

Maestría en Anatomía y Fisiología Veterinaria

DE LA CRUZ, J.P.
Determinación de Hor

2008

64972

JORGE P. de la CRUZ



Determinación de hormonas gastrointestinales en el tracto intestinal del pejerrey (*Odontesthes bonariensis*)



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
Facultad de Agronomía y Veterinaria
Departamento de Anatomía Animal

Maestría en Anatomía y Fisiología Veterinaria

**Determinación de hormonas gastrointestinales en el tracto intestinal
del pejerrey (*Odontesthes bonariensis*)**

JORGE P. de la CRUZ

Director de Tesis

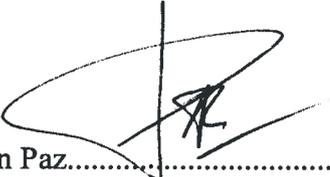
Dr. Dante Paz

64972

MFN:
Classif: T: 496

El presente trabajo fue realizado en la Cátedra de Histología del Departamento de Anatomía Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto y se presenta como requisito para optar al título de **Magister en Anatomía y Fisiología Veterinaria, de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto.**

Director de tesis

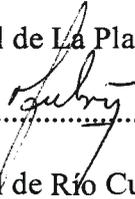
Dr. Dante Agustín Paz.....

Universidad Nacional de Buenos Aires

Tribunal de tesis

Dr. Claudio Barbeito.....

Universidad Nacional de La Plata

Dra. María Teresa Mugnaini.....

Universidad Nacional de Río Cuarto

Dra. María Corigliano.....

Universidad Nacional de Río Cuarto

Río Cuarto, 03 de julio de 2008

A mis padres

A mi familia

Agradecimientos

Al Dr. Dante Paz, por su dirección, sus adecuados consejos y aportes científicos y sobretodo por su franca y valiosa amistad.

A mis compañeros y amigos de Histología y del Dpto. de Anatomía Animal, por su apoyo desinteresado y colaboración.

A mis compañeros y amigos de la Facultad de Agronomía y Veterinaria y de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

A todas aquellas personas, que de una u otra manera hicieron posible la realización de esta tesis.

Profesor Jorge de la Cruz

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen

Introducción

Fundamentación y Antecedentes

Hipótesis

Objetivos

Material y Método

Recolección y procesamiento de muestras

Técnica histoquímica

Técnica de inmunohistoquímica

Observación de los cortes histológicos

Expresión de los resultados

Resultados

Descripción histológica

Estudio histoquímico

Estudio inmunohistoquímico

Discusión

Conclusiones

Perspectivas

Bibliografía

RESUMEN

El pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) es un pez sudamericano de agua dulce, de gran importancia pesquero-deportiva y consecuentemente de relevancia socioeconómica. Su tracto intestinal comprende tres regiones (anterior, media y posterior) compuestas por mucosa, muscular y serosa. La mucosa se caracteriza por la presencia de pliegues de forma, tamaño y número variable. Es el objetivo general de esta tesis determinar, a través de técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica el tipo y distribución de mucinas y de hormonas gastrointestinales, a lo largo del tracto intestinal del pejerrey. Se utilizaron ejemplares adultos recolectados en embalse de Río Tercero-Córdoba-Argentina, de los que se extrajo el tracto intestinal, previo reconocimiento de sus tres regiones. Las muestras fueron fijadas en formol tamponado al 10%, incluidas en parafina y procesadas por la técnica histológica convencional, para luego ser sometidas a técnicas histoquímicas (AB/pH 0,5-2,5 y PAS/AB pH 2,5) y de inmunohistoquímica. Esta última para determinar la presencia de las hormonas gastrina, secretina, motilina y péptido intestinal vasoactivo (VIP). Las preparaciones histológicas analizadas aportaron datos que permiten delimitar un patrón de distribución y grado de reacción variable tanto a lo largo del tracto intestinal como en las diferentes estructuras epiteliales, conectivas y musculares del mismo. Se determinó que las mucinas ácidas predominan en la chapa estriada mientras que las células caliciformes manifestaron grupos neutros, neutros-ácidos y ácidos. En cuanto a las hormonas determinadas, se observó que la gastrina estuvo presente sólo en el intestino anterior y medio; la secretina en todo el tracto intestinal; la motilina en el epitelio de la región anterior y media y en el músculo del intestino posterior; mientras que el VIP fue detectado en el tejido conectivo a lo largo del tracto intestinal. Se concluye que el estudio histológico, histoquímico complementado con el inmunohistoquímico, permitió obtener un patrón de distribución diferencial de distintas sustancias que permiten caracterizar las distintas regiones intestinales y que cumplen un rol importante en el proceso alimentario.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Fundamentación y Antecedentes

El pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) es un pez óseo perteneciente a la Familia Atherinidae, al Suborden Atherinoidei y al Orden Atheriniformes. Es un veloz nadador, de cuerpo fusiforme con irisaciones levemente azuladas. Es una especie dulceacuícola originaria del sur de Brasil y de Argentina, predomina en lagunas de la región pampeana pero penetra en los ríos de los sistemas del Paraná, Uruguay y de La Plata. La acuicultura de este pez comenzó en la laguna de Chascomús (Bs.As.) a comienzos de 1900, en el lago dos Cuadros- RS- Brasil hacia 1943, en Japón desde 1966, en Italia a partir de 1972 y fue introducida en Chile y Bolivia en la década del 40 (Brian y Dyer, 2006). También se lo cría en cautiverio debido a la alta calidad de su carne, a su resistencia a bajas temperaturas y a su aceptación del alimento artificial. Debido a su importancia económica se ha difundido en países como Japón, Francia, Italia e Israel (Mituta, 2001).

La especie motivo de nuestro estudio ha sido indagada desde el punto de vista de su alimentación en diferentes ambientes y lugares, siendo considerado un individuo zooplantófago (Aquino, 1991; Colautti *et al.*, 2003; Grosman, 1995; Ringuelet *et al.*, 1980), con predilección de Cladóceros y Copépodos, sobretodo cuando se lo cría en cautiverio. Hasta el cuarto año de edad; a partir de entonces se observa piscivoría y canibalismo (Ringuelet *et al.*, 1980). También de camarones de agua dulce (*Palaemonetes argentinus*) y caracoles pequeños (Littoridina).

