

IMUNOLocalização de Enteroglucagon em Células Endócrinas Presentes no Estômago do Muçua *Kinosternon scorpioides* (REPTILIA, CHELONIA, KINOSTERNIDAE)

IMMUNOLocalization of Enteroglucagon in Endocrine Cells in the Stomach of Scorpion Mud Turtle *Kinosternon scorpioides* (REPTILIA, CHELONIA, KINOSTERNIDAE)

José Gomes Pereira¹
Silvana Regina Silva¹
Mysa Tatiana Corrêa Gonçalves¹
Ferdinan Almeida Melo¹
Diego Carvalho Viana^{2*}
Antonia Santos Oliveira¹
Célio Raimundo Machado³

¹Universidade Estadual do Maranhão, São Luiz, MA, Brasil, josegomesneto@hotmail.com

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP)

³Universidade Estadual de São Paulo, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, Brasil

*Autor para correspondência - josegomesneto@hotmail.com

Resumo:

O muçua ou jurará (*Kinosternon scorpioides*) é um quelônio de pequeno porte de água doce, nativo das varzêas da região amazônica. Essa espécie é importante fonte de alimentação e renda e vem sendo estudada por apresentar vulnerabilidade em consequência da caça indiscriminada, queimadas e desmatamento e, por esta razão, tem sido fonte de pesquisa para o fornecimento de dados para a preservação da espécie. Ainda não é totalmente compreendida a atividade imunohistoquímica das células endócrinas presentes no estômago do muçua. Sendo assim, este trabalho tem por objetivo identificar a presença do hormônio enteroglucagon e classificar as células endócrinas do estômago de muçua. Os fragmentos de estômago foram submetidos à técnica de Hematoxilina-Eosina e da Estreptovidina peroxidase para coloração e detecção do antígeno, respectivamente. Foram encontradas células imunorreativas ao enteroglucagon em uma das três porções gástricas (cárdica, fúndica e pilórica); contudo, nas duas primeiras regiões, a imunoreatividade foi mais evidente do que na última. As células endócrinas do estômago de muçua foram classificadas em argirófilas e argentafins e encontradas entre as células que compõem as glândulas gástricas, sendo classificadas como do “tipo aberta” e do “tipo fechada”. Não houve diferença bioquímica e imunohistoquímica entre o enteroglucagon do *K. scorpioides* com as de outras espécies animais.

Palavras-chave: células endócrinas; imunohistoquímica; Kinosternon; tartaruga.

Abstract:

The scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides*) is a small chelonian, typical of the floodplains of the Amazon. This species is an important source of food and income and it has been studied because of its vulnerability to indiscriminate hunting, deforestation and burning; for this reason, it has been researched in order to supply data for the preservation of the species. The immunohistochemistry activity of endocrine cells present in the stomach of scorpion mud turtle is not totally known. Therefore, the aim of this work was to identify the presence of enteroglucagon hormone and to classify the endocrine cells in the stomach of the scorpion mud turtle. The fragments were submitted to Hematoxylin-Eosin technique and streptavidin peroxidase for staining and detection of antigen, respectively. Immunoreactivity to enteroglucagon in cells was found on the three portions of the stomach (gastric, fundica and pyloric); however, the immunoreactivity was more evident in the first two regions than in the last one. Endocrine cells of stomach were classified as argyrophil and argentaffin and were found among cells that comprise the gastric glands and were classified as “open type” and “closed type”. There is no difference between the biochemistry and immunohistochemistry of enteroglucagon *K. scorpioides* and other animal species.

Keywords: endocrine cells; immunohistochemistry; Kinosternon; turtle.

Recebido em: 06 julho 2014

Aceito em: 04 maio 2015

Introdução

Células endócrinas gastrointestinais estão dispersas ao longo do epitélio e glândulas gástricas do trato alimentar. Essas células produzem muitos ativos biológicos polipeptídeos e amins, alguns deles hormônios, que têm importante função em toda regulação do processo digestivo, como absorção de nutrientes, secreção de glândulas intestinais e associadas, motilidade intestinal e fluxo sanguíneo intestinal. A distribuição regional e frequência relativa dessas células endócrinas varia com a espécie animal e hábitos alimentares. As células do sistema endócrino foram inicialmente localizadas no intestino e pâncreas, receberam a denominação de sistema endócrino difuso. As células do referido sistema foram denominadas de células claras, argentafins e argirófilas. Tal denominação se deu pela afinidade das mesmas pelos corantes⁽¹⁾. Atualmente, as células endócrinas do sistema gastroenteropancreático (GEP) são identificadas por técnicas de imunohistoquímica mais específica (que usam anticorpos para a identificação de antígenos), o que permite a identificação dos mensageiros químicos que secretam⁽²⁾.

