.



**Figura 5** - Fotomicrografias do pâncreas de *Phrynosops Geoffroyi*. Demonstração da distribuição de tecido conjuntivo entre as porções exócrina (ácinos) e endócrina (círculo) do pâncreas. Tricrômico de Gomori.



**Figura 6** - Fotomicrografias do pâncreas de *Phrynos geoffroanus*. Destaque de ducto pancreático. Tricrômico de Gomori.



**Esquema 1:** Esquema ilustrativo mostrando a ramificação dos ductos pancreáticos observados no parênquima do pâncreas da espécie *Phrynops Geoffroanus*. (A) Maior aumento destacando a presença de célula centroacinar no lúmen de um ácinos pancreáticos (seta). (B) Ducto intercalado (círculo) e ducto intralobular (seta) entre os ácinos pancreáticos do lóbulo. (C) Ductos interlobulares observados no septo que separa em lóbulos o parênquima da glândula. Hematoxilina-Eosina.

### ***Imuno-histoquímica***

Células endócrinas aparentemente isoladas e organizadas em grupamentos são encontradas ao longo de todo o pâncreas sem nenhuma cápsula de tecido conjuntivo distinta separando as porções endócrina e exócrina. São identificados quatro tipos de células usando anti-soros contra mamíferos: INS, GLUC, SOM, e PP. Nenhuma marcação para 5-HT é observada na porção endócrina do pâncreas desta espécie.

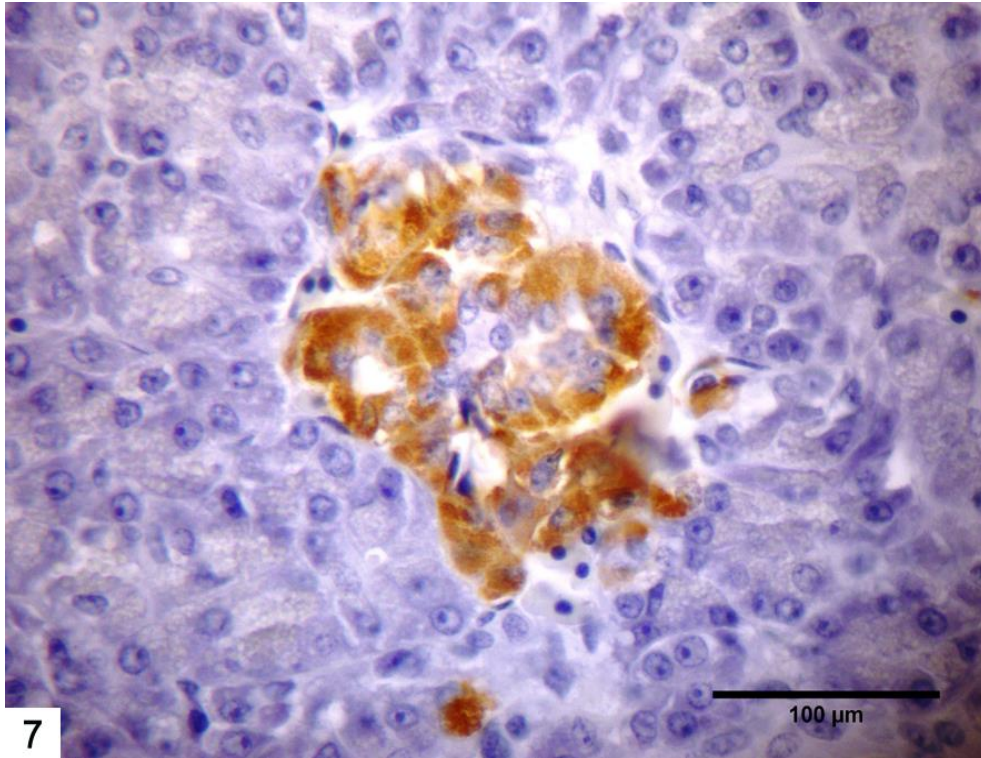
As células IR à INS apresentam formato arredondados ou poligonal. Sua distribuição ao longo do órgão se dá na forma de grupamentos celulares semelhante à ilhotas pancreáticas, frequentemente associadas a vasos sanguíneos, onde as células produtoras de INS ocupam a região mais central do agrupamento (Figura 7). Células aparentemente isoladas também são visualizadas distribuídas na porção exócrina do órgão. A frequência relativa de células IR a INS é considerada acentuada (+++).

Células IR a GLUC, arredondadas ou poligonais, estão em sua maioria distribuídas de forma agrupada. A frequência relativa de células IR a GLUC é avaliada como moderada (++). Nas estruturas semelhantes a ilhotas pancreática, as células produtoras de GLUC encontram-se mais periféricas se comparadas às células reativas a INS (Figura 8). Ocasionalmente, células aparentemente isoladas IR a GLUC são visualizadas (Figura 9).

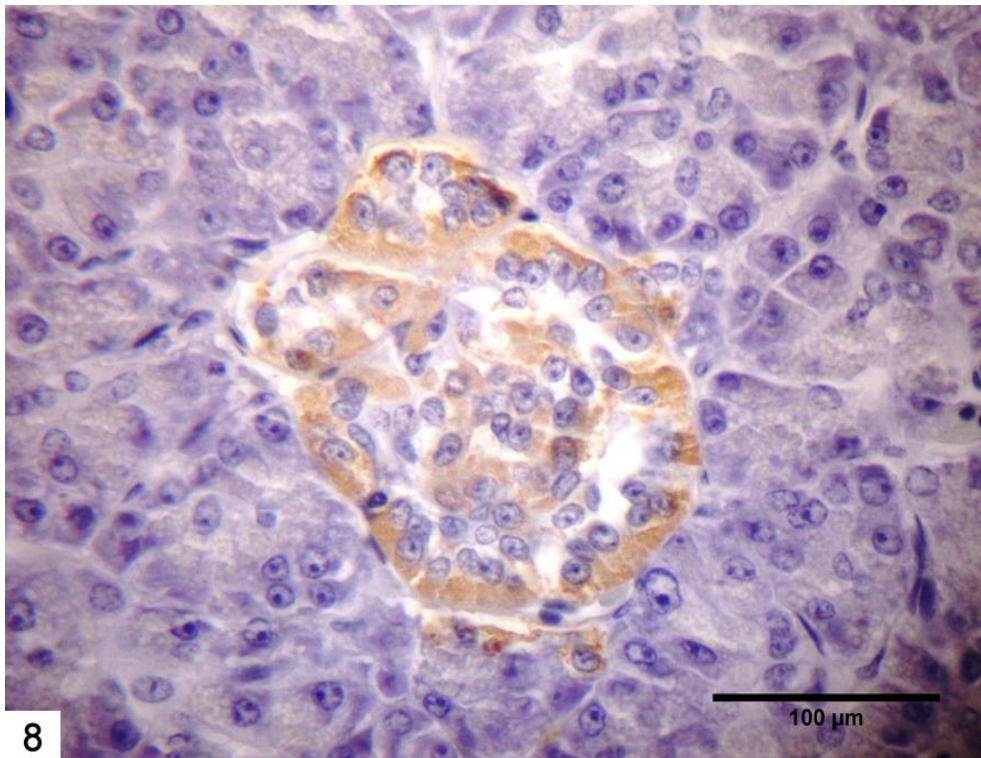
As células IR à SOM apresentam distribuição tanto associada a grupamentos endócrinos quanto dispersa isoladamente entre os ácinos pancreáticos, sendo sua frequência relativa classificada como moderada (++). As células produtoras de SOM, de formato arredondado a fusiforme, possuem posição mais periférica nos grupamentos semelhantes a ilhotas, estando entremeadas as células produtoras de GLUC (Figura 10).

Células produtoras de PP são notadas distribuídas aparentemente isoladas entre os ácinos pancreáticos, seu formato varia de células arredondadas, poligonais a células fusiformes (Figura 11) e sua frequência relativa é considerada baixa (+).

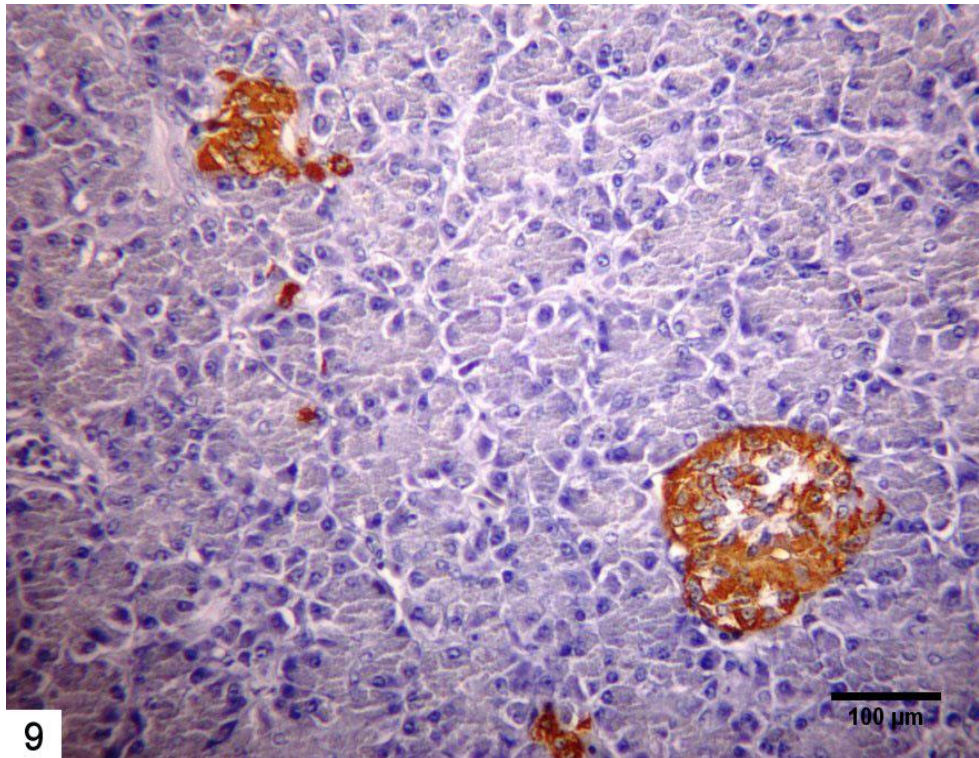
A média e o desvio padrão das medidas de área ( $\mu\text{m}^2$ ), diâmetros maior e diâmetro menor dos grupamentos endócrinos ( $\mu\text{m}$ ), para cada região do pâncreas (duodenal e esplênica) da espécie *P. geoffroanus* foram calculados e registrados na Tabela 3 do pâncreas (Tabela 3).



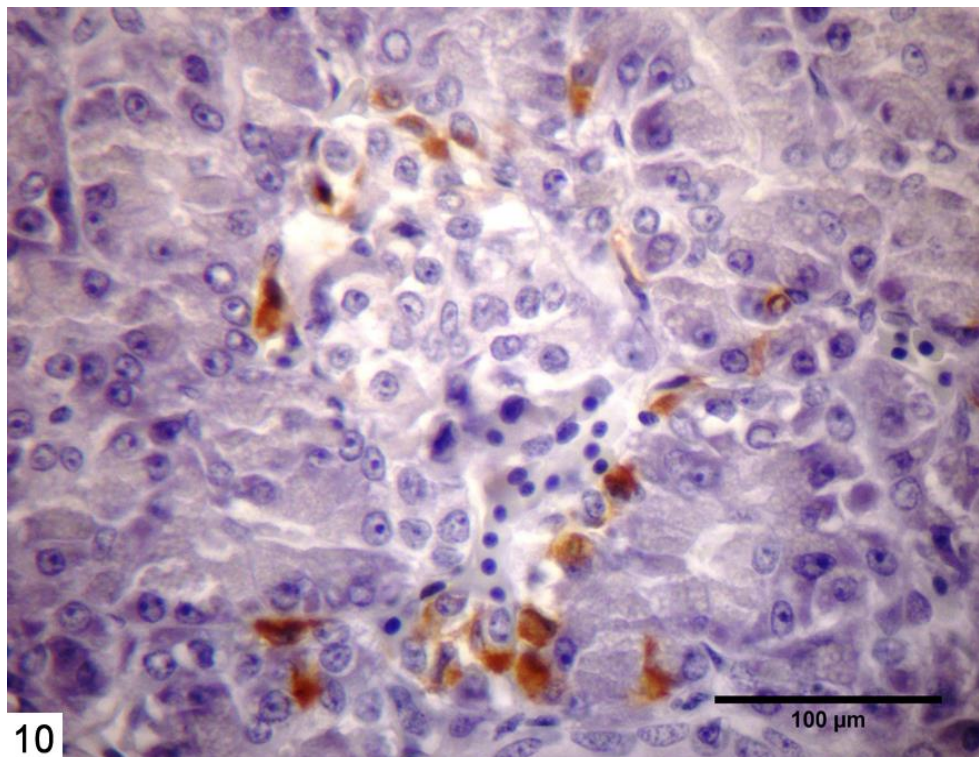
**Figura 7** - Fotomicrografia de células IR a **INS** no Pâncreas de *Phrynos geoffroanus*. Células endócrinas formando aglomerados semelhantes a Ilhotas pancreáticas. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.



**Figura 8** - Fotomicrografia de células IR a **GLUC** no Pâncreas de *Phrynos geoffroanus*. Células produtoras de glucagon localizadas na porção periférica dos aglomerados celulares semelhantes a Ilhotas pancreáticas. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.

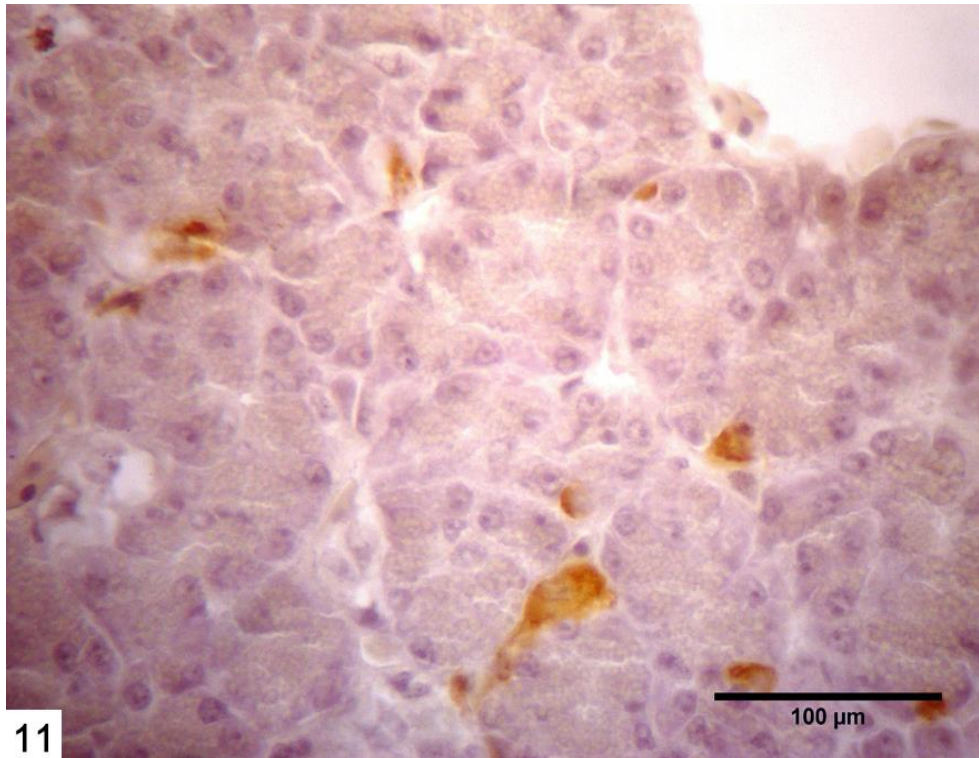


**Figura 9** - Fotomicrografia de células IR a **GLUC** no Pâncreas de *Phrynos geoffroanus*. Células endócrinas produtoras de glucagon aparentemente isoladas. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.



**Figura 10** - Fotomicrografia de células IR a **SOM** no Pâncreas de *Phrynos geoffroanus*. Células endócrinas produtoras de somatostatina localizadas na porção periférica dos aglomerados celulares semelhantes a Ilhotas pancreáticas. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.





**Figura 11** - Fotomicrografia de células IR a PP no Pâncreas de *Phrynops geoffroanus*. Células endócrinas isoladas. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.

**Tabela 3** - Valores médios ( $\pm$ DP) de area ( $\mu\text{m}^2$ ), diâmetro maior e menor ( $\mu\text{m}$ ) dos grupamentos endócrinos nas regiões do pâncreas da espécie *P. geoffroanus*.

	Região Duodenal	Região Esplênica
Diâmetro Maior	126,502 $\pm$ 53,205	110,593 $\pm$ 55,74
Diâmetro Menor	89,646 $\pm$ 36,766	76,573 $\pm$ 45,547
Área	9733,806 $\pm$ 7200,730	8173,884 $\pm$ 8822,565

## DISCUSSÃO

A anatomia do pâncreas da espécie *P. geoffroanus*, é caracterizada como sendo uma glândula sólida e compacta semelhante ao encontrado em *Testudo graeca* (GARCIA AYALA *et al.*, 1987), *Melanochelys trijuga* (CHANDAVAR & NAIK, 2008) e *Lissemys punctata* (SARKAR & MAITI, 2011). Possui coloração amarelada a acastanhada, sendo dividido em região duodenal e região esplênica, e localizado lateralmente ao intestino anterior.

A porção exócrina do pâncreas da espécie *P. geoffroanus* é formada por ácinos pancreáticos compostos por células serosas de formato piramidal, com núcleo esférico localizado perifericamente e citoplasma com grânulos de zimogênios semelhante ao descrito por Motta & colaboradores (1997). Células centroacinares são observadas no centro dos ácinos pancreáticos. Estas células são responsáveis pela produção de água e bicarbonato que compõe o suco pancreático (BURKITT *et al.*, 1994).