En los peces, en general, se han realizados muchos estudios referente al aspecto anatómico y a las características ultraestructurales relacionándolos con los diferentes hábitos alimenticios (Anderson, 1986; Chitray, 1965; Ezeasor y Stokoe, 1980; Ezeasor, 1986; Kapoor *et al.*, 1975; Kiliaan *et al.*, 1993, 1996; Noaillac-Depeyre y Gas, 1976; Stroband y Debets, 1978; Zhiler, 1982), pero sobre la estructura histológica y en especial sobre las sustancias químicas relacionadas con los hábitos alimenticios es escasa la bibliografía documentada (Fiertak y Kilarski, 2002).

Castagnino *et al.*, (2000, 2001, 2005) llevaron a cabo aplicaciones de lectinas para la identificación de glicoconjugados en el tracto digestivo del pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) observándose que las marcaciones con LCA, Con A y PEA fueron positivas en diferentes estructuras de la mucosa del intestino medio, como chapa estriada y enterocitos, identificándose mediante las mismas los glicoconjugados con manosa y glucosa. STA y WGA reaccionaron en la chapa estriada y los enterocitos del intestino posterior, lo que sugiere la presencia N-acetil glucosamina. En cambio, DBA y SBA dieron reacción intensa en las células caliciformes del intestino medio, prevaleciendo N-acetil galactosamina.. La PNA reaccionó positivamente, principalmente en células caliciformes del intestino anterior, demostrándose la presencia de D-galactosa, mientras que UEA-I resultó negativa a lo largo del tracto intestinal, lo que sugiere la ausencia de fucosa. La técnica de lectinohistoquímica ha permitido una más amplia información sobre la identificación de los glicoconjugados, complementándose con los métodos histoquímicos convencionales (Baglolle *et al.*, 1997; Carmanchahi *et al.*, 2000; Carmona *et al.*, 2000; Ferrari *et al.*, 1999; García Crespo, 1988; Méndez *et al.*, 2003; Montalvo *et al.*, 1967; Piñols Felis, 2000; Tibbets, 1997; Woodward y Bergeron, 1984).

El control de la función gastrointestinal está regulado por dos niveles: a) el sistema nervioso central y endocrino extrínseco y b) componentes nerviosos y endocrinos intrínsecos localizados a lo largo del aparato digestivo que les permite controlar las diferentes funciones de manera autónoma. El sistema intrínseco contiene numerosas neuronas, que se ubican en dos sistemas de ganglios: el plexo submucoso y el plexo mientérico. En estos se encuentran neuronas sensoriales, motoras e interneuronas, a las que llega información sensorial proveniente de los mecanorreceptores que vigilan las contracciones de las paredes musculares, que se encuentran entre las capas circular y longitudinal de la túnica muscular, y de los quimiorreceptores ubicados en la mucosa que controlan las situaciones de cambio, en especial químico, en la luz del tracto digestivo. Los axones de las neuronas motoras terminan en forma arborescente con dilataciones vesiculares cargadas de sustancias neuroreguladoras, secretadas en respuesta a diferencias de potenciales de acción, que actúan sobre los músculos vecinos o sobre las células glandulares (Cunningham, 1995).

Se debe tener en cuenta que las vías gastrointestinales no se consideran como un órgano endocrino típico, aunque produzcan numerosas hormonas, ya que muchas de éstas son

producidas por el cerebro y los tejidos neurales, donde actúan como neuromoduladores o neurotransmisores (Gall *et al.*, 1986; Herness, 1989; Larsen *et al.*, 1981; Rostene, 1984; Kiliaan, *et al.*, 1989.), ya que se ha reconocido la presencia de péptidos gastrointestinales tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico (Costa y Furness, 1982; Dayal, 1991; Sundler *et al.*, 1980). Esto se ha comprobado para la colecistoquinina, el neuropéptido Y (NPY), (Akira *et al.*, 1995; Gall *et al.*, 1986), la somatostatina, (Noailles-Depeyre y Hollande, 1981), la neurotensina, la sustancia P (Killian *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 2005) y el VIP, (Herness, 1989; Killian *et al.*, 1996; Larsen *et al.*, 1981; Rostene, 1984; Witt, 1995).

Tradicionalmente las hormonas gastrointestinales han sido definidas como péptidos producidos por células endocrinas localizadas en la mucosa, submucosa y capa muscular del tracto gastrointestinal, entremezcladas con el epitelio o en la lámina propia o en las terminaciones nerviosas de los plexos o en el músculo. Las mismas son liberados al torrente sanguíneo bajo la influencia de estímulos alimenticios para relacionarse con aspectos referentes a la secreción, motilidad y crecimiento del sistema digestivo; de esta manera la digestión se ve reforzada por éstas provocando secreción hormonal, debido a la distensión de la pared, la presencia de alimentos o el pH bajo (Ross *et al.*, 2005).

Se ha estimado, que en conjunto, las células enteroendocrinas formarían el órgano endocrino más grande de un ser viviente, estando distribuidas en forma aislada no sólo en el aparato digestivo sino también en el aparato respiratorio. Pertenecen a un sistema denominado células endocrinas gastroenteropancreáticas (gap) y presentan una morfología muy semejante a las células neurosecretoras del sistema nervioso central que en algunos casos liberan las mismas hormonas y sustancias reguladoras. Las células enteroendocrinas producen hormonas gastrointestinales como por ejemplo la secretina, la gastrina, el péptido inhibidor gástrico (GIP), la motilina, colecistoquinina y sustancias paracrinas cuya secreción se difunde localmente hacia su célula diana, en vez de ser transportada por el torrente sanguíneo como es el caso de la somatostatina. (Ross *et al.*, 2005).

Las células enteroendocrinas son semejantes, desde el punto de vista morfológico, aunque cada célula secreta sólo un tipo hormonal. Generalmente poseen aspecto columnar o

triangular con la base ancha y vértice puntiagudo con numerosas microvellosidades. La zona de la base celular está ocupada por los gránulos secretorios encargados de almacenar y liberar sus productos; mientras que la zona del vértice está relacionada con la luz intestinal para detectar el contenido luminal. Por medio de marcaciones especiales se llegó a conocer el origen, diferenciación y ritmo de renovación de las células endocrinas del tubo digestivo de la rata (Aiken y Roth, 1992; Cheng y Leblond, 1974).