Segundo Rehfeld⁽³⁾, o enteroglucagon é um peptídeo secretado por células presentes na mucosa do intestino delgado e tais células apresentam reação cruzada com o soro anti-glucagon. As principais ações desse hormônio incluem estímulo à glicogenólise e lipólise, bem como a inibição da liberação de ácido gástrico e gastrina, inibição da secreção pancreática de enzimas e de HCO₃ hormonalmente estimulado. O glucagon é sintetizado nas células A do pâncreas e regula os níveis séricos de glucose. Células imunorreativas ao glucagon têm sido demonstradas em vários mamíferos e isso foi considerado como a distribuição paterna dessas células no trato gastrointestinal de mamíferos apresentando variações espécie-dependente⁽⁴⁾.

Há poucos relatos sobre os aspectos histológicos do tubo digestivo dos quelônios. Luppa⁽⁵⁾ relatou que as células argirófilas em répteis estão localizadas principalmente na região fúndica e nas glândulas pilóricas, enquanto células argentafins estão presentes na região superior das glândulas fúndicas; Perez-Tomas et al.⁽⁶⁾, estudando o sistema endócrino gastroenteropancreático do *Testudo graeca*, *Mauremys caspica* e *Lacerta lépida*, por meio imuno-histoquímico, constataram a presença de células endócrinas imunorreativas à bombesina, gastrina, glucagon, somatostatina, serotonina, insulina, neurotensina, polipeptídeo pancreático e substância P e PPY e que o estômago de *Testudo graeca* apresenta células ECL, L e D na região cárdica e células D₁ e G na região pilórica. Utilizando microscopia óptica e eletrônica, Ivanova et al.⁽⁷⁾ estudaram o aparelho endócrino do estômago de *Testudo horsfieldi*. Nesse estudo, verificaram a diferença na localização dos endocrinócitos, que estão acumulados predominantemente nas regiões superior e média das glândulas, podendo ocorrer também na superfície epitelial, conforme a comunicação do processo apical desses endocrinócitos com o lúmen da glândula e foram classificados como sendo do “tipo aberto”, enquanto aqueles sem continuidade com a luz foram classificados como do “tipo fechado”. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo identificar a presença do hormônio enteroglucagon e classificar as células endócrinas do estômago de muçã.

Material e Métodos

Este projeto foi realizado nos laboratórios de Anatomopatologia do Curso de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Maranhão. Na presente pesquisa, o material existente de outros projetos de pesquisa, referente aos fragmentos do estômago incluídos em blocos com parafina, foi utilizado. Os exemplares foram adquiridos mediante autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e recursos Renováveis (IBAMA) para coleta do material, de acordo com a licença N° 001/99, processo N° 02012.002400/99-31. Foram utilizados 06 exemplares de muçã adultos de cativeiro em jejum, sendo três machos e três fêmeas. Para eutanásia, foi utilizado o Tiopental sódico 2,5% por via intramuscular conforme protocolo⁽⁸⁻¹¹⁾. Os cortes das três regiões do estômago foram submetidos à técnica da estreptovidina-peroxidase para detecção de antígenos de enteroglucagon presente no epitélio e glândulas do estômago do muçã.