A porção endócrina do pâncreas da espécie *P. geoffroanus* é formada por grupamentos de células endócrinas, semelhantes à ilhotas pancreáticas; ou por células aparentemente isoladas distribuídas aleatoriamente no parênquima da glândula, padrão também observado por Garcia Ayala & colaboradores (1989) na espécie de tartaruga *Mauremys caspica* e por Lopez & colaboradores (1988) na espécie de lagarto *Podarcis hispanica*. Os grupamentos endócrinos em *P. geoffroanus* são irregulares e desprovidos de cápsula de tecido conjuntivo, como também descrito para as espécies de répteis: *Pseudemys scripta elegans* (AGULLEIRO *et al.*, 1985), *Testudo graeca* e *Mauremys caspica* (GARCIA AYALA *et al.*, 1987), *Melanochelys trijuga* (Chandavar & Naik, 2008) e *Eutropis carinata* (CHANDAVAR & NAIK, 2011). Esta organização difusa da porção endócrina do pâncreas é comum em: tartarugas, crocodilos e alguns lagartos (EPPLÉ & BRINN, 1987). A baixa organização endócrina observada no pâncreas dos répteis, quando comparada ao pâncreas de mamíferos, pode estar atrelada a origem ancestral dos grupos (TITLBACH, 1966). Porém, não se pode garantir que esta seja uma condição primitiva, ou derivada (GAPP *et al.*, 1985).

Entre os vertebrados, a composição das ilhotas pancreática é semelhante, em geral quatro tipos de células endócrinas são identificados, através de técnicas de imunohistoquímicas, usando anticorpos específicos para INS, GLUC, SOM e PP. Na espécie *P. geoffroanus* os quatro tipos celulares são identificados semelhante ao descrito nos quelônios *Testudo graeca* (GARCIA AYALA *et al.*, 1987), *Chrysemys picta* (GAPP *et al.*, 1985) e *Pseudemys scripta elegans* (AGULLEIRO *et al.*, 1985); nos lagartos *Uromasyx aegyptia* e *Mabuya quinquetarniata* (EL-SALHY & GRIMELIUS, 1981b), *Anolis carolinensis* (RHOTEN & HALL, 1982), *Chalcides ocellatus* (EL-SALHY *et al.*, 1983); e em crocodilianos *Alligator mississippiensis* (BUCHAN *et al.*, 1982).

As ilhotas pancreáticas em alguns répteis, como é o caso das espécies *Alligator mississippiensis* (MILLER, 1962), *Mauremys caspica* (PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989) e *Lissemys punctata* (SARKAR & MAITI, 2011), são descritas como sendo maiores na porção esplênica do pâncreas. Enquanto que em *Pseudemys scripta elegans* e *Chrysemys picta* são mais abundante na região duodenal (PUTTI *et al.*, 1991c). Segundo Baetens & colaboradores (1979), as diferenças de concentração das ilhotas pancreáticas nas regiões do pâncreas seria resultado do desenvolvimento embrionário do órgão originado a partir de dois diferentes primórdios pancreáticos, ventral e dorsal. Outros pesquisadores sugerem que a distribuição desigual das células endócrinas no pâncreas de espécies de classes distintas pode ser devido a diferentes tipos de hábitos alimentares (WIECZOREK *et al.*, 1998).

Sobre a organização das células endócrinas nas ilhotas pancreáticas, na maioria dos répteis, as células  $\beta$  estão mais centralizadas, enquanto que as células  $\alpha$  estão em posição periférica (STEINER *et al.*, 2010). O mesmo padrão é visualizado no pâncreas da espécie *P. geoffroanus* e também é descrito para as espécies *Mauremys caspica* (GARCIA AYALA, 1989), *Pseudemys scripta elegans* (AGULLEIRO *et al.*, 1985), *Chrysemys picta* (GAPP *et al.*, 1985), *Chaltides ocellatus* (EL-SALHY *et al.*, 1983), *Mabuya quinquetaeniata* (EL-SALHY & GRIMELIUS, 1981a) e outras 11 espécies de lacertídeos (PUTTI *et al.*, 1992). Em cobras, as células  $\alpha$  e  $\beta$  localizam-se centralmente, enquanto que as células D e PP estão arranjadas na periferia das ilhotas pancreáticas (RHOTEN, 1984). A modificação estrutural das ilhotas pancreáticas entre espécies pode resultar da variação nos mecanismos de desenvolvimento, no entanto, Steiner & colaboradores (2010) sugere que esta modificação se deve a diferentes necessidades metabólicas e as condições fisiológicas.

Na espécie *P. geoffroanus*, a razão entre a proporção de células  $\alpha$  e  $\beta$  é a favor das células  $\beta$ , como descrita em outras quatro espécies da subclasse Chelonia: *Chrysemys d'orbignyi* e *Phrynops hilarii* (CARDEZA, 1957), *Geoemyda pufcherrima* (MILLER, 1962) e *Melanochelys trijuga* (CHANDAVAR & NAIK, 2008). Em outras espécies de répteis notou-se uma frequência maior de células  $\alpha$  em relação à frequência de células  $\beta$  (FALKMER & OSTBERG, 1977; BONNER-WEIR & WEIR, 1979; PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989; CHANDAVAR & NAIK, 2011). Em lagartos da família Gekkonidae, por exemplo, a quantidade de células  $\alpha$  e  $\beta$  é igual ou existe uma prevalência de células  $\alpha$  (PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989; PUTTI *et al.*, 1991a, b, c; DELLA ROSSA & PUTTI, 1995). Em crocodilianos, as ilhotas da espécie *Alligator mississippiensis* apresentam a metade de células  $\beta$  e outra metade de células não- $\beta$  (MILLER, 1962). Para a subclasse Squamata, pequenas e grandes ilhotas são observadas, sendo a frequência de células não- $\beta$  maior que a de células  $\beta$  (FALKMER & OSTBERG, 1977). A INS, produzida pelas células  $\beta$ , e o GLUC, produzido pelas células  $\alpha$ , têm o papel de regular os níveis de glicose (HSU & CRUMP, 1989). Segundo Garcia Ayala (1989), as células GLUC-IR e INS-IR aumentam do período reprodutivo para o período recrudescente.

A SOM é um hormônio secretado pelas células D do pâncreas, capaz de bloquear as secreções de INS e GLUC (HAZELWOOD, 1984; TOBOADA *et al.*, 1985; WILLIAMS & GOLDFINE, 1985; EPPLE & BRINN, 1987). É também considerado um coordenador central da fisiologia gastrointestinal (BAYRAKDAR *et al.*, 2011). As células IR a SOM são distribuídas de forma isolada ou na periferia dos grupamentos endócrinos intercaladas com as células produtoras de GLUC no pâncreas de *P. geoffroanus*. O mesmo é observado em

lagartos (EL-SAHLY *ET AL.*, 1983; PUTTI *et al.*, 1992). Nos quelônios *T. graeca*, *Mauremys Caspica* e *Leptachatina lepida* células produtoras de SOM são difusamente distribuída no pâncreas, não sendo observada nenhuma associação com células IR a INS e GLUC (PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989). De acordo com Gapp & colaboradores (1985) as células IR a SOM e PP tem como função controlar a secreção de células de zimogênio através de um mecanismo antagonista.

O PP é um mensageiro químico sintetizado pelas células D e formado por 36 aminoácidos (HSU & CRUMP, 1989). Estas células são identificadas distribuídas isoladamente no pâncreas da espécie *P. geoffroanus*. Estas mesmas células também não parecem estar associadas a quaisquer grupamento semelhante à ilhotas pancreáticas em *Chrysemes Picta* (GAPP *et al.*, 1985), ou *T. graeca* (GARCIA AYALA *et al.*, 1987). A detecção destas células já foi descritas no pâncreas de outros répteis (RHOTEN & SMITH, 1978; EL-SAHLY *et al.*, 1983; AGULLEIRO *et al.*, 1985; GARCA AYALA *et al.*, 1987; PUTTI *et al.*, 1992). Em *M. quinquetaeniata*, *Uromastyx aegyptiu* (EL-SALHY & GRIMELIUS, 1981b) e *Mauremys caspica* (GARCIA AYALA, 1989) as células PP são mais abundantes na região duodenal da glândula. Em *Chrysemes picta* (GAPP *et al.*, 1985) e *T. graeca* (GARCIA AYALA *et al.*, 1987) são encontradas apenas na região duodenal. Entretanto em *Leptachatina lepida*, estas células são uniformemente distribuídas ao longo do órgão (PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989). A distribuição de maneira isolada entre os ácinos pancreáticos sugere uma função parácrina em relação às células produtoras de zimogênio (GAPP *et al.*, 1985).

Células produtoras de 5-HT não são observadas compondo o pâncreas endócrino da espécie estudada. Entretanto, estas células endócrinas são descritas no pâncreas do réptil *Caiman latirostris* (YAMADA *et al.*, 1986).

## CONCLUSÃO

- O estudo imuno-histoquímico revelou quatro tipos de células endócrinas no pâncreas de *P. geoffroanus*: células produtoras de INS, GLUC, SOM e PP.
- Os dados histológicos e imuno-histoquímicos obtidos a respeito da morfologia e fisiologia digestiva da espécie investigada servirá de referência na análise de alterações histopatológicas que possam afetar o pâncreas de quelônios, facilitando o

tratamento e manejo da espécie. Além disso, permitirá análises comparativas dentro dos Testudines, fornecendo subsídios para estudos evolutivos futuros.

## CAPÍTULO II

**Histologia do pâncreas e detecção por imunohistoquímica de células neuroendócrinas produtoras de insulina, glucagon, somatostatina, serotonina e polipeptídeo pancreático da espécie *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820) (Testudines, Chelidae)**

## RESUMO II

VIEIRA-LOPES, Danielle Alcantara. **Histologia do pâncreas e detecção por imunohistoquímica de células neuroendócrinas produtoras de insulina, glucagon, somatostatina, serotonina e polipeptídeo pancreático da espécie *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820) (Testudines, Chelidae)** 2017. 85f. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Entender a morfologia e fisiologia do pâncreas em todas as classes de vertebrados é fundamental para se esclarecer a atuação desta glândula na digestão dos alimentos e no controle dos níveis de glicose sanguíneos. O objetivo deste trabalho é investigar, por técnicas histológicas e imuno-histoquímicas, a morfologia e organização de células neuroendócrinas produtoras de insulina (INS), glucagon (GLUC), somatostatina (SOM), serotonina (5-HT) e polipeptídeo pancreático (PP) no pâncreas da espécie *Hydromedusa maximiliani*. Para isso, quatro espécimes de *H. maximiliani*, fixados em formol 10% e depositados na Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Juiz de Fora, foram processados por técnica histológica de rotina para obtenção de cortes de 5 µm de espessura. Utilizou-se para detecção de células endócrinas o método imuno-histoquímico Avidina-biotina peroxidase (ABC) com anticorpos específicos para cada hormônio investigado. Posteriormente, os cortes foram contracolorados pela hematoxilina de Harris para melhor visualização ao microscópio de luz. A porção exócrina da espécie estudada é formada por células serosas de formato piramidal, núcleo esférico periférico e citoplasma com numerosos grânulos de zimogênios. Nenhuma cápsula de tecido conjuntivo é encontrada envolvendo as ilhotas pancreáticas. É característica da porção endócrina a presença de grupamentos celulares difusamente distribuídos entre os ácinos pancreáticos, constituídos por células poligonais ou arredondadas, com núcleo esférico central. Células endócrinas aparentemente isoladas também são observadas. Em *H. maximiliani* três tipos celulares foram encontrados: células produtoras de INS, GLUC e SOM. As células endócrinas intercalam-se, geralmente ao redor de vasos sanguíneos, para formar os grupamentos endócrinos semelhantes a ilhotas pancreáticas. Não são observadas células produtoras de 5-HT e PP, nas porções endócrinas e exócrinas. A compreensão da morfologia e fisiologia digestiva da espécie investigada permitirá análises comparativas dentro da classe dos répteis, fornecendo subsídios para estudos evolutivos futuros. Além de fornecer subsídios a serem utilizados como referência na compreensão de alterações histopatológicas que possam afetar o pâncreas de quelônios, facilitando o manejo das espécies.

**Palavras chaves:** Quelônios, Histologia, Imuno-histoquímica, células endócrinas.

## ABSTRACT II

VIEIRA-LOPES, Danielle Alcantara. **Histology of the pancreas and detection by immunohistochemistry of neuroendocrine cells producing insulin, glucagon, somatostatin, serotonin and pancreatic polypeptide e pancreatic polypeptide in the species *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820) (Testudines, Chelidae) 2017. 85f.** Institute of Biological and Health Sciences, Department of Animal Biology, Rio de Janeiro Federal Rural University, Seropédica, RJ, 2017.

Understanding the morphology and physiology of the pancreas in all classes of vertebrates is fundamental to clarify the action of this gland in the digestion of food and control of blood glucose levels. The objective of this study was to investigate by histologic and immunohistochemical techniques the morphology and organization of neuroendocrine cells producing insulin (INS), glucagon (GLUC), somatostatin (SOM), serotonin (5-HT) and pancreatic polypeptide (PP) in the pancreas of the turtle *Hydromedusa maximiliani*. For this purpose, the pancreas of four specimens of *H. maximiliani*, fixed in 10% formol and deposited in the herpetology collection of Juiz de Fora Federal University, were routinely processed for histology to obtain sections with thickness of 5  $\mu\text{m}$ . The avidin-biotin peroxidase (ABC) method with specific antibodies for each hormone investigated was used to detect the endocrine cells. The sections were counterstained with Harris hematoxylin for better visualization under a light microscope. The exocrine portion of the pancreas is formed by pyramidal serous cells with spherical nuclei located in the periphery and an acidophilic cytoplasm, due to zymogen granules. No connective tissue capsule is found surrounding the pancreatic islets. The endocrine portion is characterized by the presence of cell groups diffusely distributed among the pancreatic acini, composed of polygonal or rounded cells, with spherical nuclei located centrally and weakly acidophilic cytoplasm. In *H. maximiliani*, three cell types were found (producers of INS, GLUC and SOM). The endocrine cells are interspersed, generally around the blood vessels, forming endocrine groups similar to pancreatic islets. No cells producing 5-HT and PP were observed, either in the endocrine or exocrine portion. Comprehension of the morphology and physiology of the species investigated will permit comparative analyses in future studies, besides information to understand the histopathological changes that can affect the pancreas of turtles, facilitating management of these species.

**Keywords:** Turtles, Histology, Immunohistochemistry, Endocrine cells.



## INTRODUÇÃO

Tartaruga-pescoço-de-cobra, como é conhecido o quelônio *Hydromedusa maximiliani*, é uma espécie endêmica da Mata Atlântica (ERNEST & BARBOUR, 1989), encontrada nos estados da Bahia (ARGÔLO & FREITAS, 2002), São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo (ERNEST & BARBOUR, 1989; SOUZA *et al.*, 2003) e Minas Gerais (MOREIRA, 1994; CHAGAS & RAPOSO-FILHO, 1999). É um animal de pequeno porte, sendo os machos maiores que as fêmeas (SOUZA & MARTINS, 2009). Sua atividade é influenciada principalmente pela pluviosidade e pela temperatura (SOUZA, 1995; SOUZA & ABE, 1997). A espécie é encontrada tipicamente em riachos de águas claras, arenosos e rochosos, com margem coberta por floresta conservada (IVERSON, 1992; ARGÔLO & FREITAS 2002; SOUZA 2005; SOUZA & MARTINS 2009). Possui hábito alimentar carnívoro, consumindo: larvas de insetos, crustáceos, anelídeos, aranhas, anfíbios, lagartos e carniça (YASHIMITA 1990; GUIX *et al.* 1992; NOVELLI *et. al.*, 2013). Devido à perda de seu hábitat natural ocasionada pelo desmatamento das margens dos rios, o assoreamento do leito, a poluição e o envenenamento resultado do despejo de lixo industrial e doméstico e de produtos agroquímicos, a espécie é atualmente considerada uma espécie vulnerável pela IUCN (2017).

O pâncreas tem sido estudado por técnicas de microscopia óptica e eletrônica e mais recentemente usando métodos imuno-histoquímicos em espécies de Chelonia (TITLBACH, 1966; EPPLE & BRINN, 1975; YAGLOV & ELETSKI, 1975; YAGLOV, 1976; AGULLEIRO *et al.*, 1985; GAPP *et al.*, 1985; GARCIA AYALA, 1987; CHANDAVAR & NAIK, 2008). O pâncreas é uma glândula mista com funções endócrinas e exócrinas, importante para o controle dos níveis de glicose sanguíneos e no processamento dos nutrientes absorvidos no processo de digestão. É essencial entender a morfologia e fisiologia do pâncreas de todas as classes de vertebrados no intuito de facilitar o entendimento sobre fatores nutricionais e assim melhorar o manejo, atividades de repovoamento, e condicionamento das espécies em seus ecossistemas (CASTRO *et al.*, 2003). Além disso, as buscas por células endócrinas no sistema gastroenteropancreático (GEP) tem sido importante para estudos filogenéticos (D'ESTE *et al.*, 1995).

O objetivo do presente trabalho é analisar a histologia e a imuno-histoquímica do pâncreas de *H. maximiliani*, de modo a avaliar a presença e a distribuição de células produtoras de INS, GLUC, SOM, 5-HT e PP possibilitando uma futura comparação com outras espécies para maior compreensão dos aspectos evolutivos.

## MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram analisados quatro espécimes adultos de *H. maximiliani* (Tabela 1) que se encontravam acondicionados em meio líquido (formol 10%) e depositados na Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), MG. No Laboratório de Histologia e Embriologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), o pâncreas de cada espécime foi dividido em duas porções: região duodenal e região esplênica, as quais foram clivadas em cortes seriados transversais e longitudinais e posteriormente processados por técnica histológica de rotina: desidratação (em uma série de concentração crescente de etanol de 70° GL a 100° GL), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina para obtenção de cortes histológicos de 5 µm de espessura em micrótomo. Para análise da anatomia microscópica do órgão as lâminas com os fragmentos foram coradas pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE), para análise da arquitetura tecidual e Tricrômico de Gomori (TG), para visualização diferencial de colágeno e fibras musculares. Lâminas previamente tratadas com Poli-L-lisina 0.1% (Sigma Chemical Co., Saint Quentin Fallavier, France) foram utilizadas para o processamento imuno-histoquímico dos fragmentos. Os cortes desparafinados e hidratados foram incubados em tampão citrato (pH 6,0 – 0,01M) e aquecimento por 15 minutos em forno microondas para efetivar a recuperação antigênica dos tecidos. Posteriormente, bloqueou-se a enzima peroxidase endógena pela incubação em uma solução de peróxido de hidrogênio a 3 % em metanol durante 15 minutos. Feito o bloqueio, as lâminas foram armazenadas em câmara úmida a temperatura ambiente e tratadas com soro normal por 30 minutos. Em seguida, as seções foram incubadas por 1 hora com os seguintes anticorpos primários: rato anti-insulina (Sigma-Aldrich, Inc. USA - I2018) 1:1.000; rato anti-glucagon (Sigma-Aldrich, Inc. USA - G2654) 1:2.000; coelho anti-somatostatina (Dako Corp., CA, USA - A566) 1:300; coelho anti-serotonina (Sigma-Aldrich, Inc. USA - S5545) 1:8.000; coelho anti-polipeptídeo pancreático (Diagnostic Biosystems, Inc. CA, USA - RP030) 1:25. Depois foram tratadas com anticorpo biotilado “universal” secundário diluído a 1: 200 durante 30 minutos, logo após com complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC), diluído a 1: 200, por mais 30 minutos (ambos da PK 6200, Vector Laboratories, Inc., EUA). A revelação foi feita por reação com Diaminobenzidina (DAB) (Diagnostic Biosystems, Inc., EUA, cod. K 047). Todas as diluições foram feitas com um diluente específico (Antibody Diluent - Spring Bioscience, cod. ADS-125) e para as lavagens entre fases utilizou-se tampão PBS (pH 7,4). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris, desidratadas em séries de concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e montadas com entelan (Merck e Co., EUA). Para

garantir a especificidade das reações, controles positivos e negativos foram utilizados. Por substituição do anticorpo primário com soro não imune o controle negativo foi definido. Os controles positivos foram produzidos usando cortes de tecido para cada anticorpo respectivo, conforme indicado na bula do produto.

Todas as lâminas foram observadas e fotografadas com auxílio do microscópio Olympus BX41 e câmera digital Sony Cybershot DSCW 230. Para cada espécime analisado, foram capturadas fotomicrografias de ilhotas pancreáticas de três cortes distintos de cada região do pâncreas. De cada corte, foram feitas mensurações semi-automática da área, dos diâmetros maiores e menores das ilhotas pancreáticas, no aumento de 400X, usando um analisador de imagem computadorizado (Image-J software) com o cálculo da média  $\pm$  SD (desvio padrão) por unidade de área (mm<sup>2</sup>) da mucosa. Foi definido como ilhota pancreática um conglomerado de células, composto por no mínimo quatro células. A frequência relativa de células endócrinas foi avaliadas para cada anticorpo, de maneira semi-quantitativa, e classificada em: imunorreatividade ausente (-) ou discreta (+), média (+ +) acentuada (+ + +).

## **RESULTADOS**

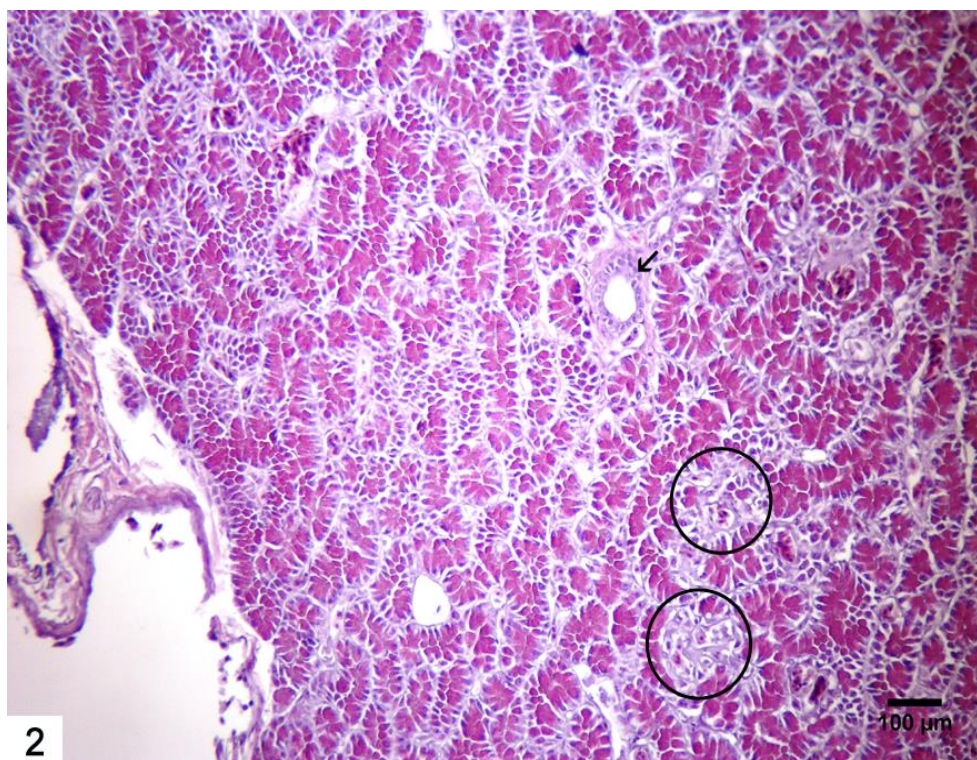
O pâncreas da espécie *H. maximiliani* é compacto, de cor acastanhada, posicionado lateralmente ao intestino anterior (Figura 1). Nenhuma cápsula de tecido conjuntivo é observada envolvendo o órgão, e também não é encontrado nenhum septo de tecido conjuntivo dividindo o parênquima do pâncreas em lóbulos. O órgão é dividido em duas regiões: região duodenal e região esplênica. Duas porções distintas separadas de acordo com a morfologia e a função do órgão são visualizadas: uma porção exócrina, a qual produz enzimas digestivas a serem lançadas no interior do intestino anterior do animal; e uma porção endócrina, cuja função é produzir hormônios que controlam o metabolismo dos carboidratos.



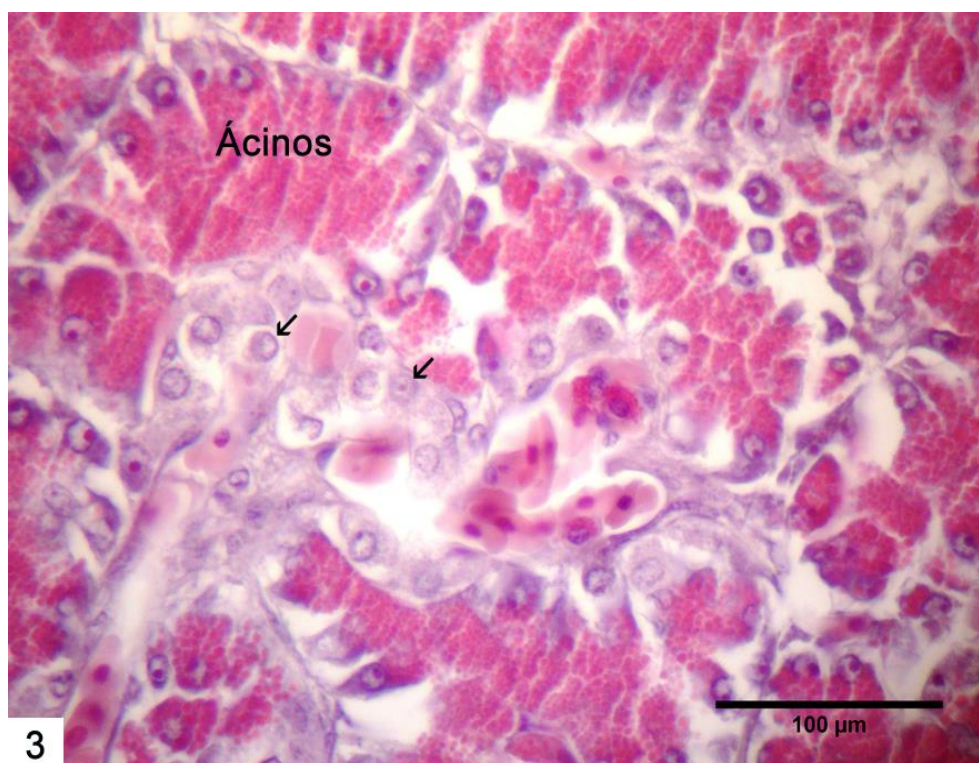
**Figura 1** - Fotografia do tubo digestivo (TD) da espécie *Hydromedusa maximiliani* evidenciando a posição do pâncreas lateralmente ao intestino anterior da espécie estudada (\*).

### ***Histologia***

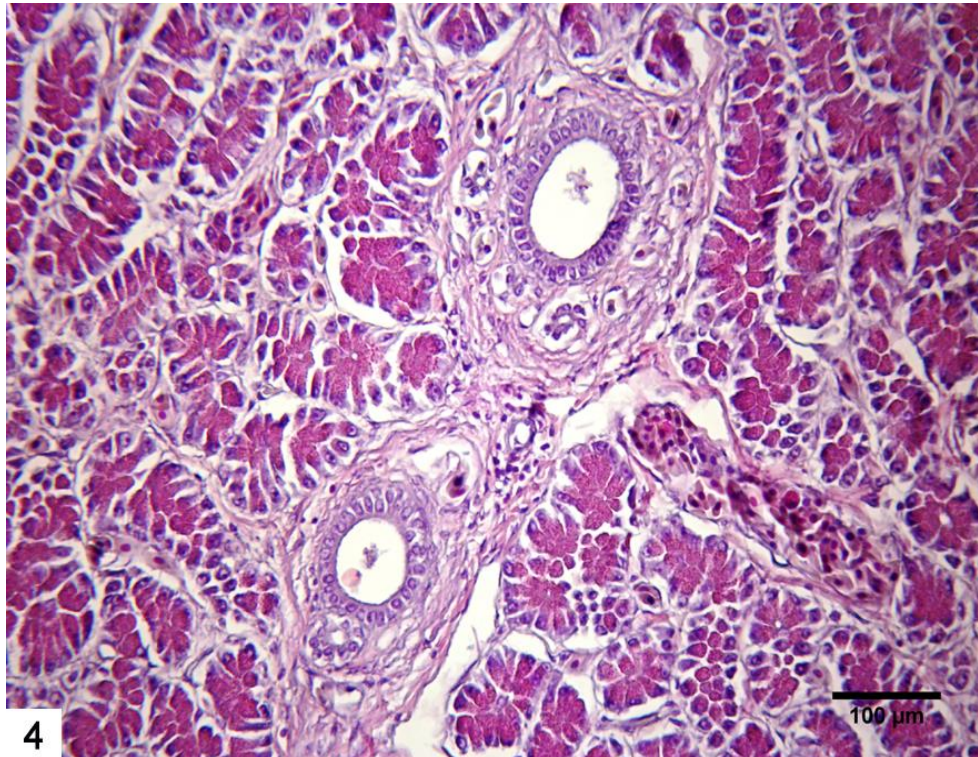
A porção exócrina do pâncreas de *H. maximiliani* é formada por estruturas denominadas ácinos pancreáticos. Estruturalmente estes ácinos são constituídos por células serosas, em forma de pirâmides, com núcleo esférico posicionado na base da célula e citoplasma com grânulos de zimogênio. A porção endócrina da glândula é constituída por células poligonais ou arredondadas, com núcleo esférico central (Figura 2). Estas células podem ser visualizadas em grupos difusos entremeados nos ácinos pancreáticos, semelhante a ilhotas pancreáticas, porém sem nenhum tipo de tecido separando a porção endócrina da porção exócrina. Estes grupamentos endócrinos são frequentemente observados envolvendo vasos sanguíneos (Figura 3). As células endócrinas por vezes também são encontradas solitárias entre os ácinos pancreáticos. Ductos pancreáticos são observados no parênquima da glândula formados por epitélio simples cúbico em ductos de diâmetros menores, podendo se tornar epitélio estratificado cúbico nos ductos de maiores diâmetros (Figuras 4 e 5). A camada de tecido conjuntivo que reveste os ductos também aumenta progressivamente com o aumento de tamanho dos ductos. No centro dos ácinos pancreáticos são encontradas células centroacinares caracterizadas pelo formato cubóides com núcleos pálidos e citoplasma claro e escasso (Esquema 1).



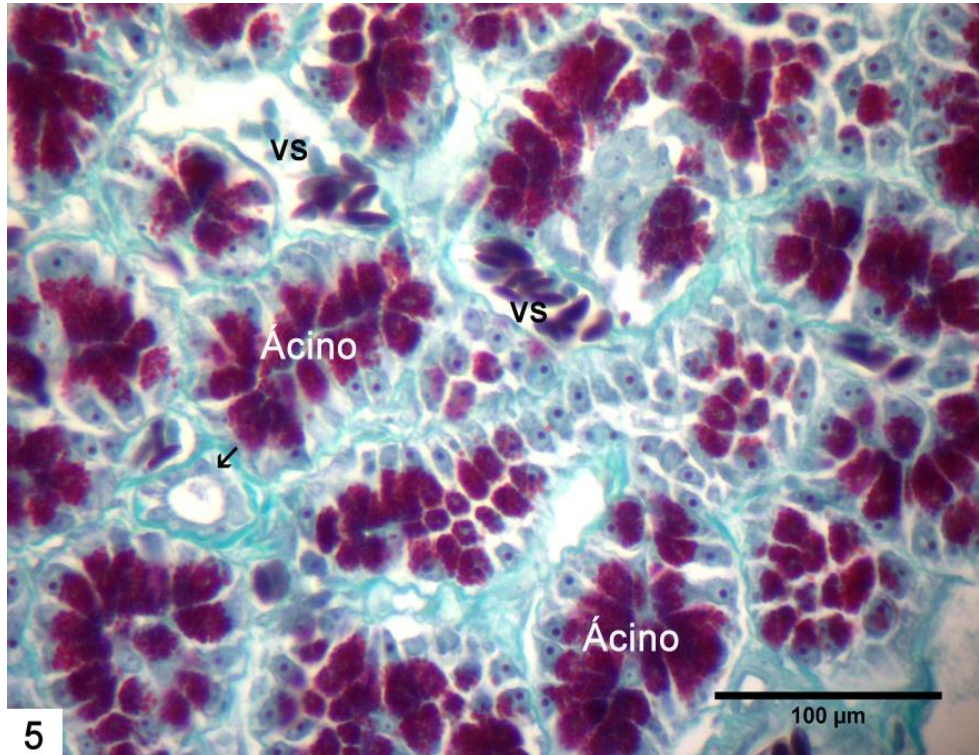
**Figura 2** - Fotomicrografias do pâncreas de *Hydromedusa maximiliani*. Visão geral evidenciando porção exócrina formada por ácinos pancreáticos e porção endócrina formada por grupamentos difusos de células endócrinas (círculo). Seta destacando ducto pancreático. Hematoxilina-Eosina.



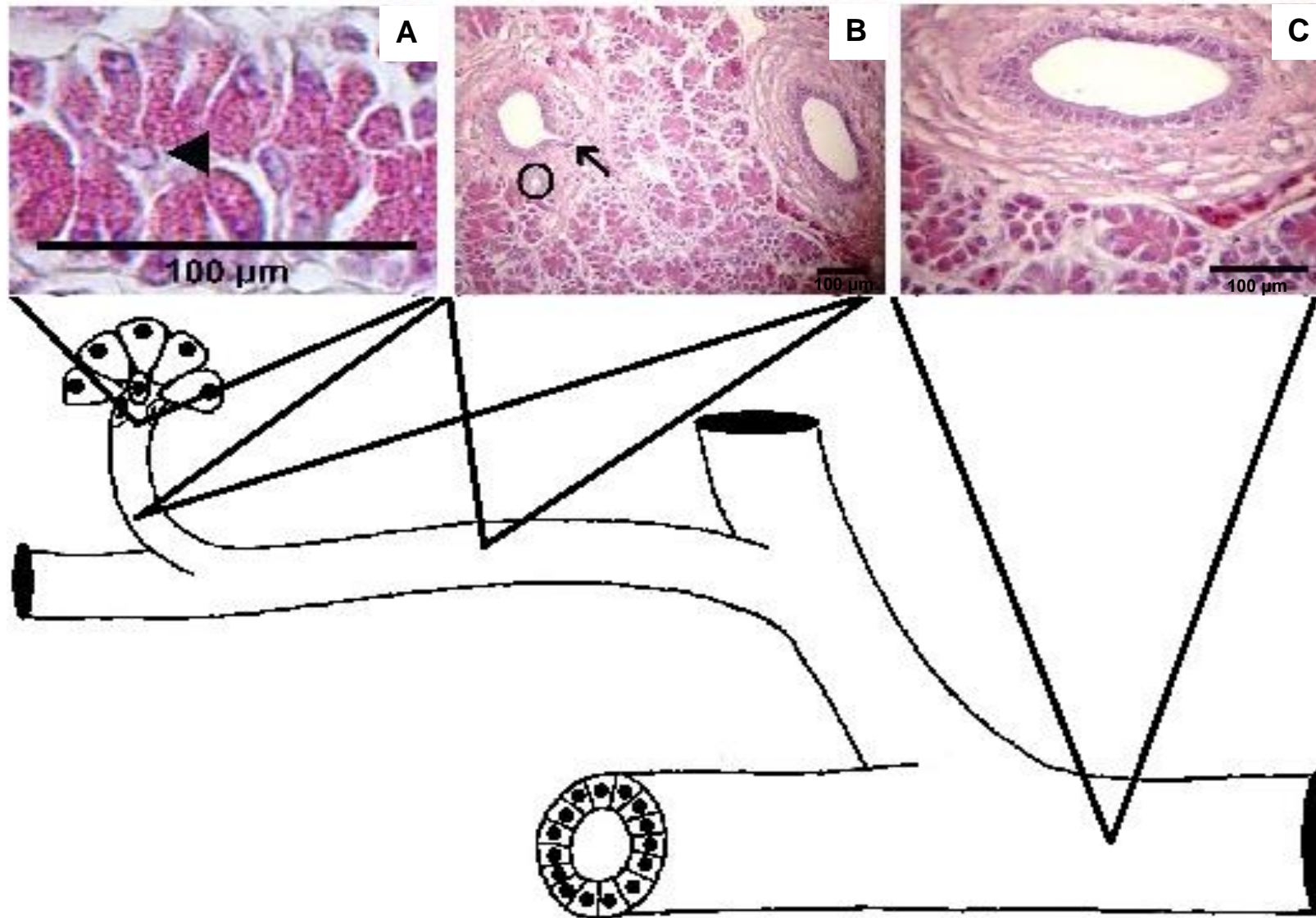
**Figura 3** - Fotomicrografias do pâncreas de *Hydromedusa maximiliani*. Setas indicando células endócrinas compondo grupamento difuso semelhante a ilhotas pancreáticas entre os ácinos. Hematoxilina-Eosina.