La colecistoquinina (CCK), liberada en el duodeno y el yeyuno, estimula (reforzando los efectos de la secretina) la liberación de bilis y la secreción de enzimas pancreáticas, lo que favorece la digestión y la absorción de nutrientes en la circulación e inhibe la evacuación gástrica. En cambio el polipéptido pancreático inhibe la secreción exocrina pancreática y estimula el vaciamiento gástrico. (Geneser, 2000). El conjunto de todas estas hormonas y el enteroglucagón, producido en el íleon, contribuyen al crecimiento en grosor de la mucosa del tubo digestivo (Uvnas-Moberg, 1989).

Estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos realizados en intestino de caballos adultos evidenciaron inmunoreactividad positiva a **sustancia P** en fibras nerviosas de la túnica mucosa como así también en cuerpos neuronales y fibras en plexos submucosos y en nervios del plexo mientérico (Domeneghini *et al.*, 2004). También se observó reacción positiva en las células neuronales y fibras nerviosas del tracto intestinal de ponies, más intensa en los cuerpos celulares de los ganglios submucosos que en los ganglios mientéricos (Cummings *et al.*, 1985).

En diferentes especies de peces se han efectuado investigaciones para identificar diversas hormonas gastrointestinales. Rajjo *et al.*, (1988) determinaron la distribución de células inmunoreactivas a colecistoquinina (CCK) en el tracto digestivo de un pez Holósteo, *Amia calva*, de un pez teleósteo, *Lepomis macrochirus* y de un anfibio, la rana toro, *Rana catesbeiana*. En el primer pez hubo positividad sólo en el intestino anterior y medio, mientras que en el estómago y en el resto del tracto gastrointestinal la reactividad fue negativa; en el pez teleósteo las células inmunoreactivas fueron detectadas en el intestino anterior y medio y en el ciego pilórico, mientras que en el anfibio las células positivas se ubicaron

uniformemente a lo largo del intestino anterior y medio, encontrándose también a nivel del estómago y el duodeno.

Ku *et al.*, (2004) identificaron células positivas a serotonina, somatostatina, glucagón, colecistoquinina y polipéptido pancreático en el epitelio del intestino del teleosteo sin estómago *Zacco platypus*, algunas de estas células inmunoreactivas presentaron forma redondeada y estaban ubicadas en la parte basal del epitelio, otras presentaron forma de huso con prolongaciones citoplasmáticas que sobresalían hacia la luz del órgano. No se registraron células positivas a cromogranina A, secretina, VIP, sustancia P y bombesina.

Lee *et al.*, (2004) realizaron estudios inmunohistoquímicos en células endocrinas gastrointestinales de la perca coreana (*Coreoperca herzi*), encontrando células positivas a serotonina, somatostatina, glucagón, colecistoquinina, polipéptido pancreático. La mayoría de las células inmunoreactivas estaban en el epitelio, presentaban forma de huso con una gran prolongación citoplasmática.

Yoshida *et al.*, (1983) detectaron insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático (PP) en el sistema gastroenteropancreático (GEP) de *Paralichtys olivaceus*, observándose a nivel del páncreas células positivas a esas hormonas; mientras que en el tracto digestivo se determinó somatostatina en el estómago; colecistoquinina y gastrina a nivel del apéndice pilórico y colecistoquinina en la porción media del intestino.

En los peces teleosteos con y sin estómago, *Sparus auratus* y *Barbus conchoniis* respectivamente, se identificaron células productoras de hormonas en el sistema gastroenteropancreático (GEP). En el páncreas se identificaron células inmunoreactivas a insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático en ambas especies, al mismo tiempo se pudo distinguir en el tracto digestivo de *S. auratus* varios tipos de células endocrinas (positivas a neurotensina, secretina, serotonina, somatostatina y a dos tipos de sustancia P) exclusivamente en el estómago. En el intestino, a nivel de su epitelio, se detectaron células con gastrina/colecistoquinina, glucagón, met-enkefalina, polipéptido pancreático y sólo un tipo de sustancia P en *S. auratus* mientras que en *B. conchoniis* se observaron las mismas células inmunoreactivas con excepción de la sustancia P (Abad *et al.*, 1987). Por otra parte, se han realizado experimentos de inmunohistoquímica y

radioinmunoensayo en el intestino de diferentes peces para la detección de neurotensina, sustancia P, gastrina/colecistoquinina, bombesina, VIP y serotonina (Kiliaan *et al.*, 1992; Aldman *et al.*, 1989).

En la trucha, se han realizado estudios en el intestino delgado y el ciego para la determinación inmunohistoquímica de colecistoquinina, glucagón, neuropéptido tirosina, etc. (Beorlegui *et al.*, 1992); como así también para conocer la distribución general y localización de células endocrinas presentes en la mucosa gástrica (Barrenechea *et al.*, 1994; Rombout, 1997). Del mismo modo se dieron a conocer resultados sobre la presencia de somatostatina, gastrina y polipéptido pancreático en la mucosa intestinal de peces con y sin estómago (Noaillac-Depeyre y Hollande, 1981).

Karila *et al.*, (1998) y Severini (2000) identificaron sustancia P en los plexos nerviosos mientéricos del intestino del *Atlantic cod*. También se realizaron trabajos en larvas de peces (*Atlantic halibut larvae*), determinando el rol alimentario en dichas larvas ya que la secreción de la CCK libera tripsina pancreática contribuyendo a la digestión proteica (Rojas-García y Ronnestad, 2002).

En reptiles (Perez-Tomas *et al.*, 1989; El-Salhy y Grimelius, 1981) y principalmente en algunas especies de lagartos como *Podarcis hispanica* se han llevado a cabo algunos trabajos sobre células endocrinas en estómago (Díaz de Rada, 1992), intestino (Burrell *et al.*, 1991, 1992) y páncreas (López *et al.*, 1989) encontrando inmunoreactividad positiva. En anfibios tales como la *Rana catesbeiana* se trabajó en fibras nerviosas parasimpáticas presentes en las papilas fungiformes (Inoue *et al.*, 1992).