A imunohistoquímica foi utilizada para marcação de enteroglucagon em material embebido em parafina, no órgão estudado, visando correlacionar a presença do hormônio no órgão. Na sequência, as lâminas, contendo cortes parafinados de tecidos, foram desparafinadas em xilol por 20 minutos, hidratadas em soluções de álcoois decrescentes (álcool absoluto, 90°, 80° e 70° respectivamente) e submetidas a um banho em PBS (“Phosphate Buffer Saline”- pH 7,2, 0,01 M) a 10%. Posteriormente, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado, adicionando-se ao banho de PBS o peróxido de hidrogênio (30 volumes diluída a 4% em PBS), por 30 minutos, à temperatura ambiente. As lâminas foram, então, cobertas com solução de bloqueio de sítios de ligações inespecíficas (leite em pó desnatado diluído em PBS -12 g de leite em 200 mL de PBS) e incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Logo após, o anticorpo primário (anticorpo de coelho anti-glucagon, na diluição de 1/50 em BSA – soro albumina bovina) foi adicionado em quantidade suficiente para recobrir os fragmentos, sendo as lâminas incubadas por 18 a 24 horas em câmara úmida a 4 °C. A seguir, o anticorpo secundário biotinilado (anticorpo biotinilado de cabra anti-coelho na diluição de 1/100 - Sistema de detecção Ultra Estreptavidina –

NCL – GLUC_p) foi adicionado e as lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Então, o complexo estreptovidina peroxidase foi adicionado, seguido de incubação por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. A reação foi revelada utilizando-se solução de diaminobenzidina (DAB) a 0,024% em PBS, acrescida de solução de peróxido de hidrogênio 40 volumes a 0,16% em PBS, por cinco minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente e contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris. As lâminas foram então desidratadas em álcoois crescentes (70°, 80° 90° e álcool absoluto), diafanizadas em xilol e montadas com bálsamo sintético. Para cada bateria de 20 lâminas utilizou-se um controle negativo e um positivo. Como controle negativo, utilizou-se PBS, em substituição ao anticorpo primário. Como controle positivo, foi utilizada uma lâmina com corte histológico de estômago de cão.

A identificação de células endócrinas no estômago de *K. scorpioides* foi possível com a utilização das técnicas histoquímicas de Grimelius⁽¹²⁾ em células argirófilas e de Masson-Fontana modificada⁽¹³⁾ em células argentafins. As células argirófilas e argentafins observadas ao longo do estômago foram classificadas como do “tipo aberta” e “tipo fechada”.

Resultados e Discussão

O estômago do *K. scorpioides*, com base nos tipos glandulares encontrados na lâmina própria, pode ser dividido em regiões cárdica, fúndica e pilórica. Morfologicamente, é composto de quatro túnicas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. Não houve diferença entre macho e fêmea quanto à identificação de células endócrinas.

Observações da mucosa gástrica de *K. scorpioides* evidenciaram a presença de grande número de células argirófilas na região fúndica, enquanto nas regiões cárdica e pilórica esse número é reduzido. Contrastando com o esôfago, as células argirófilas estão localizadas entre as células que compõem as glândulas gástricas, podendo ocorrer também no epitélio de revestimento, sendo classificadas em dois tipos, as do “tipo aberto” e as do “tipo fechado”. As primeiras emitem processos citoplasmáticos para a luz da glândula, enquanto as últimas estão localizadas próximas à membrana basal.

A presença de pequena quantidade de células argentafins foi verificada na mucosa gástrica das regiões cárdica, fúndica e pilórica, sendo observado maior número delas na última. De maneira semelhante às células argirófilas, as argentafins estão localizadas entre as células que compõem as glândulas gástricas, sendo, por isso, classificadas como do “tipo aberto” e do “tipo fechado”. As primeiras emitem processos citoplasmáticos para a luz da glândula, enquanto as últimas estão localizadas próximas à membrana basal.

Esses resultados concordam com os de Pereira et al.⁽¹⁴⁾, que estudou histológica e histoquimicamente o tubo digestivo do *K. scorpioides* e relatou que as células argirófilas e argentafins estão localizadas entre as células que compõem as glândulas gástricas. Esses fatos foram também demonstrados nos trabalhos de Luppá⁽⁵⁾, que relatou que as células argirófilas em répteis estão localizadas principalmente na região fúndica e nas glândulas pilóricas e nos de George⁽¹⁵⁾ e Burrell et al.⁽¹⁶⁾, que verificaram que as células argentafins estão presentes na região superior das glândulas fúndicas no estômago de répteis. Esses resultados assemelham-se ao encontrado nesse órgão no *K. scorpioides*.