**Figura 4** - Fotomicrografias do pâncreas de *Hydromedusa maximiliani*. Setas destacando ductos pancreáticos formados por epitélio cúbico simples. Hematoxilina-Eosina.



**Figura 5** - Fotomicrografias do pâncreas de *Hydromedusa maximiliani*. Demonstração da distribuição de tecido conjuntivo no órgão. Seta destacando ducto pancreático. Presença de vasos sanguíneos entre os ácinos pancreáticos (vs). Tricrômico de Gomori.



**Esquema 1:** Esquema ilustrativo mostrando a ramificação dos ductos pancreáticos observados no parênquima do pâncreas da espécie *Hydromedusa maximiliani*. (A) Maior aumento destacando a presença de células centroacinares no lúmen de um ácino pancreático (seta). (B) Ductos de diâmetros distintos evidenciando o aumento gradual da camada de tecido conjuntivo que os sustenta (círculo e seta). (C) Maior aumento de um ducto pancreático mostrando a camada de tecido conjuntivo. Hematoxilina-Eosina.

### ***Imuno-histoquímica***

Células endócrinas aparentemente isoladas ou formando grupamentos semelhantes a ilhotas são observadas distribuídas no parênquima do pâncreas de *H. maximiliani*. Nenhuma delimitação de tecido conjuntivo é visualizada separando a porção endócrina da porção exócrina. São identificados três tipos de células usando anti-soros contra mamíferos: INS, GLUC e SOM. Células IR a 5-HT e PP não são observadas.

As células IR à INS, de formato arredondado ou poligonal, distribuíram-se isoladamente ou formando grupamentos semelhante a ilhotas pancreáticas ao longo do pâncreas da espécie *H. maximiliani* (Figura 6). A frequência relativa de células IR a INS é considerada acentuada (+++).

As células IR a GLUC localizam-se entremeadas as células IR à INS nas estruturas semelhantes a ilhotas pancreáticas, as quais envolvem vasos sanguíneos (Figura 7). Ocasionalmente, células aparentemente isoladas são visualizadas distribuídas aleatoriamente entre os ácinos pancreáticos. As células que sintetizam GLUC apresentam formato arredondado ou poligonal, e apresentam frequência relativa avaliada como baixa (+).

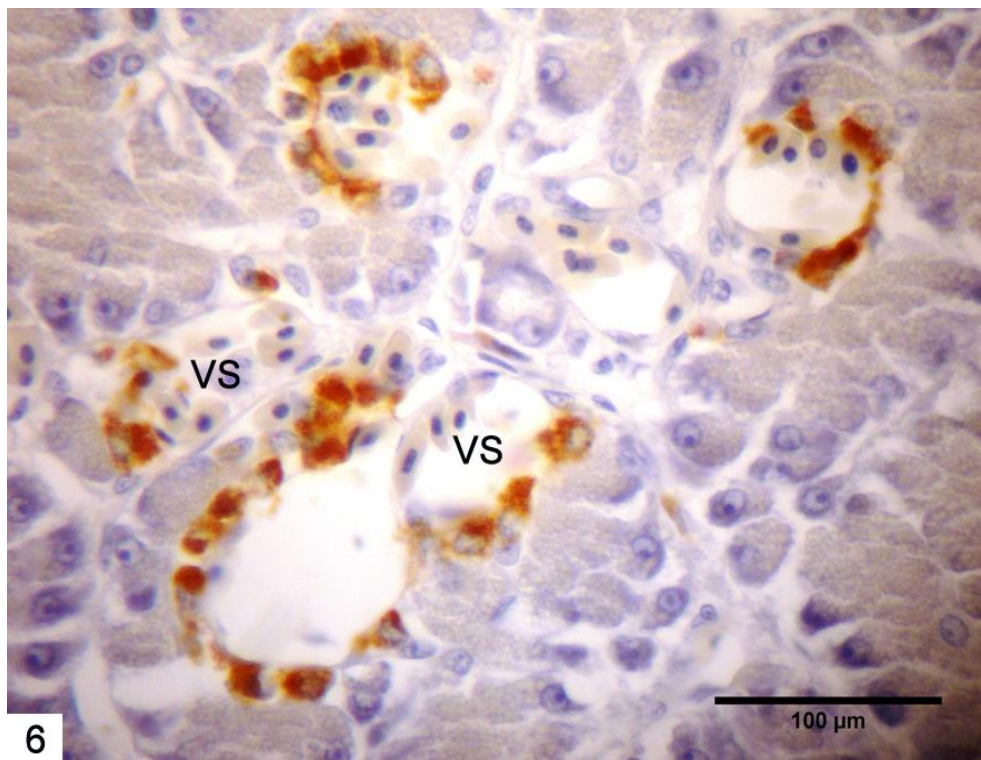
Também são observadas no pâncreas da espécie células IR à SOM. A frequência relativa de células IR a SOM é considerada baixa (+). Nos grupamentos semelhantes a ilhotas as células produtoras de SOM apresentam posicionamento periférico, estando próximas as células produtoras de GLUC e INS (Figura 8). Algumas células IR à SOM são visualizadas aparentemente isoladas entre os ácinos com formatos que variam de arredondados a fusiformes.

A média e o desvio padrão das medidas de área ( $\mu\text{m}^2$ ), diâmetros maior e diâmetro menor dos grupamentos endócrinos ( $\mu\text{m}$ ), para cada região do pâncreas (duodenal e esplênica) do pâncreas da espécie *H. maximiliani* foram calculados e registrados na Tabela 4.

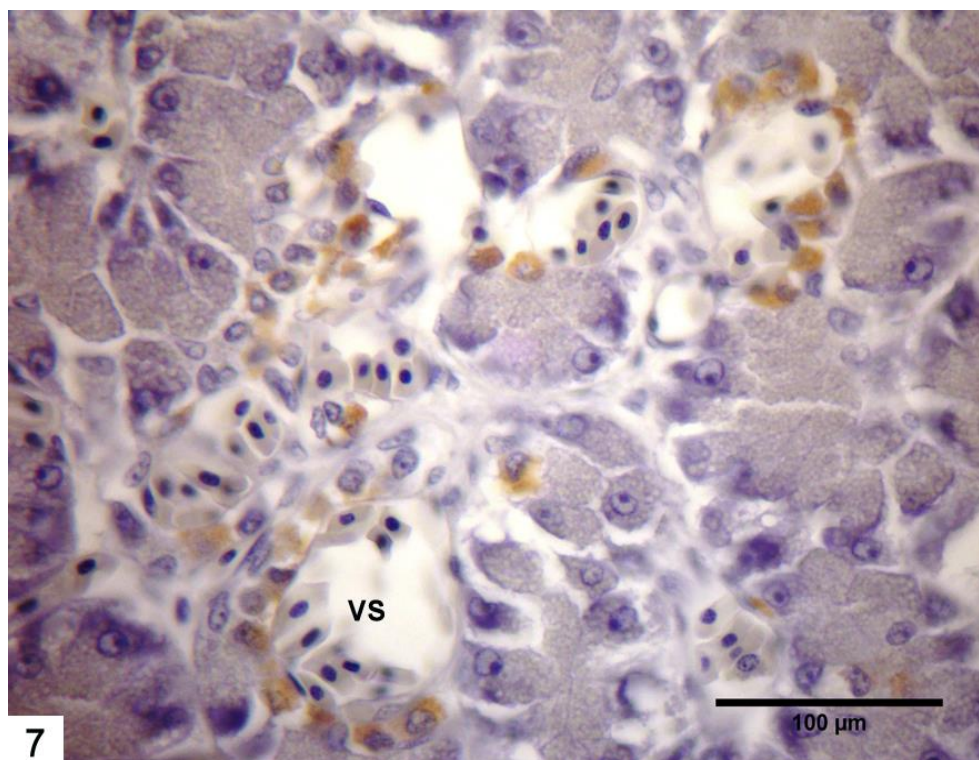
**Tabela 4** - Valores médios ( $\pm$ DP) de área ( $\mu\text{m}^2$ ), diâmetro maior e menor ( $\mu\text{m}$ ) dos grupamentos endócrinos nas regiões do pâncreas da espécie *H. maximiliani*.

	<b>Região Duodenal</b>	<b>Região Esplênica</b>
Diâmetro Maior	124,610 $\pm$ 43,877	140,899 $\pm$ 58,914
Diâmetro Menor	93,815 $\pm$ 33,186	87,466 $\pm$ 31,514
Área	9750,132 $\pm$ 8228,418	10365,357 $\pm$ 7195,631

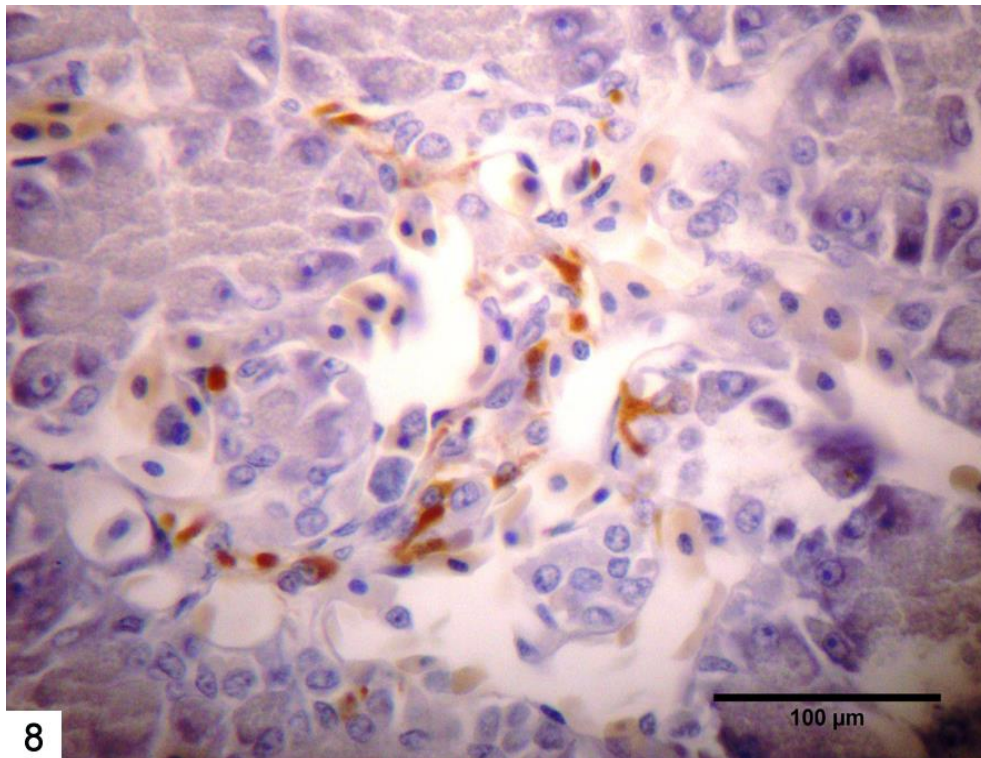




**Figura 6** - Fotomicrografia de células IR a **INS** no Pâncreas de *Hydromedusa maximiliani*. Células endócrinas formando aglomerados semelhantes a Ilhotas pancreáticas. Vasos sanguíneos (vs). Contracoloração: Hematoxilina de Harris.



**Figura 7** - Fotomicrografia de células IR a **GLUC** no Pâncreas de *Hydromedusa maximiliani*. Células produtoras de glucagon compondo os aglomerados celulares semelhantes a Ilhotas pancreáticas. Vasos sanguíneos (vs). Contracoloração: Hematoxilina de Harris



**Figura 8** - Fotomicrografia de células IR a **SOM** no Pâncreas de *Hydromedusa maximiliani*. Células endócrinas produtoras de somatostatina formando aglomerados celulares semelhantes a Ilhotas pancreáticas. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.

## DISCUSSÃO

A anatomia do pâncreas de *H. maximiliani*, apresenta-se como uma glândula sólida e compacta semelhante ao encontrado em outros répteis (GARCIA AYALA *et al.*, 1987; CHANDAVAR & NAIK, 2008; SARKAR & MAITI, 2011). Possui coloração amarelada a acastanhada, posicionando-se lateralmente ao intestino anterior, sendo dividido em duas regiões: região duodenal e região esplênica.

Ácinos pancreáticos formados por células serosas de formato piramidal, com núcleo esférico periférico e citoplasma com grânulos de zimogênios compõem a porção exócrina da glândula de *H. maximiliani*, mesmo padrão descrito por Motta & colaboradores (1997). Células mais claras e de formato cubóides são visualizadas no centro dos ácinos pancreáticos. Estas células são denominadas células centroacinares e sua principal função é a produção de água e bicarbonato que compõe o suco pancreático (BURKITT *et al.*, 1994).

Assim como descrito para as espécies de quelônios *Mauremys caspica* (GARCIA AYALA *et al.*, 1989) e *Podarcis hispanica* (LOPEZ *et al.*, 1988), a porção endócrina do pâncreas da espécie *H. maximiliani* é formada por grupamentos de células endócrinas semelhantes a ilhotas pancreáticas; ou por células aparentemente isoladas distribuídas aleatoriamente no parênquima do órgão. Os grupamentos endócrinos em *H. maximiliani* não

apresentam cápsula de tecido conjuntivo delimitando em ilhota pancreática, o mesmo observado em *Pseudemys scripta elegans* (AGULLEIRO *et al.*, 1985), *Testudo graeca* e *Mauremys caspica* (GARCIA AYALA *et al.*, 1987), *Melanochelys trijuga* (CHANDAVAR & NAIK, 2008) e *Eutropis carinata* (CHANDAVAR & NAIK, 2011). Mas diferente do que ocorre em *Chrysemes picta* (CARDEZA, 1957) e *Lissemys punctata* (SARKAR & MAITI, 2011). Em *H. maximiliani*, assim como em *Melanochelys trijuga* (CHANDAVAR & NAIK, 2008) e *E. carinata* (CHANDAVAR & NAIK, 2011) observa-se que os grupamentos endócrinos envolvem vasos sanguíneos, indicando sua propriedade endócrina. Esta baixa organização da porção endócrina do pâncreas é comum em tartarugas, crocodilos e alguns lagartos (EPPLÉ & BRINN, 1987).

Apenas três tipos de células endócrinas IR são identificados em *H. maximiliani*: INS, GLUC e SOM. Mas na maioria dos répteis pelo menos quatro tipos celulares já formam encontrados: INS, GLUC, SOM e PP (EL-SALHY & GRIMELIUS, 1981b; BUCHAN *et al.*, 1982; RHOTEN & HALL 1982; EL-SALHY *et al.*, 1983; BUCHAN, 1984; AGULLEIRO *et al.*, 1985; GAPP *et al.*, 1985; GARCIA AYALA *et al.*, 1987). Células IR a PP não são identificadas em *H. maximiliani*, carência esta também apontada para as espécies de cobras *Vipera aspis* e *Natrix maura* (MASINI, 1988).

As ilhotas pancreáticas na maioria dos répteis são descritas como sendo maiores na porção esplênica do pâncreas (MILLER, 1962; PEREZ-TOMAS, 1989; SARKAR & MAITI, 2011). Enquanto que em *Pseudemys scripta elegans* e *Chrysemes picta* são mais abundante na região duodenal (PUTTI *et al.*, 1991c). As divergências de distribuição das ilhotas pancreáticas ao longo do pâncreas podem ser explicadas pelo fato do órgão, durante o desenvolvimento embrionário, surgir a partir de dois diferentes primórdios pancreáticos, ventral e dorsal (BAETENS *et al.*, 1979). Wieczorek & colaboradores (1998) sugerem também que esta diferenças na concentração de células endócrinas no pâncreas de classes distintas pode ser devido a diferentes tipos de hábitos alimentares.

Na maioria dos répteis, as células  $\beta$  estão localizadas no centro das ilhotas pancreáticas, enquanto que as células  $\alpha$  estão em posição periférica (EL-SALHY & GRIMELIUS, 1981a; EL-SALHY *et al.*, 1983; AGULLEIRO *et al.*, 1985; GAPP *et al.*, 1985; GARCIA AYALA, 1989; PUTTI *et al.*, 1992; STEINER *et al.*, 2010). Em *H. maximiliani*, as células  $\alpha$  e  $\beta$  encontram-se intercaladas como no pâncreas da espécie *Thamnophis sirtalis* (Rhoten, 1984). As diferenças na organização das ilhotas pancreáticas pode ser resultado dos diferentes mecanismos de desenvolvimento, contudo, sugere-se que

possa ser resultado de diferentes necessidades metabólicas e condições fisiológicas (STEINER *et al.*, 2010).