Las hormonas gastrointestinales funcionan localmente sobre diversos órganos y tejidos dentro del tubo digestivo contribuyendo a la regulación de la secreción, motilidad y crecimiento de dicho tubo (Buddington y Doroshov, 1986; Fujita y Kobayashi, 1977; Grossman, 1981; Solcia, 1981) si bien poco se sabe sobre el mecanismo de acción de las mismas. Así, la gastrina, la secretina, el GIP (Péptido gastrointestinal), el enteroglucagón y la neurotensina lo hacen sobre los epitelios; mientras que otras, tales como la sustancia P, el VIP (péptido intestinal vasoactivo) y el GRP (péptido liberador de gastrina) se asocian a la lámina propia, la submucosa o al tejido muscular. En cambio la colecistoquinina y la somatostatina

actúan sobre el tejido epitelial y otras capas no epiteliales dependiendo del segmento gastrointestinal (Ferri *et al.*, 1983).

Existen otras sustancias que se presentan, del mismo modo, con actividad local y que se han aislado de la mucosa gastrointestinal, son los neurotransmisores o neuromoduladores, ubicándose sobretodo en las terminaciones nerviosas cerca de sus células diana como las células del músculo liso de la muscular de la mucosa y de la muscular externa como así también la túnica media de los vasos sanguíneos, dentro de éstos encontramos al VIP (péptido intestinal vasoactivo), la bombesina y encefalinas (Cunningham, 1995).

En las primeras décadas del siglo XX se llevó a cabo el descubrimiento de la secretina (Bayliss y Starling, 1902), la gastrina (Edkins, 1905), la colecistoquinina (CCK) (Ivy y Oldberg, 1928) y la pancreozimina (Harper y Raper, 1943), las que fueron descritas como sustancias que estimulaban la secreción de enzimas pancreáticas y sólo se conocían a través de sus acciones. Esto permitió introducirse en un campo investigativo importante, y en la década del 60 fueron purificadas la secretina (Jorpes *et al.*, 1962), la gastrina (Gregory y Tracy, 1964), la colecistoquinina-pancreozimina (Jorpes *et al.*, 1964) y se determinó la secuencia de sus aminoácidos. También fueron caracterizados la sustancia VIP (Péptido intestinal vasoactivo) (Cinar y Diler, 2002; Rostene, 1984), GIP (péptido inhibidor gástrico) (Lucini *et al.*, 1999) y la Motilina. (Maala *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2000; Poitras *et al.*, 1996).

Estudios inmunohistoquímicos hicieron posible la identificación de células productoras de gastrina (Mcguigan, 1968) y de otras hormonas gastrointestinales tales como somatostatina, gastrina, histamina, serotonina, secretina, glucagón, neurotensina, motilina. (Geneser, 2000). Estas hormonas se pueden incluir dentro de 2 (dos) familias teniendo en cuenta la secuencia de aminoácidos y su aspecto funcional. Se consideran la familia de la Gastrina que incluye a la gastrina y la colecistoquinina (CCK) y la familia de la Secretina que comprende a la secretina, al glucagón, al GIP y al VIP (Harper, 1998).

Químicamente la gastrina es un polipéptido que presenta diversas fórmulas moleculares, variando desde moléculas grandes con 34 aminoácidos hasta pequeñas con 17 aminoácidos.

Esta hormona es producida y secretada por las células endocrinas G de la mucosa gástrica (antro) y del duodeno proximal. (Sacha Rodríguez, 2006). La secreción gástrica está estimulada por la acción conjunta de la acetilcolina, la gastrina y en menor grado por la histamina. Cuando se produce la ingestión de alimentos, éstos al llegar al estómago provocan impulsos parasimpáticos (por el nervio vago) con liberación de acetilcolina en las inmediaciones de las células G y de las células parietales, que tienen receptores en su superficie para la acetilcolina y responden secretando gastrina y ácido clorhídrico respectivamente. Por otro lado, las células enterocromafines provocarían la liberación de histamina que, del mismo modo, conduciría a la secreción de ácido clorhídrico por parte del estómago (Ross *et al.*, 2005). Su liberación es provocado por sustancias químicas que proceden de la sangre, por terminaciones nerviosas de las células vecinas (paracrinas) o por la distensión del estómago debido al contenido gástrico. Lo que revela la importancia del alimento en la regulación de la formación y liberación de la gastrina (De Groot, 1989; Lichtenberger, 1982) En el estómago de la llama (*Lama glama*) se realizaron estudios inmunohistoquímicos determinándose la presencia de células endocrinas productoras de gastrina (Alzola *et al.*, 2004). Asimismo, Abad *et al.*, (1987) identificaron células positivas a gastrina en el estómago del pez óseo *Sparus auratus*. Mientras que Yoshida *et al.*, (1983) determinaron la presencia de las mismas en el pez *Paralichthys olivaceus*; Holmgren y Nilsson (1983) lo hicieron en fibras nerviosas del intestino posterior y en células endocrinas del intestino anterior y medio del pez *Squalus acanthias*. Konturek *et al.*, (1976) demostraron, en el tracto gastrointestinal de perros, un significativo aumento de concentración de gastrina en suero. Galán Torres *et al.*, (2000) identificaron, en el perro, abundantes células productoras de dicha hormona en la mucosa del estómago y del duodeno y compararon los resultados con los hallados en el hombre. Estudios inmunohistoquímicos complementados con observaciones a nivel de microscopio electrónico, permitieron identificar, en el tracto gastrointestinal de perro, la presencia, distribución y ultraestructura de las células G (Galán *et al.*, 1996). Valverde Marin (1988) determinó por medio de la técnica inmunocitoquímica y ultraestructural células endocrinas en el intestino de la *Rana temporaria*. Linnaeus, 1758. donde correlacionó el producto de secreción y las características ultraestructurales de las células inmunorreactivas para serotonina, somatostatina, CCK 8, gastrina 17, gastrina 34, GIP y bombesina. Jansen y Lamers (1982) estudiaron la relación entre alta concentración de gastrina con secretina y concentraciones de calcio en sangre. Asimismo, Chao *et al.*, (2005) han realizado investigaciones en pacientes con cáncer de colon para determinar la presencia de receptores de hormonas péptidicas como gastrina, bombesina y neurotensina.