As células imunorreativas ao enteroglucagon apresentaram menor frequência relativa quando comparadas aos outros hormônios estudados e estavam presentes nas regiões cárdica (Figura 1), fúndica (Figura 2) e pilórica (Figura 3), porém nas duas primeiras regiões o número de células foi moderado, enquanto na última apresentou numerosas células.

Este resultado foi demonstrado por Perez-Tomas et al.⁽⁶⁾ que, estudando o sistema endócrino gastroenteropancreático do *Testudo graeca*, *Mauremys caspica* e *Lacerta lepida* por meio imunohistoquímico, constataram a presença de células endócrinas imunorreativas ao enteroglucagon. Células imunorreativas ao glucagon foram detectadas ao longo do estômago do *G. japonicus*, para o *S. indicus* foi encontrada atividade no íleo e no reto e para a espécie *F. chinensis* no íleo, no reto e raramente na fúndica⁽¹⁷⁾ (Tabela 1). Ku et al.⁽¹⁸⁾ estudaram a distribuição regional e frequência relativa de células endócrinas no trato alimentar de *Trachemys scripta elegans*, por meio de métodos imuno-histoquímicos usando 10 anti-soros. Essas células imunorreativas estavam localizadas na porção basal do intestino, no esôfago e nas glândulas gástricas do estômago. Células imunorreativas ao enteroglucagon foram encontradas ao longo do epitélio do estômago em várias frequências. Esse resultado também foi encontrado no estômago do *K. scorpioides*.

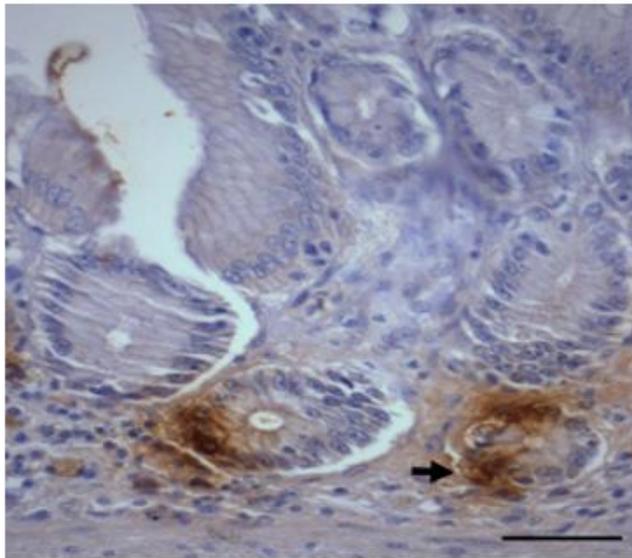


Figura 1: Fotomicrografia com células imunorreativas ao enteroglucagon nas glândulas da região cárdica do estômago de *K. scorpioides* – seta (400X), estreptovidina – peroxidase; 25 μm .

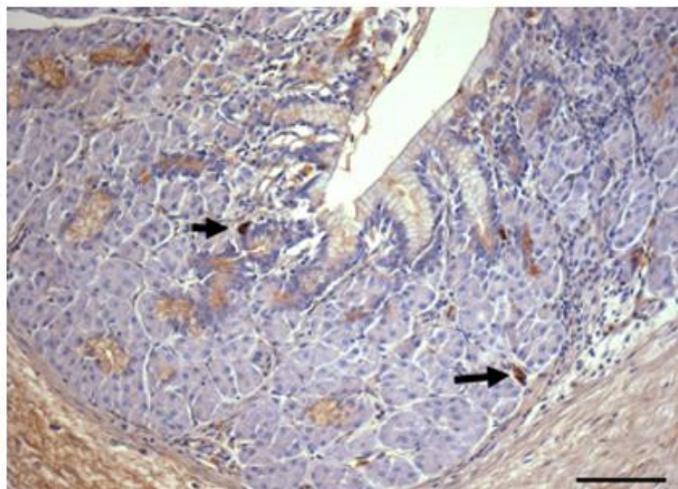


Figura 2: Fotomicrografia com células imunorreativas ao enteroglucagon (setas) nas glândulas da região fúndica do estômago de *K. scorpioides* (200X), estreptovidina – peroxidase; 50 μ m.