No cágado *H. maximiliani*, as células  $\beta$  são mais numerosas que as células  $\alpha$  ao longo do pâncreas, o mesmo relatado para os quelônios: *Chrysemys d'orbignyi* e *Phrynops hilarii* (CARDEZA, 1957), *Geoemyda pufcherrima* (MILLER, 1962) e *Melanochelys trijuga* (CHANDAVAR & NAIK, 2008). Uma frequência maior de células  $\alpha$  em relação à frequência de células  $\beta$  também já foi descrita dentro da classe reptilia (BONNER-WEIR & WEIR, 1979; FALKMER & OSTBERG, 1977; PEREZ-TOMAS, 1989; CHANDAVAR & NAIK, 2011). Porém, alguns lagartos da família Gekkonidae, demonstraram quantidades similares de células  $\alpha$  e  $\beta$ , ou uma prevalência de células  $\alpha$  (PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989; PUTTI *et al.*, 1991a, b, c; DELLA ROSSA & PUTTI, 1995). Em crocodilianos, as ilhotas da espécie *Alligator mississippiensis* apresentam a metade de células  $\beta$  e outra metade de células não- $\beta$  (MILLER, 1962). Para a subclasse Squamata, pequenas e grandes ilhotas são observadas, sendo a frequência de células não- $\beta$  maior que a de células  $\beta$  (FALKMER & OSTBERG, 1977). É função da INS e do GLUC controlar e manter a homeostase dos níveis de glicose (HSU & CRUMP, 1989).

A principal função da SOM é inibir as secreções de INS e GLUC (HAZELWOOD, 1984; TOBOADA *et al.*, 1985; WILLIAMS & GOLDFINE, 1985; EPPLC & BRINN, 1987;). Em *H. maximiliani* as células IR a SOM são distribuídas de forma isolada ou na periferia dos grupos de células endócrinas, entremeadas nas células produtoras de GLUC, similar ao que acontece em lagartos (EL-SAHLY *et al.*, 1983; PUTTI *et al.*, 1992). Nos quelônios *Testudo graeca*, *Mauremys Caspica* e *Leptachatina lepida* células produtoras de SOM são difusamente distribuída no pâncreas, não sendo observadas nenhuma associação com células IR a INS e GLUC (PEREZ-TOMAS *et al.*, 1989). As células IR a SOM e PP são antagonistas trabalhando no controle das secreções de células de zimogênio (GAPP *et al.*, 1985).

Nenhuma célula IR a PP é identificada no parênquima do pâncreas da espécie *H. maximiliani*, apesar de ser descrita no pâncreas de outros répteis (RHOTEN & SMITH, 1978; EL-SAHLY *et al.*, 1983; AGULLEIRO *et al.*, 1985; GARCIA AYALA *et al.*, 1987, PUTTI *et al.*, 1992).

Células produtoras de 5-HT não são observadas compondo o pâncreas endócrino da espécie estudada. Entretanto, estas células endócrinas são descritas no pâncreas do réptil *Caiman latirostris* e *Trachemys scripta elegans* (YAMADA *et al.*, 1986; KU *et al.*, 2000).

## CONCLUSÕES

- O estudo imuno-histoquímico revelou três tipos de células endócrinas no pâncreas de *H. maximiliani*: células produtoras de INS, GLUC e SOM.
- O estudo fornece dados histológicos e imuno-histoquímicos a serem utilizados como referência na compreensão de alterações histopatológicas que possam afetar o pâncreas de quelônios, facilitando o manejo das espécies. Além disso, permitirá análises comparativas dentro do grupo, fornecendo subsídios para estudos evolutivos futuros.

## CONCLUSÃO GERAL

- A morfologia do pâncreas das espécies *P. geoffroanus* e *H. maximiliani* confirma o padrão de organização comum nos estudos realizados com répteis, onde a porção endócrina encontra-se dispersa entre os acinos pancreáticos formando ou não grupamentos endócrinos semelhantes a ilhotas pancreáticas. Não foi observado tecido conjuntivo distinto separando as ilhotas pancreáticas da porção exócrina circundante.
- A organização celular dos grupamentos endócrinos semelhantes a ilhotas pancreáticas é diferente nas duas espécies estudadas. Em *P. geoffroanus* as células produtoras de insulina posicionam-se no centro dos grupamentos endócrinos, enquanto as células produtoras de glucagon ocupam a periferia. Já na espécie *H. maximiliani* os dois tipos celulares se intercalam, geralmente ao redor de vasos sanguíneos.
- O estudo imuno-histoquímico revelou quatro tipos de células endócrinas no pâncreas de *P. geoffroanus*: células produtoras de INS, GLUC, SOM e PP. Na espécie *H. maximiliani* apenas três tipos celulares foram encontrados: células produtoras de INS, GLUC e SOM.
- A frequência relativa de células endócrinas IR a INS, GLUC, SOM e PP é diferente quando feita comparação do pâncreas das duas espécies de cágados: *P. geoffroanus* e *H. maximiliani*.

- O estudo ajudará no entendimento da fisiologia digestiva das espécies investigadas e fornecer dados histológicos e imuno-histoquímicos a serem utilizados como referência na compreensão de alterações histopatológicas que possam afetar o pâncreas de quelônios, facilitando o manejo das espécies. Além disso, permitirá análises comparativas dentro do grupo, fornecendo subsídios para estudos evolutivos futuros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGID, R.; DUGUY, R. & SAINT GIRONS, H. Variations in the blood sugar, in the liver glycogen and in the histological appearance of the pancreas, in *Vipera aspis*, during the annual cycle. **J Radiol Electrol Med Nucl.**, v. 53, p. 807–824, 1961.
- AGULLEIRO, B.; AYALA, A. G. & ABAD, E. An Immunocytochemical and Ultrastructural Study of the Endocrine Pancreas of *Pseudemys scripta elegans* (Chelonia). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 60, p. 95-103, 1985.
- AHLMAN, H. & NILSSON, O. The gut as the largest endocrine organ in the body. **Annals of Oncology**, v. 12, n. 2, p. S63-S68, 2001.
- ALLEN, T. A. The endocrine pancreas. In: DRAZNER, F. H. **Small animal endocrinology**. New York: Churchill Livingstone, 1987. 508p.
- ARGÔLO, A. J. S. & FREITAS, M. A. Geographic distribution. *Hydromedusa maximiliani*. **Herpetological Review**, v. 33, p. 147, 2002.
- ARIMURA, A.; SATO, H.; DUPONT, A.; NISHI, N. & SCHALLY, A.V. Somatostatin: abundance of immunoreactive hormone in rat stomach and pancreas. **Science**, v. 189, n. 4207, p. 1007-1009, 1975.
- BAETENS, D.; MALAISSE-LAGAE, F.; PERRELET, A. & ORCI, L. Endocrine pancreas: three-dimensional reconstruction shows two types of islets of Langerhans. **Science** v. 206, p. 1323-1325, 1979.
- BAYRAKDAR, A.; YAMAN, M.; ATALAR, O.; TARAKCI, B. G. & CERIBASI, S. Distribution of neuropeptides in endocrine and exocrine pancreas of long-legged buzzard (*Buteo rufinus*): An immunohistochemical study. **Regulatory Peptides**, v. 166, p. 121–27, 2011.
- BEREGI, A.; MOLNAR, V.; FELKAI, F.; BIRO, F. Teknosok rontgendiagnosztikai vizsgalata: 1. Felvetel elkeszitesenek tehnikaja, a teknosok rontgenanatomiaja. **Mávsz.**, Budapest, v. 122, n. 12, p. 723-728, 2000.

- BEREGI, A.; MOLNAR, V.; FELKAI, F.; BIRO, F. Teknosok rontgendiagnosztikai vizsgalata: 2. A radiologiai vizsgalat indikacioci, a koros elvaltozasok rontgenleletei. **Mávsz.**, Budapest, v. 124, n. 1, p. 655-662, 2002.
- BÉRNILS, R. S. & COSTA, H. C. (org.). **Répteis brasileiros: Lista de espécies**. Versão 2012.2. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acesso em: Janeiro de 2012.
- BONNER-WEIR, S. & WEIR, G. C. The Organization of the Endocrine Pancreas: A Hypothetical Unifying View of the Phylogenetic Differences. **General and Comparative Endocrinology**, v. 38, p. 28-37, 1979.
- BRITO, F. M. M. **Aspectos anátomo-radiográficos e tempo do trânsito gastrintestinal em cágados-de-barbicha *Phrynops geoffroanus* Schweigger, 1812 (Testudines, Chelidae)**. 2007. 30f. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias - Saúde animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, MG, 2007.
- BUCHAN, A. M. J. An immunocytochemical study of endocrine pancreas of snakes. **Cell. Tissue Res.** v. 235, p. 657-661, 1984.
- BUCHAN, A. M. J.; LANCE, V. & POLAK, J. M. The endocrine pancreas of *Alligator mississippiensis*: An immunocytochemical investigation. **Cell. Tissue Res.** v. 224, p. 117-128, 1982.
- BURKITT, H. G.; YOUNG, B. & HEATH, J. W. **Wheater Histologia funcional**. 3 ed. Editora: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1994.
- CARDEZA, A. F. Los islotes de Langerhans en la tortuga normal. **Rev. Sot. Argerzt. Biol.**, v. 33, p. 59-66, 1957.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G. & SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, 2002.
- CASTRO, F. C.; FONSECA, C. C.; MENIN, E. & NEVES, M. T. D. Caracterização histológica e detecção de células endócrinas no estômago de peixes de água doce, com diferentes hábitos alimentares. **Biotemas**, v. 16, n. 2, p. 105-130, 2003.
- CECCARELLI, P.; PEDINI, V. & GARGIULO, M. Serotonin containing cells in the horse gastrointestinal tract. **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine**, v. 24, p. 97-99, 1995.
- CHAGAS, A. C. S. & RAPOSO FILHO, J. R. Biologia do comportamento de *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820) (Testudines: Chelidae) na Reserva Biológica Santa Cândida em Juiz de Fora – MG. **Bioscience Journal**, v. 15, n. 2, p. 15-23, 1999.
- CHANDAVAR, V. R. & NAIK, P. R. Localization of glucagon and insulin cells and its variation with respect to physiological events in *Eutropis carinata*. **Acta Herpetologica**, v. 6, n. 1, p. 47-57, 2011.

- CHANDAVAR, V. R. & NAIK, P. R. Immunocytochemical detection of glucagon and insulin cells in endocrine pancreas and cyclic disparity of plasma glucose in the turtle *Melanochelys trijuga*. **J. Biosci.** v. 33, p. 239–47, 2008.
- CHANDAVAR, V.R. & NAIK, P.R. Variation in plasma glucose and pancreatic  $\beta$  cells in the turtle, *Lissemys punctata* (Order: Chelonia; Family: Trionychidae). **Acta Zool.**, v. 85, p. 113-118, 2004.
- COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis brasileiros: Lista de espécies. Herpetologia Brasileira, 2015.
- CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 454p.
- D'ESTE, L.; WIMALAWANSA, S. J. & RENDA, T. G. Amylin-immunoreactivity is co-stored in a serotonin cell sub-population of the vertebrate stomach and duodenum. **Archives of Histology and Cytology**, v. 58, n. 5, p. 537-47, 1995.
- D'ESTE, L.; BUFFA, R.; PELAGI, M.; SICCARDI, A. G. & RENDA, T. Immunohistochemical localization of chromogranin A and B in the endocrine cells of the alimentary tract of the Green frog, *Rana esculenta*. **Cell and Tissue Research**, v. 277, p. 341-349, 1994.
- DELLA ROSA, A. & PUTTI, R. The endocrine pancreas of lacertids: an immunocytochemical study of the genera *Pedioplanis* and *Meroleis*. **Eur. J. Histochem.**, v. 39, p. 47-58, 1995.
- DICKSON, W. M. Glândulas endócrinas. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Fisiologia dos animais domésticos.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856 p
- EL-SALHY, M. & GRIMELIUS, L. The endocrine cells of the gastrointestinal mucosa of a squamate reptile, the grass lizard (*Mabuya quinquetaeniata*). A histological and immunohistochemical study. **Biomedical Research**, v. 2, p. 639-658, 1981a.
- EL-SALHY, M. & GRIMELIUS, L. Histological and immunocytochemical studies of the endocrine pancreas of lizards. **Histochemistry**, v. 12, p. 237-247, 1981b.
- EL-SALHY, M., ABU-SINNA, G., & WILANDER, E. The endocrine pancreas of squamate reptile the desert lizard (*Chalcides ocellatus*): A histological and immunocytochemical investigation. **Histochemistry**, v. 78, p. 391-397, 1983.
- EPPLE, A. & BRINN, J. E. Islet histophysiology: Evolutionary correlations. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 27, p. 320-349, 1975.
- EPPLE, A. & BRINN, J. E. The Comparative Physiology of the Pancreatic Islets. Zoophysiology, vol. 21. Springer-Verlag, New York: Eng, J., and Yalow, R. S. 1987.
- ERNEST, C. H. & BARBOUR, R. W. **Turtles of the world.** Washington: Smithsonian Institution Press, 1989. 313p.



- FACHÍN-TERÁN, A.; VOGT, R. C. & GOMEZ, M. F. S. Food habits of an assemblage of five species of turtles in the Rio Guaporé, Rondônia, Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 29, p. 536-547, 1995.
- FALKMER, S. Origin of the parenchymal cells of the endocrine pancreas: Some phylogenetic and ontogenetic aspects. **Front Gastrointest Res.** v. 23, p. 2, 1995.
- FALKMER, S. & OSTBERG, Y. Comparative morphology of pancreatic islets in animals. In: Volk B. W. & Wellman K. F. **The Diabetic Pancreas** (eds.), New York: Plenum. p. 15-60, 1977.
- FALKMER, S., & PATENT, G. J. Comparative and embryological aspects of the pancreatic islets "Endocrine Pancreas" In: Steiner, D. F. & Freinkel, N. Eds. **Handbook of Physiology**, v. 1, n. 7, p. 1-23. Baltimore: Williams and Wilkins, 1972.
- FOA, P. P.; GALANSINO, G. & POZZA, G. Glucagon, a second pancreatic hormone. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 13, p. 473-503, 1957.
- FRIESS, H.; MALFERTHINER, P.; ISENMANN, R.; KUHNE, H.; BEGER, H. & BUCHELER, M. W. The risk of pancreaticointestinal anastomosis can be predicted preoperatively. **Pancreas**. v.13, n.2, p. 202-8, 1996.
- FUJITA, T. & KOBAYASHI, S. Structure and function of gut endocrine cells. **International Review of Cytology**. Supplement. v. 6, p. 187-233, 1977.
- FURUOKA, H.; ITO, H.; HAMADA, M.; SUWA, T.; SATOH, H & ITAKURA, C. Immunocytochemical component of endocrine cells in pancreatic islets of horses. **Nippon Juigaku Zasshi**, v. 51, p. 35-43, 1989.
- GANONG, W. F. **Fisiologia Médica**. 17 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 578 p.
- GAPP, D. A.; KENNY, M. P. & POLAK, J. M. The gastro-entero-pancreatic system of the turtle, *Chrysemys picta*. **Peptides**, v. 6, n. 3, p. 347-352, 1985.
- GARCIA AYALA A.; LOZANO M. T. & AGULLEIRO, B. Comparative study on the endocrine cells in the pancreas of *Mauremys caspica* (Chelonia) in summer and winter; **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 75,p. 363-75, 1989.
- GARCIA AYALA, A.; LOZANO, M. T. & AGULLEIRO B. Endocrine pancreas of *Testudo graeca* L. (Chelonia) in summer and winter: an immunocytochemical and ultrastructural study. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 68, p. 235-48, 1987.
- GARCIA, S. M. L. & FERNÁNDEZ, C. G. **Embriologia**. 3 ed. Editora: Artmed, Porto Alegre, 2012. 651p.
- GODET, R.; MATTEI, X. & DUPE-GODET, M. Ultrastructure of exocrine pancreas in a sahelian reptile (*Varanus exanthematicus*) during starvation. **Morphol.**, v. 176, p. 131-139, 1983.

- GODET, R.; MATTEI, X. & DUPE-GODET, M. Alterations of endocrine pancreas B cells in a sahelian reptile (*Varanus exanthematicus*) during starvation. **Morphol.**, v. 180, p. 173–180, 1984.
- GOLDSMITH, P. C.; ROSE, J. C.; ARIMURA, A. & GANONGW, F. Ultrastructural localization of somatostatin in pancreatic islets of the rat. **Endocrinology**, v. 97, p.1061–1064, 1975.
- GOVENDIR, M.; CANFIELD, P. J. & CHURCH, D. B. Morphometric Study of the  $\beta$ -cell Volume of the Canine Pancreas with Consideration of the Axis of Tissue Transection. **Anat. Histol. Embryol**, v.28, p. 351-354, 1999.
- GUIX, J. C.; MIRANDA, J. R. & NUNES, V. S. Observaciones sobre la ecología de *Hydromedusa maximiliani*. **Boletín de la Asociación Herpetológica Española**, v. 3, p. 23-25, 1992.
- GUIX, J. C.; SALVATTI, M.; PERONI, M. A. & LIMA-VERDE, J. S. Aspectos da reprodução de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em cativeiro (Testudines, Chelidae). **Grupo Estudos Ecológicos Série Documentos** v. 1, p. 1–19, 1989.
- HASSAN, G. & SHAFI, M. Diffuse endocrinology the (APUD system) anatomical, histological and clinical perspectives. **JKPractitioner**. v. 9, n. 4, p. 260-261, 2002.
- HAZELWOOD, R. L. Pancreatic hormones, insulin glucagon molar ratios, and somatostatin as determinants of avian carbohydrate metabolism. **J. Exp. Zool.**, v. 232, p. 641-652, 1984.
- HELMSTAEDTER, V.; FEURLE, G. E. & FORSSMANN, W. G. Insulin-, glucagon-, and somatostatin-immunoreactive endocrine cells in the equine pancreas. **Cell Tissue Res.** v. 172, p. 447-454, 1976.
- HSU, W. H. & CRUMP. M. H. The endocrine pancreas. In: MCDONALD L. E. & PINEDA, M. H. ed. **Veterinary endocrinology and reproduction**. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. 571p.
- ITO, S.; YAMADA, Y.; HAYASHI, M. & MATSUBARA, Y. Somatostatin containing cells in the rat and horse pancreatic islets. **Tohoku J exp Med**, v. 124, p. 57–64, 1978.
- IUCN, The International Union for Conservation of Nature. **Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>> Acesso em: 05 fevereiro 2017.
- IVERSON, J. B. & COLLEGE, E. **A revised checklist with distribution maps of the turtles of the world**. Indiana: Privately Printed. 1992. 363p.
- IVERSON, J. B. **A Revised Checklist with Distribution Maps of the Turtles of the World**. Privately Printed., 1992. 363p.