La hormona secretina, polipéptido de 27 aminoácidos, está estructuralmente muy emparentada con el VIP, el GIP, el glucagón y otros péptidos. Es producida por la célula S y liberada en duodeno y yeyuno en respuesta a la alta acidificación gástrica dada por el ácido clorhídrico. Estimula la secreción pancreática de bicarbonato a nivel de los ductos pancreáticos y también estimula la secreción de bicarbonato por las vías biliares, dependiendo su secreción del grado de acidificación del contenido duodenal, necesitándose en general un pH cuyo valor sea inferior a 4,5 para su liberación. Esta acción de la secretina aumenta el pH a niveles de neutralidad o levemente alcalino, lo que permite que actúe otra hormona intestinal, la colecistoquinina, provocando la estimulación de los acinos pancreáticos y la consecuente liberación de las enzimas digestivas (Sacha Rodríguez, 2006; Usellini, 1990). Al mismo tiempo la secretina ejerce un efecto inhibitorio sobre la liberación de la gastrina y la secreción ácida del estómago aunque principalmente su mayor efecto lo produce sobre el páncreas exocrino, rico en producción de bicarbonato durante la digestión. Además, juega un papel importante en la secreción de la insulina por parte de las células beta de los islotes pancreáticos como así también de pepsina y mucus gástrico en el estómago y favorece la secreción de agua y electrolitos por parte de la vesícula biliar y la secreción mucosa de las glándulas submucosas del intestino (Guyton y Hall, 2001). Además, se ha investigado si la calidad de la grasa de determinadas dietas influye sobre la secreción de esta hormona gastrointestinal (González *et al.*, 1998). En el tracto digestivo de un pez óseo con estómago se identificó la presencia de células inmunoreactivas a secretina (Abad *et al.*, 1987). En cambio, en el intestino de peces ciprínidos no se detectaron células positivas (Ku *et al.*, 2004).

El VIP (péptido intestinal vasoactivo) es un péptido de 28 aminoácidos con profundas propiedades vasodilatadoras, provoca, además, la relajación de la musculatura gástrica e inhibe la secreción de las enzimas gástricas, mientras que estimula la secreción de insulina, glucagón, somatostatina y biliar. Pederzoli *et al.*, (2004) realizaron la inmunolocalización del VIP y sustancia P durante el desarrollo del intestino en el *Dicentrarchus labrax* (*L*) determinando la presencia y distribución de las mismas. También se identificó VIP en la mucosa del tracto intestinal en fetos de caballo (Dauria *et al.*, 2005), en equinos adultos (Bishop *et al.*, 1984) y en diferentes estructuras y tejidos del caracol de tierra *Helix aspersa* (de la Cruz *et al.*, 2006). Holmgren y Nilsson (1983) demostraron, en el pez squalus, la inmunoreactividad del péptido intestinal vasoactivo (VIP). Es el único péptido en el intestino que actúa por la vía del AMPcíclico y juega un importante rol como neuromodulador. Otros autores han determinado inmunohistoquímicamente la presencia del VIP, en mamíferos, a lo largo del tracto gastrointestinal, desde el esófago hasta el recto (Ferri *et al.*, 1983), como así

también en tejido neural y células endocrinas del intestino de peces (Cinar y Diler, 2002; Kilian *et al.*, 1996, 1997). En el íleon del cobayo se ha revelado la presencia de esta hormona gastrointestinal en el cuerpo de las neuronas del plexo nervioso submucoso como así también en los axones terminales del ganglio submucoso (Li *et al.*, 1995). Por otra parte, Keranen *et al.*, (1995) determinaron la localización del VIP en el plexo mientérico y en los nervios de la muscular circular interna del colon humano. Mientras que Berezin *et al.*, (1994) identificaron dicha hormona en el íleon y el colon de perros, especialmente en la túnica muscular externa. También en el tracto gastrointestinal, incluyendo intestino delgado, grueso y esfínteres, de gatos y perros se ha detectado la presencia del VIP, específicamente, en los plexos nerviosos submucoso y mientérico, en algunos nervios, y en células no nerviosas dispersas entre las capas musculares lisas (Ny *et al.*, 1997). En cambio, en intestino delgado y grueso de ratas se identificó la presencia de esta hormona, sólo en las neuronas del plexo nervioso submucoso (Chino, *et al.*, 2002). En Investigaciones realizadas en intestino de fetos humanos, se compararon la distribución del VIP en las fibras nerviosas durante la vida fetal y en la etapa adulta (Vincze *et al.*, 2000). Asimismo, en el tracto gastrointestinal del pitón se determinaron las concentraciones de esta hormona en estómago y en intestino delgado (Secor, 2001).

La motilina está formada por 22 aminoácidos, se segrega cada 100 minutos para estimular el complejo motor migratorio que ayuda a limpiar el estómago e intestino delgado de material sin digerir (Chan-Palay *et al.*, 1982; Fang *et al.*, 2004). Se realizaron estudios en estómago y duodeno de humanos para determinar su rol en la motilidad del tracto gastrointestinal (Kawamura *et al.*, 1993). Por otro lado, se efectuaron investigaciones en intestino de cerdos sometidos a períodos de ayuno (Katayama *et al.*, 2005). Algunos efectos de la motilina sobre la secreción exocrina ha sido descrita por Fiorucci (1993), hallando que en el hombre se asocia con la secreción de las glándulas salivales, en cambio, en el perro estimula la secreción de pepsinógeno y del páncreas. Depoortere (1995), Feighner *et al.*, (1999) y G Van Assche *et al.*, (1995) han demostrado la presencia de receptores de motilina en el músculo liso de duodeno y colon humano. Situación similar fue hallada en tejido neural y muscular de duodeno y colon de conejos (Clark *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2000; Poitras *et al.*, 1996), en duodeno de cobayo y perro (Poitras *et al.*, 1987) y en el tracto digestivo de aves (Kitazawa *et al.*, 1995). Mientras que estudios inmunohistoquímicos y de microscopía electrónica determinaron la localización de células endocrinas con motilina en el epitelio duodenal de conejo (Fujimiya *et al.*, 1998). En ratas (O'Donohue *et al.*, 1990; Sakai *et al.*, 2003) se identificaron células inmunopositivas a motilina en el epitelio de las vellosidades y criptas del

intestino delgado. Secor, (2001) demostró en el tracto gastrointestinal del pitón la presencia de motilina. Shin *et al.*, (1980), analizaron la heterogeneidad de motilina inmunoreactiva en extractos de duodeno de cerdo, rata, perro y humano. En intestino de humano y de perro se ha logrado identificar ultraestructuralmente y por inmunocitoquímica la presencia de células endocrinas con motilina (Usellini *et al.*, 1984); en equinos (Sasaki y Yoshihara, 1999). Nishikubo *et al.*, (2005) identificaron células positivas a motilina en duodenos de niños prematuros de veintidós semanas de gestación. Asimismo en intestino delgado, ciego y colon de búfalos de diferentes edades se estudió la distribución de distintas poblaciones celulares endocrinas, entre ellas las que secretan motilina (Lucini *et al.*, 1999).