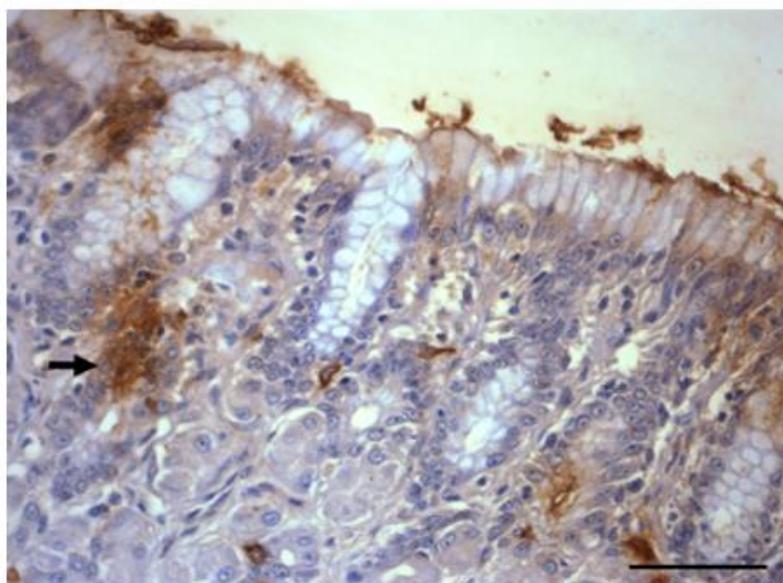


Figura 3: Fotomicrografia com células imunorreativas ao enteroglucagon (seta) nas glândulas da região pilórica do estômago de *K. scorpioides*, estreptovidina – peroxidase. 25 μ m.

Tabela 1: Frequência de imunolocalização do enteroglucagon entre espécies de quelônios

Perez-Tomas ⁽⁶⁾				
Estômago	<i>Testudo graeca</i>	<i>M. caspica</i>	<i>L. lepida</i>	
Glucagon				
Região cárdica	+	++	-	
Região fúndica	+	++	-	
Região pilórica	+++	+++	++	
Huang et al. ⁽¹⁷⁾				
Estômago	<i>G. japonicus</i>	<i>E. chinensis</i>	<i>S. indicus</i>	<i>E. elegans</i>
Glucagon				
Região cárdica	++	-	-	-
Região fúndica	++	+	-	-
Região pilórica	+++	-	-	-
<i>Kinosternon scorpioides</i> (muçua)				
Estômago	Gastrina	Glucagon		
Região cárdica	-	++		
Região fúndica	-	++		
Região pilórica	+++	+++		

Legenda: +++ numerosas células; ++ número moderado de células; + pouca frequência de células e - ausência de células.

Conclusões

As células argirófilas e argentafins estão localizadas entre as células que compõem as glândulas gástricas e são classificadas como do “tipo aberta” e do “tipo fechada”, não havendo diferença bioquímica e imunohistoquímica entre o enteroglucagon do *K. scorpioides* com as de outras espécies animais. Células imunorreativas a enteroglucagon estavam presentes nas regiões cárdica, fúndica e pilórica, porém nas duas primeiras regiões o número de células foi moderado, enquanto a última região apresentou numerosas células.

Referências

1. Basile DR, Novaes RD, Marques DC, Fialho MC, Neves CA, Fonseca CC. Analysis of the morphology and distribution of argentaffin, argyrophil and insulin-immunoreactive endocrine cells in the small intestine of the adult opossum *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). *Tissue Cell*. 2012; 44(5): 301-7.
2. Rodrigues SS, Fonseca CC, Neves MTD. Células endócrinas do sistema gastroenteropancreático: Conceitos, distribuição, secreções, ação e controle. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*. 2005; 89(2): 171-180. Disponível em <<http://revistas.unipar.br/veterinaria/article/view/56/37>>, Acesso em abril 2015.
3. Rehfeld JF. The New Biology of Gastrointestinal Hormones. *Physiological Reviews*. 1998; 78: 1087-1108.