- JANSSON, L. & SANDLER, S. The influence of cyclosporin A on the vascular permeability of the pancreatic islets and on diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in the mouse. **Vichows Archiv A Pathol Anat.** v. 412, p. 225-230, 1988.
- JONES, C. W.; REYNOLDS, W. A. & HOGANSON G. E. Streptozotocin diabetes in the monkey: plasma levels of glucose, insulin, glucagon, and somatostatin, with corresponding morphometric analysis of islet endocrine cells. **Diabetes**, v. 29, p. 536-546, 1980.
- JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 12 ed. Editora: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2013. 556p.
- KU, S. K.; LEE, H. S.; LEE, J. H. & PARK, K. D. Immunohistochemistry of the pancreatic endocrine cells of the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). **Korean J Biol Sci**, v. 4, p. 187-193, 2000.
- LI, Y.; HAO, Y.; ZHU J. & OWYANG, C. Serotonin released from intestinal enterochromaffin cells mediates luminal non-cholecystokinin-stimulated pancreatic secretion in rats. **Gastroenterology**, v. 118, p. 1197-1207, 2000.
- LISBOA, C.S.; CHINEN, S.; MOLINA, F.B. Influência da temperatura no período de incubação dos ovos de *Phrynops geoffroanus*(Testudines, Chelidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, p. 392-393, 2004.
- LOPEZ, J. E.; CHEVARRIA, M. & VAZQUEZ, J. J. Histological and immunocytochemical study of the endocrine pancreas of the lizard *Podarcis hispanica* Steindachner, (Lacertidae). **Gen. Comp. Endocr.** v. 71, p. 212-228, 1988.
- LOZANO, M T; GARCIA HERNANDEZ, M. P.; GARCIA AYALA, A; ELBAL, M. T. & AGULLEIRO, B. Identification of the pancreatic endocrine cells of *Pseudemys scripta elegans* by immunogold labeling. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 117, p. 163–172, 2000.
- LUZ, V. L. F.; STRINGHINI, J. H.; BATAUS, Y. S. L.; PAULA, W. A.; NOVAIS, M. N. & REIS, I. J. Morfometria do trato digestório da tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) criada em sistema comercial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 10-18, 2003.
- MASINI, M. A. Immunocytochemical localization of peptides in the endocrine pancreas of the snakes *Vipera aspis* and *Natrix maura*. **Acta Histochem**, v. 84, p. 111-9, 1988.
- MCCROD, W. P.; OUNI, M. J. & LAMAR, W. W. A Taxonomic reevaluation of *Phrynops* (Testudines : Chelidae) with the description of two new genera and a new species of *Batrachemys*. **Rev. Biol. Trop.**, v. 49, n.2, p. 715-69, 2001.
- MEDEM, F. Informe sobre reptiles colombianos (V). Observaciones sobre la distribución geográfica y ecología de la tortuga *Phrynops geoffroana* ssp. en Colombia. **Novedads Colombianas**, v. 1, p. 291-300, 1960.

- MILLER, M. R. Observations on the comparative histology of the reptilian pancreatic islet. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 2, p. 407-414, 1962.
- MITCHELL, M. A. & DIAZ-FIGUEROA, O. Clinical reptile gastroenterology. In: RITZMAN T.K. (eds.) **The Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice Gastroenterology**. Philadelphia: WB Saunders Company, p.277-298, 2005.
- MOLINA, F. B. Chelonia: Introduction, biology, management, free living populations, and projects. In: FOWLER, M. & CUBAS, Z. S. ed. **Biology, medicine and surgery of American wild animals**. Iowa: State University Press, 2001.
- MOLINA, F.B. Comportamento e biologia reprodutiva dos cágados *Phrynops geoffroanus*, *Acanthochelys radiolata* e *Acanthochelys spixii* (Testudines, Chelidae) em cativeiro. **Revista de Etologia**, número especial, p. 25-40, 1998.
- MOLINA, F. B. Mating behavior of captive Geoffroy's side-necked turtles, *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae). **Herpetological Natural History**, v. 4, n. 2, p. 155-160, 1996a.
- MOLINA, F.B. Biologia e comportamento reprodutivo de quelônios. **Anais de Etologia**, v. 14, p. 211-221, 1996b.
- MOLINA, F.B. O comportamento reprodutivo de quelônios. **Biotemas**, v. 5, n. 2, p. 61-70, 1992a.
- MOLINA, F.B. Observações sobre o comportamento agonístico de cágados *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Reptilia, Testudines, Chelidae) em cativeiro. **Biotemas**, v. 5, n. 1, p. 79-84, 1992b.
- MONTEIRO, L. P. & DIEFENBACH C. O. C. Thermal regime of *Phrynops hilarii* (Reptilia, Chelonia). **Boletim de Fisiologia Animal**, São Paulo v. 11, p. 41-50, 1987.
- MONTUEGA, L. M.; GUEMBE, L.; BURRELL, M. A.; BODEGAS, M. E.; CALVO, A.; SOLA, J. J.; SESMA, P. & VILLARO, A. C. The diffuse endocrine system: from embryogenesis to carcinogenesis. **Prog. Histochem. Cytochem.** v. 38, n. 2, p. 155-272, 2003.
- MOORE, K. L. & PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 543 p.
- MOREIRA, G.M. Dados preliminares do projeto de distribuição, status populacional e manejo de quelônios de água doce da Mata Atlântica do Brasil. **Chelonia Neotropica**, v. 1, n. 1, p. 9-11, 1994.
- MOTTA, P. M.; MACCHIARELLI, G.; NOTTOLA, S. A. & CORRER, S. Histology of the exocrine pancreas. **Microsc Res Tech.**, v. 37, p. 384-398, 1997.
- MOURA, L. R.; **Aspectos morfológicos do fígado de tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) e *Phrynops geoffroanus***

- (Schwiegger, 1812) (Testudines, Chelidae). 2009. 59f Dissertação (mestrado, em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, MG, 2009.
- MUKAI, K. Functional pathology of pancreatic islets: immunocytochemical exploration. **Pathol Annu.**, v.18, p. 87-107, 1983.
- MUTOH, H. Review article: transcriptional events controlling the terminal differentiation of intestinal endocrine cells. **Alimentary Pharmacology and therapeutics**. v. 14, n. 1, p. 170-175, 2000.
- NAGAI, H. Configurational anatomy of the pancreas: Its surgical relevance from ontogenetic and comparative anatomical viewpoints. **J Hepatobiliary Pancreat Surg**. v. 10, p. 48-56, 2003.
- NAKAMURA, M.; SHIMADA, T. & FUJIMORI, O. Ultrastructural studies on the pancreatic polypeptide cell of the rat with special reference to pancreatic regional differences and changes induced by alloxan diabetes. **Acta. Anat.**, v. 108, n. 2, p. 193-201, 1980.
- NOVELLI, I. A. **Estudo morfológico (anatômico e histológico) do sistema tegumentar de *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820) (Testudines, Chelidae) e *Phrynops geoffroanus* (Schwiegger, 1812) (Testudines, Chelidae)**. 2011. 66f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.
- NOVELLI, I. A.; GOMIDES, S. C. BRUGIOLO, S. S. SOUSA, B. M. Alimentary habit of *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820) (Testudines, Chelidae) and its relation to prey availability in its environment. **Herpetology notes**, v. 6, p. 503 -511, 2013.
- PEARSE A. The calcitonin secreting C cells and their relationship to the APUD cell series. **J Endocrinol.**, v. 45, p. 13-4, 1969.
- PEREZ-TOMAS, R.; BALLESTA, J.; PASTOR, L. M.; MADRID, J. F. & POLARK, J. M. Comparative immunohistochemical study of the gastroenteropancreatic endocrine system of three reptiles. **General and Comparative Endocrinology**, v. 76, p. 171-191, 1989.
- PETERS, W. K. H. Über *Platemys tuberosa*, eine neue Art von Schildkröten aus British-Guiana. **Monatsber. Akad. Wiss Berlin**, p. 311-313, 1870.
- POLAK, J. M. Hormônios gastrointestinais. In: DANI, R.; CASTRO, L. P. **Gastroenterologia clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, p. 1107-2015, 1993.
- POUGH, F. H. & HEISER J. B. **A vida dos vertebrados**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 798p.
- PRITCHARD, P. C. H. & TREBBAU, P. **The turtles of Venezuela**. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 1984. 403 p.

- PUTTI, R. & DELLA ROSSA, A. PeptideYY and insulin coexist in beta-granules in B cells of the Madagascan lizard *Zonosaurus laticaudatus*. **Gen Comp Endocrinol.**, v. 103, p. 249–256, 1996.
- PUTTI, R.; DELLA ROSA, A.; VARANO, L.; LAFORGIA, V. & CAVAGNUOLO, A. An immunocytochemical study of the endocrine pancreas in three genera of lacertids. **Gen. Comp. Endocr.**, v. 87, p. 249-59, 1992.
- PUTTI, R.; VARANO, L.; DELLA ROSSA, A.; LAFORGIA, V. & CAVAGNUOLO, A. Immunocytochemical study of the endocrine pancreas in some species of Chalcides. **Boll Zool.**, v. 58, p. 107–112, 1991a.
- PUTTI, R.; VARANO, L.; CAVAGNUOLO, A. & LAFORGIA, V. The endocrine pancreas of *Podarcis s. sicula* Raf.: an immunocytochemical study at light and electron microscopic levels. **Eur. J. Basic. Appl. His.**, v. 35, p. 145-59, 1991b.
- PUTTI, R.; VARANO, L.; LAFORGIA, V. & CAVAGNUOLO, A. The endocrine pancreas in some reptilian families: an immunocytochemical study. In: GHIARA, G.; ANGELINI, F. & OLMO, E. (eds) **Collana UZI, selected symposia and monographs**. v. 4. Mucchi: Modena, 1991c.
- PUZYREV, A. A.; IVANOVA, V. F. & KOSTIUKEVICH, S. V. Regularities of cytogenesis in the endocrine gastroenteropancreatic system in vertebrates. *Morfologia*, v. 124, n. 4, p. 11-19, 2003.
- RESNICK, R. H.; SMITH, G. T. & GRAY, S. J. Endocrine influences on tissue serotonin content of the rat. **American Journal of Physiology**. v. 201, p. 571-573, 1961.
- RHOTEN, W. B. Immunocytochemical localization of four hormones in the pancreas of the garter snake *Thamnophis sirtalis*. **Anat. Rec.**, v. 208, p. 233- 242, 1984.
- RHOTEN, W. B. & HALL, C. E. An immunocytochemical study of the cytogenesis of pancreatic endocrine cells in the lizard, *Anolis carolinensis*. **Am. J. Anat.**, v. 163, p. 181-93, 1982.
- RHOTEN, W. B. & SMITH, P. H. Localization of four polypeptide hormones in the saurian pancreas. **Am J Anat** v. 151, p. 595-601, 1978.
- RIBAS, E. R. & MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Distribuição e habitat das tartarugas de água-doce (Testudines, Chelidae) do Estado do Paraná, Brasil. **Biociências**, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 15-32, 2002.
- RINDI, G.; LEITER, A. B.; KOPIN, A. S.; BORDI, C. & SOLCIA, E. The “normal” endocrine cell of the gut changing concepts and new evidences. **Ann N. Y. Acad. Sci.**, v. 1014, p. 1-12, 2004.
- RINDI, G.; RATINEAU, C.; RONCO, A.; CANDUSSO, M.E.; TSAI, M. & LEITER, A. B. Targeted ablation of secretin-producing cells in transgenic mice reveals a common

differentiation pathway with multiple enteroendocrine cell lineages in the small intestine. **Development Cambridge**, v. 126, n. 18, p. 4149-4156, 1999.

RODRIGUES, S. S.; FONSECA, C. C. & NEVES M. T. D. Células endócrinas do sistema gastro-entero-pancreático: Conceitos, distribuição, secreções, ação e controle. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 8, n. 2, p. 171-180, 2005.

SANTOS, G. C. & ZUCOLOTO, S. Células endócrinas gastrointestinais: breve histórico e principais métodos de identificação à microscopia óptica. **Arq. Gastroenterol.** v. 33, n. 1, p. 36-43, 1996.

SARKAR, H., MAITI, B. R. Tinctorial, immunocytochemical and ultrastructural characterizations of the endocrine cell types of the pancreas of the soft-shelled turtle, *Lissemys punctata punctata* (Bonnoterre) (Reptilia:Chelonia). **Italian Journal of Zoology**, v. 78, n. 4, p. 427-443, 2011.

SCHNEIDER, L.; FERRARA, C. R.; VOGT, R. C. & GUILHON, A. V. Nesting Ecology and Nest Predation of *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae) in the Guaporé River of the Brazilian and Bolivian Amazon. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 10, n. 2, p. 206–212, 2011.

SCHONHOFF, S. E.; GIEL-MOLONEY, M. & LEITER, A. B. Minireview: Development and Differentiation of Gut Endocrine Cells. **Endocrinology.**, v. 145, n. 6, p. 2639-2644, 2004.

SCHWEIGGER, A. F. Prodrömus monographiae cheloniorum. Königsberg. Schweigger 1812. **Archives Naturwissenschaften Mathematiks**, v. 1, p. 271-368, 1812.

SLACK, J. M.W. Developmental biology of the pancreas. **Development.**, v.121, p.1569-1580, 1995.

SMITH, E.L.; HIL, R.L. & LEHMAN, I.R., *et. al.* **Bioquímica dos mamíferos**. Rio de Janeiro: 7oed. Guanabara Koogan. 1988. 620p.

SOUZA, F. L. & MARTINS, F. I. *Hydromedusa maximiliani* (Mikan 1825) - Maximilian's snake-necked turtle, Brazilian snake-necked turtle. In: RHODIN, A. G. P.; PRITCHARD, P. C. H.; VAN DIJK, P. P.; SAUMURE, R. A.; BUHLMANN, K. A.; IVERSON, J. B. & MITTERMEIER, R. A. (Eds.). **Conservation Biology of Freshwater Turtle and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group. Chelonian Research Monographic.**, 2009.

SOUZA, F. L. The Brazilian Snake-necked Turtle, *Hydromedusa maximiliani*. **Reptilia**, v. 47, p. 47-51, 2005.

SOUZA, F. L. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa Piracicaba**, v.3, n.1, p. 15-27, 2004.

SOUZA, F. L.; CUNHA, A. F.; OLIVEIRA, M. A.; PEREIRA, G. A. G. & REIS, S. F. Preliminary phylogeographic analysis of the neotropical freshwater

- turtle *Hydromedusa maximiliani* (Chelidae). **Journal of Herpetology**, v. 37, n. 2, p. 427-433, 2003.
- SOUZA, F. L. & ABE, A. S. Feeding ecology, density and biomass of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting a polluted urban river in south-eastern Brazil. **Journal of Zoology**, v. 252, p. 437-446, 2000.
- SOUZA, F. L. & ABE, A. S. Fauna urbana: o cágado e a poluição dos rios. **Ciência Hoje**, v. 25, p. 59–61, 1999.
- SOUZA, F. L. & ABE, A. S. Population structure, activity, and conservation of the neotropical freshwater turtle, *Hydromedusa maximiliani*, in Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 2, p. 521-525, 1997.
- SOUZA, F.L. História Natural do Cágado *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820) no Parque Estadual de Carlos Botelho, SP, Região de Mata Atlântica (Testudines, Chelidae). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. 78p. 1995.
- STEINER, D. J., KIM, A., MILLER, K. & HARA, M. Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition. **Islets**, v. 2:3, p. 135-145, 2010.
- TITLBACH, M. Lichund elektronenmikroskopisthe untersuchungen der langerhansschen inseln von schildkröten (*Testudo graeca*. *Emys orbicularis* L.). **Z. Zellforsch. Mikros. Anat.**, v. 70, p. 21-35, 1966.
- TOBOADA, C.; ABALDI, M.; SUAREZ, M.; ANDRES, D. & FERNANDES, P. Effect of somatostatin on small intestine enzyme activities in rat and chick. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 8, p. 49-51, 1985.
- TWEDT, D. C. Gastrointestinal peptide hormones. In: DRAZNER, F. H. **Small animal endocrinology**. New York: Churchill Livingstone, 1987. 508 p.
- UETZ, P. (ed.), **The Reptile Database**. Disponível em <http://www.reptile-database.org>  
Acesso em: 12 fevereiro, 2017.
- VANNER, S. Myenteric neurons activate submucosal vasodilator neurons in guinea pig ileum. **American Physiological Society - Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 279, p. 380-387, 2000.
- VIEIRA-LOPES, D. A. **Caracterização histológica e histoquímica e detecção por imunohistoquímica de células do Sistema Neuroendócrino Difuso do tubo digestivo da espécie *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudine: Chelidae)**. 2013. 123f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.
- WAGLER, J.G **Natürliches System der Amphibien**. Munich: Cotta, 1830. 354p.