El presente trabajo se centró en el estudio del tracto intestinal del pejerrey cumplimentando los aspectos estructurales e histoquímicas con los relacionados a la determinación inmunohistoquímica de algunas de las hormonas gastrointestinales. Dado que iguales antecedentes no obran en la bibliografía contemporánea en relación a la especie *Odontesthes bonariensis*, es conducente investigar sobre el particular partiendo de la base que, en nuestra región, estos teleósteos, verdaderas especies autóctonas, guardan un potencial económico de significativa importancia para su comercialización por lo que es necesario ampliar y clarificar los múltiples aspectos que involucra el proceso digestivo de estos peces.

Hipótesis

En el pejerrey existe una distribución diferencial de las células que sintetizan gastrina, secretina, motilina y péptido intestinal vasoactivo (VIP) a lo largo del tracto intestinal que está correlacionada con las diferentes funciones de las distintas porciones del mismo.

OBJETIVOS

Objetivo General

- **Determinar** la presencia y distribución de mucinas neutras y/o ácidas como así también las hormonas gastrointestinales gastrina, secretina, motilina y VIP (péptido intestinal vasoactivo) a lo largo del tracto intestinal del pejerrey.

Objetivos Específicos

- **Evaluar** la capacidad de los anticuerpos empleados para reconocer gastrina, secretina, motilina y péptido intestinal vasoactivo (VIP) en el tracto intestinal del pejerrey.
- **Identificar** la distribución de las células que sintetizan estas hormonas a lo largo del tracto intestinal tratando de reconocer diferencias que pudieran ser atribuidas a las distintas funciones de las diferentes partes del intestino.
- **Determinar** la presencia, tipo y distribución de mucinas en chapa estriada y células caliciformes en las diferentes regiones del intestino.
- **Comparar** los resultados obtenidos con los reportados para otras especies de peces, analizando si existen diferencias que pudieran estar relacionadas con los distintos hábitos alimenticios.

MATERIAL Y MÉTODO

MATERIAL Y MÉTODO

Recolección y procesamiento de muestras

Se estudiaron 39 (treinta y nueve) ejemplares de pejerreyes adultos evaluados por inspección gonadal (Strüssmann *et al.*, 1996a; 1996b y 1997) capturados con red o mediomundo en Embalse de Río Tercero (Córdoba). Las muestras se tomaron inmediatamente extraídos los animales de su hábitat y se procesaron de la siguiente manera: se cortaron segmentos de 1 cm. de cada región del tracto intestinal (intestino anterior, intestino medio e intestino posterior). Las muestras fueron fijadas en formol tamponado al 10 % (Fox *et al.*, 1985) durante 24 hs. y/o Líquido de Bouin (Romeis, 1989) entre 8 a 12 hs. Los fijadores usados se caracterizan por preservar la morfología celular y por no interferir con la reacción antígeno-anticuerpo, entre otras cualidades (Robinson *et al.*, 1990). Posteriormente las muestras se procesaron por la técnica histológica convencional siguiendo los pasos de la inclusión en parafina, los cortes y el montaje en los portaobjetos. Con una serie de cortes, se continuó con los pasos de la técnica histológica convencional para ser coloreados con la coloración de Hematoxilina y Eosina (H/E), mientras que a los cortes histológicos restantes se los sometió a las técnicas de histoquímica convencional y a la de inmunohistoquímica, respectivamente.

Técnica histoquímica

Las coloraciones usadas fueron:

- Alcian Blue a pH 2,5 (AB 2,5) para determinar simultáneamente grupos carboxilos y ésteres sulfatos presentes en los glicoconjugados (Spicer y Schulte, 1992).
- Alcian Blue a pH 0,5 (AB 0,5) para la caracterización selectiva de glicoconjugados sulfatados (Spicer y Schulte, 1992).
- Una combinación del Ácido Periódico Schiff y Alcian Blue a pH 2,5 (PAS/AB 2,5) para la diferenciación de grupos neutros y ácidos de los glicoconjugados (Mowry, 1956).

Técnica de Inmunohistoquímica

Para la determinación de las hormonas gastrointestinales (gastrina, secretina, motilina y VIP) se aplicó el método indirecto denominado ABC: Complejo Avidina-Biotina (Polak y Van Noordam, 1986; Larsson, 1993; Vissio, 2000; Paz, 2000; Hsu *et al.*, 1981; Gimeno *et al.*, 1997). Para la aplicación de esta técnica los preparados histológicos procesados se colocaron en estufas a 37° durante 24-48 h. A continuación se llevó a cabo el desparafinado en xilol e hidratación en alcoholes de graduación decreciente para posteriormente someter los cortes a lavados con solución buffer fosfato (PBS). Luego se efectuó el bloqueo de la peroxidasa endógena de los tejidos con baños en agua oxigenada de 30 vol. al 10 %. El paso siguiente fue el bloqueo de adherencias inespecíficas, es decir, bloquear los sitios reactivos de las proteínas para evitar marcación inespecífica (disminuir el “background”), para ello se cubrieron los cortes con suero normal de caballo diluido con PBS (4 gotas en 10ml de PBS) durante 20’ (Paz, 2000). Luego se procedió a la incubación con el anticuerpo primario o específico no conjugado en una dilución 1/200 que se unirá al antígeno que corresponden a las hormonas a estudiar (gastrina, secretina, motilina y VIP) durante toda la noche a 4° en cámara húmeda. A continuación se incubó con el anticuerpo secundario biotilado durante 60 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda para luego proceder a la incubación con el complejo avidina peroxidasa durante 60 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda, (Vissio, 2000; Chaves, 2001). Posteriormente se determinó la presencia de la peroxidasa marcadora de anticuerpo primario en el tejido en estudio, utilizando como revelador un cromógeno de gran especificidad para la peroxidasa como es la diaminobencidina (DAB). Una vez obtenida la intensidad del revelado deseado, se detuvo la reacción lavando con agua corriente. Por último se llevó a cabo en los preparados histológicos la coloración de contraste con hematoxilina, para luego realizar el montaje de los mismos y posterior observación al microscopio óptico.