4. Santos CM, Nascimento AA, Peracchi AL, Sales A, Mikalauskas JS, Gouveia SF. Immunocytochemical study of gastintestinal endocrine cells in insectivorous bats (Mammalia: Chiroptera). *Brazilian Journal of Biology*. 2008; 68(3): 663-669. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/bjb/v68n3/a26v68n3.pdf>>, Acesso em abril 2015.
5. Lippa, H. Histology of the digestive tract. In: Gans C, Gans KA. (Eds). *Biology of the reptilia*. New York: Academic Press, 1977. p. 159-223.
6. Perez-Tomas R, Ballesta J, Pastor LM, Madrid JF, Polak JM. Comparative immunohistochemical study of the gastroenteropancreatic endocrine system of three reptiles. *General and Comparative Endocrinology*. 1989; 76(2): 171-191. Disponível em <[http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0016-6480\(89\)90148-2](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0016-6480(89)90148-2)>, Acesso em abril 2015.
7. Ivanova VF, Rossol'ko GN, Puzyrev AA. The endocrine apparatus of the epithelium of the gastric mucosa in the steppe turtle. *Morfologiya*. 1997; 111(1): 85-90. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9156762>>, Acesso em abril 2015.
8. Viana DC, Rui LA, Miglino MA, Araujo LPF, Oliveira AS, Sousa AL. Morphological study of epididymides in the scorpion mud turtle in natural habitat (*Kinosternon scorpioides* - Linnaeus, 1766). *Biotemas*. 2013; 26: 153-162.
9. Viana DC, Anunciacao ARA, Santos AC, Assis Neto AC, Miglino MA, Oliveira CA, Oliveira AS, Sousa AL. Plasma Testosterone and Seasonal Reproductive Changes in the Scorpion Mud Turtle. *Pakistan Journal of Zoology*. 2014; 46: 1641-1650.
10. Viana DC, Santos AC, Araujo LPF, Oliveira AS, Assis-Neto AC, Sousa AL. Body and testicular biometric parameters of the scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides*). *Acta Scientiarum. Biological Sciences (Online)*. 2014; 36: 477-481. Disponível em <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/22824>>, acesso em abril de 2015.
11. Viana DC, Rui LA, Santos AC, Miglino MA, Assis Neto AC, Araujo LPF, Oliveira AS, Sousa A L. Seasonal morphological variation of the vas deferens of scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides*). *Biota Neotropica*. 2014; 14: 1-5.
12. Grimelius L. A silver nitrate for α 2 cells in human pancreatic islets. *Acta Soc Med Ups*. 1968; 74: 243-270.
13. Barbosa AJA, Castro LPF, Nogueira AMF. A simple and economical modification of the Masson-Fontana method for staining melanin granules and enterochromaffin cells. *Stain technology*. 1984; 59(4): 193-196.
14. Pereira, JG, Fonseca, CC, Menin, E, Neves, MTD. Estudo Histológico e Histoquímico do Esôfago do Muçua *Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766 (reptilia, Chelonia, Kinosternidae). *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar*, 2005; 8: 03-10. Disponível em <<http://revistas.unipar.br/veterinaria/article/view/61>>, Acesso em abril 2015.
15. George LL, Catro RRL. *Histologia comparada*. 2.ed. São Paulo: Roca, 1998. 286p.
16. Burrell MA, Villaro AC, Rindi G, Solcia E, Polak JM, Sesma P. An histological and immunocytochemical study of the neuroendocrine cells in the intestine of *Podarcis hispanica* Steindachner, 1870 (Lacertidae). *Cell and Tissue Research*, 1991; 263: 549-556.
17. Huang XG, WU XB. Immunocytochemical study on gastrointestinal endocrine cells of four reptiles. *World journal of gastroenterology*. 2005; 11(35): 5498-5505. Disponível em <http://www.wjnet.com/1007-9327/11/5498.pdf?origin=publication_detail>, Acesso em abril 2015.
18. Ku SK, Lee JH, Lee HS, Park KD. The regional distribution and relative frequency of gastrintestinal endocrine cells in SHK-1 hairless mice: immunohistochemycal study. *Anatomy histology and embryology*. 2002; 31: 78-84. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.14390264.2002.00362.x/abstract;jsessionid=3DC73CD9F7679492C77427337E4694D6.f03t04>>, Acesso em abril 2015.