- WIECZOREK, G.; POSPISCHIL, A. & PERENTES, E. A comparative immunohistochemical study of pancreatic islets in laboratory animals (rats, dogs, minipigs, nonhuman primates). **Exp Toxicol Pathol**, v. 50, p. 151-72, 1998.
- WILLIAMS, J. A. & GOLDFINE, I. D. The insulin-pancreatic acinar axis: a review. **Diabetes**, v. 34, p. 186-201, 1985.
- WITTINGEN, J. & FREY, C.F. Islet Concentration in the Head, Body, Tail and Uncinate Process of the Pancreas. **Ann. Surg**, v.179, n.4, p. 412-414, 1974.
- YAGLOV, V. & ELETSKI, Y. K. The morphology and classification of acinar-islet cells of the pancreas. **Arkh. Anat. Gistol. Embriol.**, v. 69, p. 20-23, 1975.
- YAGLOV, V. V. Morphology of the endocrine portion of the reptile pancreas. **Arkh. Anat. Gistol. Embriol.** v. 71, p.89-93, 1976.
- YAMADA, J.; CAMPOS, V. J. M.; KITAMURA, N.; PACHECO, A. C.; YAMASHITA, T. & YANAIHARA, N. An immunohistochemical study of endocrine cells in the pancreas of *Caiman latirostris* (Alligatorinae), with special reference to pancreatic motilin cells. **Biomed. Res.**, v. 7, p. 199-208, 1986.
- YANG, Q. *et al.* Requirement of Math 1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. **Science Washington D C.**, v. 294, n. 5549, p. 2155-2158, 2001.
- YASHIMITA, C. *Hydromedusa maximiliani*. **Ecology. Herpetological Review**, v. 21, n. 1, p. 19, 1990.

## ANEXO A

### Protocolo de Imuno-histoquímica

Preparação das lâminas com o uso de Poly-L-Lysina

Preparação dos cortes histológicos (desparafinização e hidratação)

1. Coloque as lâminas no berço.
2. Coloque o berço no primeiro xilol (por 15 minutos em temperatura ambiente).
3. Escorra as lâminas e coloque no segundo xilol (por 15 minutos em temperatura ambiente).
4. Álcool absoluto 2 x 3 minutos cada.
5. Álcool 95% 3 minutos.
6. Álcool 80% 3 minutos.
7. Álcool 70% 3 minutos.
8. Lavar as lâminas em água corrente.
9. Levar as lâminas para o método de recuperação antigênica.

Objetivos: Restabelecer os sítios antigênicos e eliminar as ligações cruzadas formadas com o formol. Método - Irradiação por Microondas

Incubar as lâminas no tampão citrato em um recipiente apropriado. Levá-lo ao forno de microondas, potência máxima (900 W), por tempo apropriado (3 x 5 minutos) sempre verificando o volume do tampão.

10. Lavar os cortes com tampão de lavagem (PBS) (3 x 3 minutos).
11. Bloqueio da peroxidase endógena  
Imergir os cortes, durante 15 minutos em uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol.
12. Lavar os cortes com tampão de lavagem (PBS) (3 x 3 minutos).
13. Bloquear sítios inespecíficos  
Incubar com soro normal (da espécie em que o anticorpo secundário tenha sido produzido) em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente.
14. Lavar o bloqueador de proteína com tampão de lavagem (2 x por 3 minutos).
15. Incubar com anticorpo primário em câmara úmida, na diluição recomendada.
16. Lavar o anticorpo primário com tampão de lavagem (3 x 3 minutos) na câmara úmida.
17. Incubar com anticorpo secundário biotilado (C) em câmara úmida por 30 minutos.
18. Lavar os cortes com tampão de lavagem (3 x 3 minutos) na câmara úmida.

19. Incubar com o Complexo Avidina Biotina (AB) por 30 minutos em temperatura ambiente (em câmara úmida).
20. Lavar os cortes com tampão de lavagem (3 x 3 minutos).
21. Aplicar a solução de substrato-cromógeno DAB (Em ambiente escuro) por 5 minutos, ou até que o preparado adquira cor acastanhada. Fazer controle pelo microscópio.
22. Lavar em água destilada.
23. Desidratar as lâminas em uma bateria crescente de álcoois: 80%, 95%, 100% (2x) e xilol (2x).
24. Montar as lâminas com lamínula e Entellan.

## ANEXO B



### Anti-Serotonin (5-Hydroxytryptamine, 5-HT)

Developed in Rabbit  
Delipidized, Whole Antiserum

Product No. **S5545**

Lot No. 127H4813

Anti-Serotonin (5-Hydroxytryptamine, 5-HT) is developed in rabbit using serotonin creatinine sulfate complex conjugated to BSA as the immunogen. The antiserum has been treated to remove lipoproteins. Rabbit Anti-Serotonin is supplied as a liquid containing 0.1% sodium azide (see MSDS)\* as preservative.

#### Specificity

Anti-Serotonin (5-HT) specifically stains enterochromaffin cells in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of normal human appendix and serotonin-containing carcinoid tumors. In the central nervous system (CNS), the antiserum reacts with serotonin-containing fibers in perfusion-fixed, free-floating sections of rat brain. Specific staining is inhibited by preincubation of diluted antiserum with 500 $\mu$ M serotonin or 200 $\mu$ g/ml serotonin-BSA. No inhibition of staining is observed with L-tryptophan (L-Trp), 5-hydroxytryptophan (5-HTP), N-acetyl-5-hydroxytryptamine (N-acetylserotonin), or dopamine (3-hydroxytyramine, DA) at a concentration of 500 $\mu$ M.

**Protein Concentration:** 63 mg/ml by Biuret.

#### Working Dilutions

1. A dilution of 1:8,000 was determined by indirect immunohistology using formalin-fixed, paraffin-embedded normal human appendix and serotonin-containing carcinoid tumors.
2. A dilution of 1:5,000 was determined by indirect immunohistology using 4% paraformaldehyde perfusion-fixed, free-floating sections of rat brain. Anti-Serotonin specifically stains 5-HT-containing nerve fibers and varicosities projecting through or lying on the cerebral ventricular ependyma (CVE) in the lateral ventricles. No serotonin-positive fibers are observed in the ventral part of the third ventricle.

In order to obtain best results, it is recommended that each user determine the optimal working dilution for individual applications by titration assay.

#### Description

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a widely distributed neurotransmitter and hormone in the mammalian central nervous system (CNS) and periphery.<sup>1,2</sup> In the CNS, 5-HT is considered an inhibitory neurotransmitter regulating a wide range of sensory, motor and cortical functions. In the periphery, 5-HT is present in neural and non-neural structures, e.g. platelets, gastrointestinal tract (myenteric plexus, enterochromaffin cells), lungs (neuroepithelial cells), thyroid gland, spleen and in mast cells of certain species such as rat and mouse.<sup>2,3,4</sup> 5-HT is involved in the regulation of diverse functions including blood pressure, gastrointestinal motility, pain perception, platelet aggregation, lymphocyte cytotoxicity and phagocytosis, appetite and sleep<sup>2,5</sup> and is implicated in several pathological states including carcinoid tumors, migraine, and hypertension.<sup>6,7</sup> In the CNS, 5-HT has been implicated in several neuropsychiatric disorders such as anxiety, depression and schizophrenia.<sup>7</sup> The majority of serotonergic nerve terminals in the CNS originate in neuronal cell bodies of the raphe nuclei (dorsal, median), nucleus raphe obscurus (NRO) and nucleus raphe pallidus (NRP) in the brainstem<sup>4,8,9,10</sup>, which project to specific areas of the brain and the spinal cord.<sup>9,10</sup> 5-HT is found to co-exist with substance P (SP) in the brain<sup>11</sup> and in nerve terminals in the ventral horn of the spinal cord.<sup>11,12,13</sup> 5-HT is formed by the decarboxylation of 5-hydroxy-tryptophan (5-HTP), its intermediate, which is formed by hydroxylation of L-tryptophan by tryptophan hydroxylase. In the CNS, the action of 5-HT is terminated by reuptake into the pre-synaptic terminal by specific 5-HT transporters. 5-HT is further degraded by monoamine oxidase (MAO). The multiple physiological effects of 5-HT in the CNS and periphery are mediated by at least four receptor classes, 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub>, based on their molecular weights, ligand binding properties and coupling to different signal transduction systems.<sup>14</sup> The

5-HT<sub>3</sub> receptor is a ligand-gated ion channel, whereas the 5-HT<sub>1</sub> subfamily (5-HT<sub>1A-F</sub>) of G-protein coupled receptors have nanomolar affinity for 5-HT and are negatively coupled to adenylate cyclase. Antibodies that react specifically with 5-HT are useful for the study of the mode of action, differential tissue expression and intracellular and subcellular localization of 5-HT in the CNS and peripheral nervous system as well as in neuroendocrine cells in digestive and respiratory systems.

#### Uses

Anti-Serotonin may be used for the detection of 5-HT by immunohistology in sections of formalin-fixed, paraffin-embedded normal gastrointestinal tract and its carcinoid tumors, and in paraformaldehyde-fixed, frozen or Vibratome tissue sections of CNS and peripheral tissue of various species (e.g. rat, cat, porcine, bovine, monkey and human), and may be used in various immunochemical methods such as ELISA and RIA. The visualization of 5-HT in neuronal cell bodies may require pretreatment of the animals with an axonal transport blocker, e.g. colchicine.

#### Storage

For continuous use, store at 2-8°C for a maximum of one month. For extended storage freeze in working aliquots. Repeated freezing and thawing is not recommended. Storage in "frost-free" freezers is not recommended. If slight turbidity occurs upon prolonged storage, clarify the solution by centrifugation before use.

\* Due to the sodium azide content a material safety sheet (MSDS) for this product has been sent to the attention of the safety officer of your institution. Consult the MSDS for information regarding hazardous and safe handling practices.

#### References

1. Azmitia, E., et al., In: Psychopharmacology: The Third Generation of Progress. Meltzer, H.Y. (ed.), Raven Press, New York, NY., (1987).
2. Peroutka, S., Ann. Rev. Neurosci., **11**, 45 (1988).
3. Furness, J., and Costa, M., Neuroscience, **7**, 341 (1982).
4. Verhofstad, A., et al., In: Immunohistochemistry, Practical Applications in Pathology and Biology., Polak, J. and Van Noorden S. (eds.), Wright PSG, London (1983).
5. Richardson, B., and Engel, G., Trends Neurosciences, **9**, 424 (1986).
6. Lundqvist, M., and Wilander, E., J. Pathol., **148**, 141 (1986).
7. Owens, M., and Nemeroff, C., Clin. Chem., **40**, 288 (1994).
8. Steinbusch, H., et al., Neuroscience, **3**, 811 (1978).
9. Steinbusch, H., Neuroscience, **6**, 557 (1981).
10. Millhorn, D., et al., Brain Res., **461**, 169 (1988).
11. Johansson, O., et al., Neuroscience, **6**, 1857 (1981).
12. Hökfelt, T., et al., Neuroscience, **3**, 517 (1978).
13. Tashiro, T., and Ruda, M., Peptides, **9**, 383 (1988).
14. Julius, D., Ann. Rev. Neurosci., **14**, 335 (1991).

1/98

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.  
Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications.  
Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply.  
Please see reverse side of the invoice or packing slip.

**Polyclonal  
Rabbit Anti-Somatostatin**

Immunogen: Synthetic cyclin (1–14) somatostatin conjugated to bovine thyroglobulin

**English  
Code A0566**

Protein concentration g/L: See label on vial.

**Intended use**

For In Vitro Diagnostic Use.

Refer to the *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

**Summary and explanation**

*Introduction*

Somatostatin is one of seven known polypeptide hormones produced in the pancreas. Somatostatin functions as an inhibitory hormone of the neuroendocrine system and is secreted by D-cells of the islets of Langerhans, the fundus and antrum of the stomach and in the upper small intestine. Somatostatin has been demonstrated in sympathetic nerves, mucosal cells, myenteric nerves of the gastrointestinal tract, salivary glands and in some parafollicular cells of the thyroid.<sup>1-5</sup>

*Specificity*

This antibody labels D-cells of mammalian pancreas. Cross-reactivity has been observed with somatostatin from a large number of mammalian species.

**Reagent provided**

Rabbit anti-somatostatin is an unfractionated rabbit antiserum in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.6, and 15 mM sodium azide.

Rabbit anti-somatostatin may be used at a dilution of 1:200 to 1:300 in the LSAB method, determined on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. These are guidelines only; optimal dilutions should be determined by the individual laboratory.

**Materials required, but not supplied**

Refer to the *General Instructions for Immunohistochemical Staining* and/or the detection system instructions.

**Precautions**

1. For professional users.
2. This product contains Sodium azide (NaN<sub>3</sub>), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, NaN<sub>3</sub> may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

**Storage**

Store at 2–8°C.

**Specimen preparation**

*Paraffin Sections*

Rabbit anti-somatostatin can be used on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Pretreatment of tissue with proteolytic enzymes is not required.

**Staining procedure**

Follow the recommended procedure for the detection system selected.

**Staining interpretation**

The cellular staining pattern for anti-somatostatin is cytoplasmic.

**Performance characteristics**

*Normal Tissues*

This antibody identifies somatostatin-containing cells in islet cells originating in pancreatic ductules.<sup>6</sup>

*Abnormal Tissues*

This antibody identifies somatostatin-containing cells in pancreatic tumors and islet cell hyperplasia. Somatostatin-containing cells may also be present in medullary thyroid carcinomas, C-cell hyperplasia, thymic tumors, lung tumors and pulmonary small cell carcinomas.

---

## Français

### Code A0566

Concentration protéinique g/l : Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.

#### Utilisation prévue

Pour diagnostic *in vitro*.

Voir les *Instructions générales pour le marquage immunohistochimique* ou les instructions du système de détection des procédures IHC pour : 1) Principe de la procédure, 2) Matériel requis non fourni, 3) Stockage, 4) Préparation de l'échantillon, 5) Procédure d'immunomarquage, 6) Contrôle de qualité, 7) Résolution des problèmes, 8) Interprétation du marquage, 9) Limites générales.

#### Résumé et explication

##### Introduction

La somatostatine est l'une des sept hormones polypeptidiques connues produites dans le pancréas. La somatostatine est une hormone inhibitrice du système neuroendocrinien, sécrétée par les cellules D des îlots de Langerhans, le fundus et l'antrum de l'estomac et l'intestin grêle supérieur. La présence de somatostatine a été démontrée dans les nerfs sympathiques, les cellules des muqueuses, les nerfs myentériques du tractus gastro-intestinal, les glandes salivaires et dans certaines cellules parafolliculaires de la thyroïde.<sup>1-5</sup>

##### Spécificité

Cet anticorps marque les cellules D du pancréas des mammifères. La somatostatine a montré une réaction croisée avec la somatostatine d'un grand nombre d'espèces de mammifères.

#### Réactifs fournis

L'anti-somatostatine de lapin est un antisérum de lapin non fractionné dans 0,05 mol/L de Tris-HCl à pH 7,6 et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

L'anti-somatostatine de lapin peut être utilisé à une dilution allant de 1:200 à 1:300 par la méthode LSAB<sup>®</sup>, déterminée sur des coupes de tissu fixées au formol et incluses en paraffine. Il ne s'agit là que de recommandations ; les dilutions optimales seront déterminées par chaque laboratoire.

#### Matériels requis mais non fournis

Voir les *Instructions générales pour le marquage immunohistochimique* et/ou les instructions du système de détection.

#### Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien qu'il ne soit pas classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb et en cuivre pour former des dépôts hautement explosifs d'azides métallisés. Lors de l'élimination du produit, rincer à grande eau pour éviter toute accumulation d'azide métallisé dans la tuyauterie.
3. Comme pour tout dérivé biologique, les procédures de manipulation correctes doivent être respectées.
4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

#### Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C.

#### Préparation des échantillons

##### Coupes en paraffine

L'anti-somatostatine de lapin peut être utilisé pour des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine. Le prétraitement des tissus avec des enzymes protéolytiques n'est pas requis.

#### Procédure de coloration

Suivre la procédure recommandée avec le système de détection choisi.

#### Interprétation de la coloration

Le profil de coloration cellulaire de l'anti-somatostatine est cytoplasmique.

#### Caractéristiques de performance

##### Tissus normaux

Cet anticorps identifie les cellules contenant de la somatostatine parmi les cellules insulaires provenant des canalicules pancréatiques.<sup>6</sup>

##### Tissus anormaux

Cet anticorps identifie les cellules contenant de la somatostatine parmi les tumeurs pancréatiques et l'hyperplasie à cellules insulaires. La présence de cellules contenant de la somatostatine a également été observée dans les carcinomes thyroïdes médullaires, l'hyperplasie des cellules C, les tumeurs thymiques, les tumeurs pulmonaires et les carcinomes pulmonaires à petites cellules.

---

## Deutsch

Code-Nr. A0566

Protein-Konzentration g/l: Siehe Produktetikett.

### Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* bzw. den Anweisungen des Detektionssystems entnehmen: (1) Prinzip des Testverfahrens, (2) Zusätzlich benötigte Reagenzien und Zubehör (außerhalb des Lieferumfangs), (3) Lagerung, (4) Probenvorbereitung, (5) Färbeprozedur, (6) Qualitätskontrolle, (7) Störungsbeseitigung, (8) Interpretation des Anfärbens, (9) Generelle Einschränkungen.