Observación de los cortes histológicos

Con un microscopio óptico (Orthoplan-Leitz) con cámara fotográfica anexada (Leica), se procedió a la observación, análisis, interpretación y obtención de datos e imágenes de los preparados histológicos (sometidos a distintas técnicas de estudio) correspondientes a las diferentes regiones del tracto intestinal (intestino anterior, medio y posterior).

Se analizó la distribución de las células que sintetizan los distintos péptidos, a lo largo del tracto intestinal, evaluando si se verifica una distribución diferencial que pueda ser correlacionada con la posible función de estos péptidos en el pejerrey.

Expresión de los resultados

Los resultados obtenidos, por medio del estudio histoquímico de los datos referentes a chapa estriada y células caliciformes, y del estudio inmunohistoquímico de chapa estriada y células caliciformes, se expresaron en forma cualitativa: reacción negativa (-); débil reacción (+); moderada reactividad (++) e intensa reactividad (+++). La subjetividad de estas evaluaciones se trataron de minimizar con la observación de, por lo menos, tres investigadores.



RESULTADOS

RESULTADOS

Descripción histológica

El tracto intestinal del pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), desde el punto de vista anatómico se divide en tres regiones: anterior o pilórica, media y posterior o recto. En cada una de las tres regiones se distinguen una túnica mucosa, una muscular y una serosa. La túnica mucosa presenta pliegues de forma, tamaño y número diversos.

En el intestino anterior, los pliegues son largos, rectos, longitudinales y van ocupando la luz del órgano. Están revestidos de un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con células caliciformes y microvellosidades (Fig. 1). En el intestino medio, los pliegues se van haciendo más largos, abundantes y flexuosos y poseen un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con células caliciformes y microvellosidades (Fig. 2). Estas características van disminuyendo gradualmente hacia la región posterior o intestino posterior, donde los pliegues son más cortos, menos flexuosos y el epitelio presenta mayor cantidad de células caliciformes (Fig. 3).

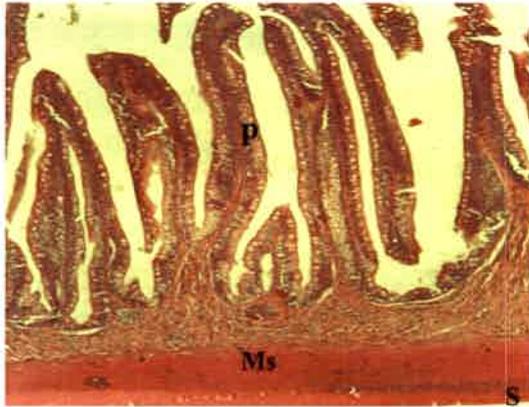
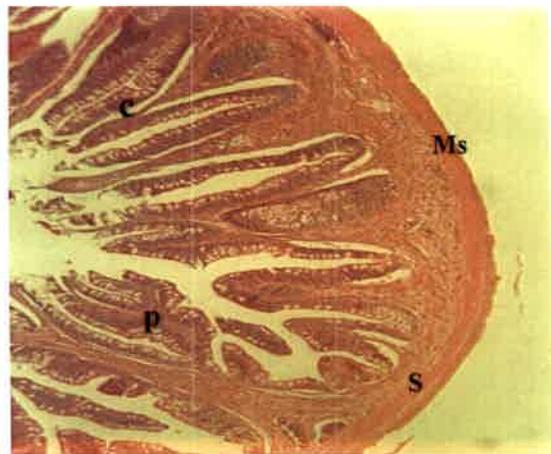
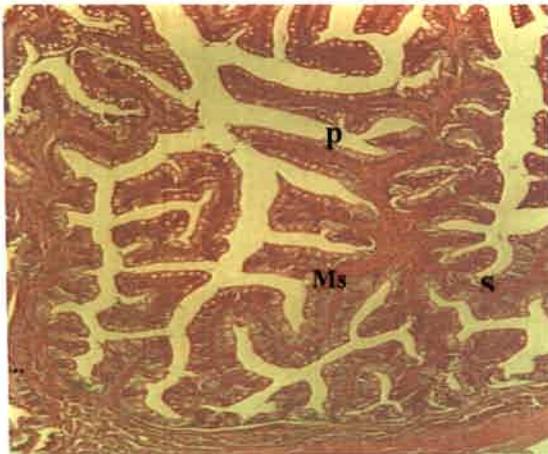


Fig. 1.- Microfotografía de Intestino Anterior. (H/E). Mucosa con pliegues largos y rectos (p), Muscular (Ms) y Serosa (S). (6x).



Estudio histoquímico

- **Alcian Blue pH 2,5 (AB 2,5)**

Intestino Anterior: se identificó reacción moderada en chapa estriada mientras que las células caliciformes expresaron distintos grados de reactividad, a saber: ácidas, débilmente ácidas y negativas (Tabla 1 y Fig. 4 y 5).

Intestino Medio: la chapa estriada evidenció intensa positividad, en cambio algunas células caliciformes expresaron la presencia de mucinas débilmente ácidas y otras reaccionaron negativamente (Tabla 1 y Fig. 6).

Intestino Posterior: la presencia de mucinas ácidas se manifestó en chapa estriada mientras que las células caliciformes reaccionaron negativamente (Tabla 1 y Fig. 7).

- **Alcian Blue pH 0,5 (AB 0,5)**

Intestino Anterior: Se identificó intensa reacción en chapa estriada mientras que la mayoría de las células caliciformes expresaron ausencia de grupos ácidos (Tabla 1 y Fig. 8).

Intestino Medio: la positividad se observó principalmente en chapa estriada (Tabla 1 y Fig. 9).