### Zusammenfassung und Erklärung

#### Einleitung

Somatostatin ist eines von sieben bekannten, im Pankreas produzierten Polypeptidhormonen. Somatostatin wirkt als ein inhibitorisches Hormon des neuroendokrinen Systems und wird von den D-Zellen der Langerhans-Inseln, des Fundus und Antrums des Magens und des oberen Dünndarms sezerniert. Somatostatin wurde nachgewiesen in sympathischen Nerven, Schleimhautzellen, myenterischen Nerven des Gastrointestinaltrakts, Speicheldrüsen und in einigen parafollikulären Zellen der Schilddrüse.<sup>1-5</sup>

#### Spezifität

Dieser Antikörper markiert D-Zellen des Säugtierpankreas. Es wurde Kreuzreaktivität mit Somatostatin von einer großen Anzahl von Säugetierspezies beobachtet.

### Mitgelieferte Reagenzien

Rabbit Anti-Somatostatin liegt vor als unfraktioniertes Kaninchen-Antiserum in 0,05 mol/L Tris-HCl, pH 7,6, und 0,015 mol/L Natriumazid.

Rabbit Anti-Somatostatin kann für die Bestimmung an formalinfixierten paraffineingebetteten Schnitten mit der LSAB-Methode bei einer Verdünnung von 1:200 bis 1:300 eingesetzt werden. Hierbei handelt es sich lediglich um Leitlinien. Die optimalen Verdünnungswerte sind von dem jeweiligen Labor zu bestimmen.

### Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Siehe *Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* und/oder Anweisungen des Detektionssystems.

### Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid ( $\text{NaN}_3$ ), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann  $\text{NaN}_3$ , obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Ansammlungen von Metall-Aziden führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um eine Anreicherung von Metall-Aziden in Abflussleitungen zu vermeiden.<sup>7,8</sup>
3. Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.
4. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend kommunalen, einzel- und bundesstaatlichen Richtlinien zu entsorgen.

### Aufbewahrung

Bei 2–8°C lagern.

### Vorbereitung der Probe

#### Paraffinschnitte

Rabbit Anti-Somatostatin kann für formalinfixierte paraffineingebettete Schnitte verwendet werden. Eine Vorbehandlung von Geweben mit proteolytischen Enzymen ist nicht erforderlich.

### Färbeverfahren

Das für das ausgewählte Detektionssystem empfohlene Verfahren befolgen.

### Auswertung der Färbung

#### Normalgewebe

Dieser Antikörper identifiziert Somatostatin enthaltende Zellen in Inselzellen, die ihren Ursprung in den Pankreasgängen haben.<sup>6</sup>

#### Anomale Gewebe

Der Antikörper markiert Somatostatin enthaltende Zellen in Pankreastumoren und Inselzell-Hyperplasien. Somatostatin enthaltende Zellen können ebenfalls vorliegen in medullären Schilddrüsenkarzinomen, C-Zell-Hyperplasien, Thymustumoren, Lungentumoren und kleinzelligen Bronchialkarzinomen.

### References

#### Bibliographie

#### Literaturangaben






1. Alumets J, et al. Distribution, ontogeny and ultrastructure of somatostatin immunoreactive cells in the pancreas and gut. *Cell Tiss Res* 1977; 185:465
2. Dubois MP. Immunoreactive somatostatin is present in discrete cells of the endocrine pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72:1340

(111031-001)

303257EFG\_110905 p. 3/4



3. Erlandsen SL, et al. Pancreatic islet cell hormones: Distribution of cell types in the islet and evidence for presence of somatostatin and gastrin in D cell. *J Histochem Cytochem* 1976; 24:883
4. Parsons JA, et al. Central and peripheral localization of somatostatin. Immunoenzyme and immuno-cytochemical studies. *J Histochem Cytochem* 1976; 24:872
5. Civantos F. Gastrointestinal and pancreatic hormones. In: Nadjji M and Morales AR. *Immunoperoxidase Techniques: A practical approach to tumor diagnosis*. Chicago: ASCP Press 1986:56
6. Creutzfeldt W, et al. Pathomorphologic, biochemical and diagnostic aspects of gastrinomas (Zollinger-Ellison Syndrome). *Hum Pathol* 1975; 6:47

<b>REF</b>	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer		Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Consult instructions for use <i>Consulter les instructions d'utilisation</i> <i>Gebrauchsanweisung beachten</i>	 Dako North America, Inc. 6392 Via Real Carpinteria, California 93013 USA  Tel 805 566 6655 Fax 805 566 6688 Technical Support 800 424 0021 Customer Service 800 235 5763	<b>EC REP</b>	Dako Denmark A/S Produktionsvej 42 DK-2600 Glostrup Denmark
	Manufacturer Fabricant Hersteller	<b>LOT</b>	Batch code Code du lot Chargenbezeichnung		Use by Utiliser jusque Verwendbar bis		<b>EC REP</b>	Tel +45 4485 9500 Fax +45 4485 9595
<b>EC REP</b>	Authorized representative in the European Community Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne Autorisierter Repräsentant in der EU			<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum		<b>EC REP</b>	www.dako.com

PT0039/Rev C



3050 Spruce Street  
Saint Louis, Missouri 63103 USA  
Telephone (800) 325-5832 (314) 771-5765  
Fax (314) 286-7828  
email: techserv@sial.com  
sigma-aldrich.com

## Product Information

### MONOCLONAL ANTI-GLUCAGON

Clone K79bB10  
Mouse Ascites Fluid

Product No. G 2654

#### Product Description

Monoclonal Anti-Glucagon (mouse IgG1 isotype) is derived from the K79bB10 hybridoma produced by the fusion of mouse myeloma cells and splenocytes from an immunized mouse. Polymerized porcine glucagon was used as the immunogen. The isotype was determined using Sigma ImmunoType™ Kit (Product Code ISO-1) and by a double diffusion immunoassay using Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Product Code ISO-2).

Monoclonal Anti-Glucagon reacts with pancreatic glucagon in RIA and immunocytochemistry.<sup>1</sup> The affinity constant of  $6.1 \times 10^8$  L/M in RIA. The antibody weakly cross-reacts with gut glucagon (enteroglucagon) in an immunohistological assay. It may be used for the immunocytochemical staining of Bouin-fixed and formalin-fixed, paraffin-embedded pancreatic tissue sections. Cross-reactivity has been observed with glucagon-containing cells in fixed sections of pancreas from human, porcine, dog, rabbit, mouse, rat, guinea pig, and cat. It may also be used in RIA and dot blot technique (native and denatured).

Glucagon is a 29-residue polypeptide hormone (MW 3482), produced in the pancreas.<sup>2</sup> A related hormone, enteroglucagon (or oxyntomodulin), which is produced in the mucosa of the small and large intestine, consists of the 29 amino acid sequence of pancreatic glucagon extended by 8 additional residues at the C-terminus. The biological activities of pancreatic glucagon include glycogenolysis, lipolysis, gluconeogenesis, and ketogenesis, which are antagonistic effects to those of insulin action, thus leading to increased blood glucose levels. Immunocytochemical studies have revealed the presence of pancreatic glucagon inside the A or  $\alpha$  cells, which constitute 15-20% of the islet cell population. These cells are located preferentially at the periphery of the human pancreatic islets. Pathological manifestations of the glucagon-type peptide reside almost exclusively with the existence of tumors or glucagonomas, as no states of glucagon-cell deficiency or hyperplasia have been

identified. Glucagon-specific antibodies would prove useful as an  $\alpha$  cell and tumor markers applying immunohistochemical techniques, and as an analytical tool in quantification of the hormone.

#### Reagents

The product is provided as ascites fluid containing 0.1% sodium azide as a preservative.

#### Precautions and Disclaimer

Due to the sodium azide content a material safety data sheet (MSDS) for this product has been sent to the attention of the safety officer of your institution. Consult the MSDS for information regarding hazards and safe handling practices.

#### Product Profile

A minimum working dilution of 1:2,000 was determined by indirect immunoperoxidase labeling of formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human or animal pancreas.

In order to obtain best results, it is recommended that each individual user determine their working dilution by titration assay

#### Storage

For continuous use, store at 2-8 °C for up to one month. For extended storage, solution may be frozen in working aliquots. Repeated freezing and thawing is **not** recommended. Storage in "frost-free" freezers is **not** recommended. If slight turbidity occurs upon prolonged storage, clarify by centrifugation before use.

#### References

1. Witt, S., et al., Acta Histochem., **Suppl XXXV**, 217 (1988).
2. Lechago, J., and Shah, I., in: Atlas of Diagnostic Immunohistopathology, True, L. (ed.), Chapter 14, J.B. Lippincott Co., Philadelphia (1990)

PCS 02/02

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.  
Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.



**MONOCLONAL ANTI-INSULIN**  
Mouse Ascites Fluid

Product No. I 2018

**Product Description**

Monoclonal Anti-Insulin (mouse IgG1 isotype) is derived from the K36aC10 hybridoma produced by the fusion of mouse myeloma cells and splenocytes from an immunized mouse. Human insulin was used as the immunogen. The isotype was determined using Sigma ImmunoType™ Kit (Product Code ISO-1) and by a double diffusion immunoassay using Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Product Code ISO-2).

Monoclonal Anti-Insulin reacts specifically against insulin in RIA, immunodot and immunocytochemistry.<sup>1-3</sup> The antibody reacts with insulin purified from the pancreas of human, bovine, horse and sheep and with human proinsulin.<sup>3</sup> It may be used for the immunocytochemical staining of Bouin-fixed and formalin-fixed, paraffin-embedded pancreatic tissue sections. It may also be used in RIA and dot blots (native and denatured). The product binds to insulin with an affinity constant of  $8.8 \times 10^9$  L/M in RIA.<sup>1,2</sup> Cross reaction has been observed with insulin-containing cells in fixed sections of pancreas from human, monkey, porcine, dog, rabbit, bovine, sheep, rat, guinea pig, and cat.

Monoclonal Anti-Insulin may be used for the localization of insulin using RIA, dot blot and immunocytochemistry.

Insulin is a 51-amino acid polypeptide composed of A and B chains connected by disulfide bonds.<sup>4</sup> Its precursor, proinsulin, is a single-chain molecule consisting of A and B chains connected through the C-peptide. Proinsulin, which has little biological activity, is cleaved by proteases within its cell of origin into the insulin molecule and the C-terminal basic residue. The main storage sites for insulin and the C-peptide are the pancreatic islets. Insulin is one of the major regulatory hormones of intermediate metabolism throughout the body. The biological actions of this hormone involve integration of carbohydrate, protein, and lipid metabolism. Insulin enhances membrane transport of glucose, amino acids, and certain ions. It also promotes glycogen storage, formation of triglycerides and synthesis of proteins and nucleic acids. The exact mechanism(s) by which insulin achieves these intracellular effects remains somewhat elusive, but is assumed to involve activation of one or more second messengers. Immunocytochemical investigations have

## Product Information

localized insulin in the B or  $\beta$  cells of pancreatic islets of Langerhans. These cells, characterized for many years on the basis of their histochemical and ultrastructural features, comprise 70-80% of the pancreatic islet cells, and are located toward the center of the islets. The hormone is stored inside secretory granules which possess a crystalline core displaying a well-defined periodicity by electron microscopy. Deficiency of insulin results in diabetes mellitus, one of the leading causes of morbidity and mortality in the general population. Insulin is also present in tumors of  $\beta$ -cell origin such as insulinoma. Insulin-specific antibodies prove useful as  $\beta$ -cell and tumor markers using immunohistochemical techniques, and as analytical tools in quantification of the hormone.

**Reagents**

The product is provided as ascites fluid containing 15 mM sodium azide as a preservative.

**Precautions and Disclaimer**

Due to the sodium azide content a material safety data sheet (MSDS) for this product has been sent to the attention of the safety officer of your institution. Consult the MSDS for information regarding hazards and safe handling practices.

**Product Profile**

A minimum working dilution of 1:1,000 is determined by indirect immunoperoxidase labeling of formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human or animal pancreas.

In order to obtain best results, it is recommended that each individual user determine their working dilution by titration assay.

**Storage**

For continuous use, store at 2-8 °C for up to one month. For extended storage, solution may be frozen in working aliquots. Repeated freezing and thawing is **not** recommended. Storage in "frost-free" freezers is **not** recommended. If slight turbidity occurs upon prolonged storage, clarify by centrifugation before use.

**References**

1. Keilacker, H., et al., *Biomed. Biochim. Acta*, **45**, 1093 (1986).
2. Witt, S., et al., *Acta Histochem., Suppl. XXXV*, 217 (1988).
3. Madsen, O., *Diabetes*, **36**, 1203 (1987).
4. Lechago, J., and Shah, I., In: *Atlas of Diagnostic Immunohistopathology*, True, L. (Ed.), Chapter 14, J.B. Lippincott Co., Philadelphia (1990).

PCS 01/02

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.  
Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications.  
Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply.  
Please see reverse side of the invoice or packing slip.

## Rabbit Polyclonal Antibody to Human Pancreatic Polypeptide

<b>Catalog No.:</b>	RP 030, RP 030-05
<b>Intended Use:</b>	This product is intended for qualitative immunohistochemistry with normal and neoplastic formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections, to be viewed by light microscopy. Clinical interpretation of staining results should be accompanied by histological studies with proper controls. Patients' clinical histories and other relevant diagnostic tests should be utilized by a qualified person (s) when evaluating and interpreting results.
<b>Immunogen:</b>	Synthetic human pancreatic polypeptide conjugated to keyhole limpet hemocyanin.
<b>Host:</b>	Rabbit
<b>Format:</b>	Purified immunoglobulin fraction against human pancreatic polypeptide containing sodium azide as a preservative.
<b>Titer/Working Dilution:</b>	This antibody may be diluted to a titer of 1:25-1:50 in an ABC method. The final dilution should be determined by the user based upon the staining conditions employed.
<b>Staining Protocol:</b>	We suggest an incubation period of 30 minutes at room temperature. Optimal incubation conditions should be determined by the user based upon the fixation conditions and staining system employed. <u>Suitable for formalin fixed, paraffin embedded tissue sections.</u>
<b>Specificity:</b>	This antibody reacts with pancreatic polypeptide. It stains the periphery of islets, exocrine pancreatic parenchyma, and the epithelium of small and medium sized ducts and acinar cells.
<b>Positive Control:</b>	Pancreas
<b>Cellular Localization:</b>	Cytoplasmic
<b>Storage:</b>	Store at 2-8°C. Do not use beyond the expiration date stated on the label.

### IVD: For In Vitro Diagnostic Use

DBS will not be held responsible for patent infringement or other violation that may occur with the use of our product

**DBS**

1020 Serpentine Lane, # 114, Pleasanton, CA 94566 Tel: 925 484 3350, Fax: 925 484 3390

Website: [www.dbiosys.com](http://www.dbiosys.com) e-mail: [customersupport@dbiosys.com](mailto:customersupport@dbiosys.com)

## Stable DAB/Plus Liquid Format

<b>Catalog No.:</b>	K 047
<b>Intended Use:</b>	Substrate/chromogen in conjunction with peroxidase-based immunostaining systems.
<b>Introduction:</b>	DAB, a widely used chromogen for immunoperoxidase staining, is well accepted among pathologists because of its increased sensitivity and ability to give cleaner background as compared to amino ethylcarbazole (AEC). Specimens stained in DAB can be dehydrated, cleared, and mounted for permanent record keeping. Stable DAB/Plus is more sensitive and stable than traditional working DAB solutions.
<b>Product benefits:</b>	<p>Stable DAB/Plus offers several noteworthy improvements and benefits as compared with traditional working DAB solutions:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>i) Stable DAB/Plus is much more sensitive, providing the cost-effective option of diluting the primary antibody.</li> <li>ii) Being stable for 2 weeks (as opposed to 6 hours for traditional DAB working solutions), Stable DAB/Plus allows the user the convenience of making one working solution for the entire work week.</li> <li>iii) Hazardous waste generation from spent DAB solution is also significantly reduced.</li> <li>iii) Stable DAB/Plus is ideal for high volume labs and automated stainers.</li> </ul>
<b>Principle:</b>	Peroxidase from the antibody detection system reacts with H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> substrate to degrade it, which then reacts with DAB, precipitating it at positive sites yielding a dark brown color.
<b>Components:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>i) 5mL concentrated amber-colored DAB Chromogen Solution.</li> <li>ii) 200mL clear Stable DAB/Plus Substrate Buffer.</li> <li>iii) One empty mixing dropper bottle.</li> </ul>
<b>Precautions:</b>	DAB, a suspected carcinogen, can cause skin irritation upon contact. Avoid contact with clothes and exposed skin. If contacted, flush immediately with tap water. Follow instructions provided by local authorities for disposal.
<b>Storage:</b>	Store at 2-8°C. Reagents and working solution are light sensitive; protect from exposure to light. Store reagents and working solution in opaque bottle. Do not use beyond the expiration dates stated on the labels.
<b>Working Solution:</b>	<p>Aliquot 1mL of Stable DAB/Plus Buffer in mixing bottle. Add 20µL (one drop) of concentrated Stable DAB/Plus Chromogen. Replace tip and mix.</p> <p><i>Note: The working Stable DAB/Plus solution is stable for at least 2 weeks and should be prepared in an opaque bottle. Store at 2-8°C when not in use. Any solution not used after this period should be discarded.</i></p>
<b>Procedure:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>i) After peroxidase incubation, wash tissue sections with wash buffer.</li> <li>ii) Wipe slides removing excess buffer. Add enough drops of working Stable DAB/Plus solution to cover tissue sections.</li> <li>iii) Incubate for 5-10 minutes at room temperature. For optimal results, observe reaction under the microscope for signal development. Once the desired signal to noise ratio is achieved, stop the reaction by washing slides in buffer.</li> </ul>

### IVD: For In Vitro Diagnostic Use

DBS will not be held responsible for patent infringement or other violation that may occur with the use of our product

# DBS

1020 Serpentine Lane, # 114, Pleasanton, CA 94566 Tel: 925 484 3350, Fax: 925 484 3390

Website: [www.dbiosys.com](http://www.dbiosys.com) e-mail: [customersupport@dbiosys.com](mailto:customersupport@dbiosys.com)