Intestino Posterior: la chapa estriada evidenció reacción moderada mientras que las células caliciformes expresaron distintos grados de reactividad, lo que determinó la presencia de mucinas ácidas y débilmente ácidas (Tabla 1 y Fig. 11 y 12).

- **Ácido periódico Schiff y Alcian Blue pH 2,5 (PAS/AB 2,5)**

Intestino Anterior: en los pliegues intestinales se destaca la presencia, en las células caliciformes, de mucinas neutras, neutras-ácidas y ácidas (Tabla 1 y Fig. 13 y 14).

Intestino Medio: las células caliciformes reaccionaron positivamente manifestando la presencia de grupos ácidos, neutros-ácidos y neutros (Tabla 1 y Fig. 15 y 16).

Intestino Posterior: se observó intensa reacción en las células caliciformes destacándose la presencia de mucinas neutras-ácidas (Tabla 1 y Fig. 17).

Tabla 1.- Expresión de chapa estriada y células caliciformes del tracto intestinal del pejerrey a la técnica de histoquímica Alcian Blue pH 2,5 – 0,5 y a la de PAS/Alcian Blue pH 2,5.

Tinciones	Estructura	Intestino Anterior	Intestino Medio	Intestino Posterior
Alcian Blue pH 2,5	Chapa estriada	++	+++	+++
	Células caliciformes	+++	+	-
Alcian Blue pH 0,5	Chapa estriada	+++	+++	++
	Células caliciformes	-	-	+++
PAS/Alcian Blue pH 2,5	Chapa estriada	+	+	+
	Células caliciformes	+++	+++	+++

Referencias: (+++) intensa reacción negativa (++) moderada reacción (+) débil reacción (-) reacción

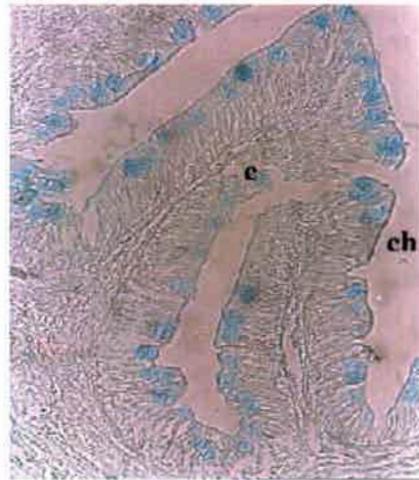


Fig. 4.- Microfotografía de Intestino Anterior AB/pH 2,5. Se observa chapa estriada (++) (ch) y células caliciformes (+++) (+) (c) (25X)

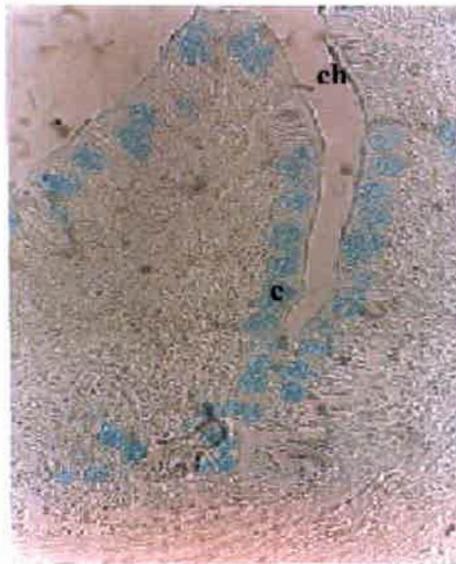


Fig. 5.- Microfotografía de Intestino Anterior AB/pH 2,5. Se observa chapa estriada (++) (ch) y células caliciformes (+++) (+) (c) (25X)



Fig. 6- Microfotografía de Intestino Medio AB/pH 2,5. Se observa chapa estriada (+++) (ch) y células caliciformes (+) (-) (c) (25X).



Fig.7 Microfotografía de Int. Posterior AB/pH2,5. Se observa chapa estriada (+++) (ch) y céls caliciformes (-) (c) (25X)

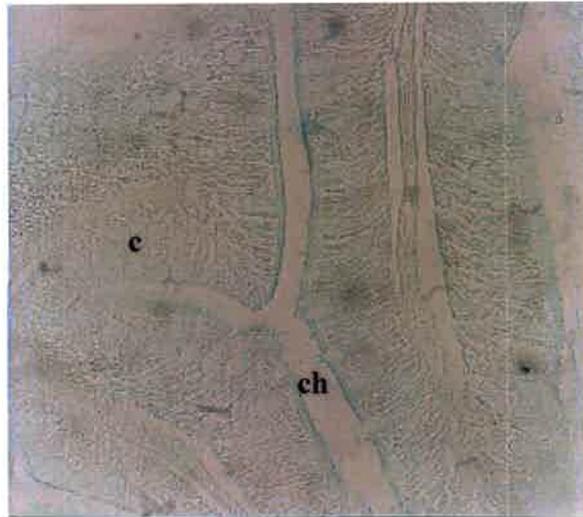


Fig. 8.- Microfotografía de Intestino Anterior AB/pH 0,5. Se observa chapa estriada (+++) (ch) y células caliciformes (-) (c) (25X)

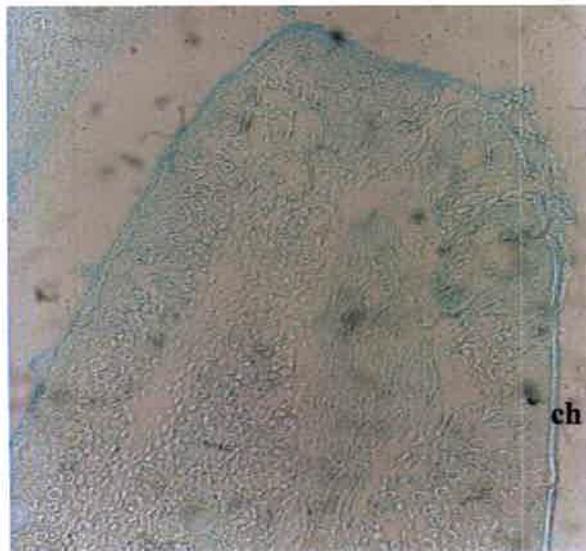


Fig. 9.- Microfotografía de Intestino Medio AB/pH 0,5. Se observa chapa estriada (+++) (ch) (25X).

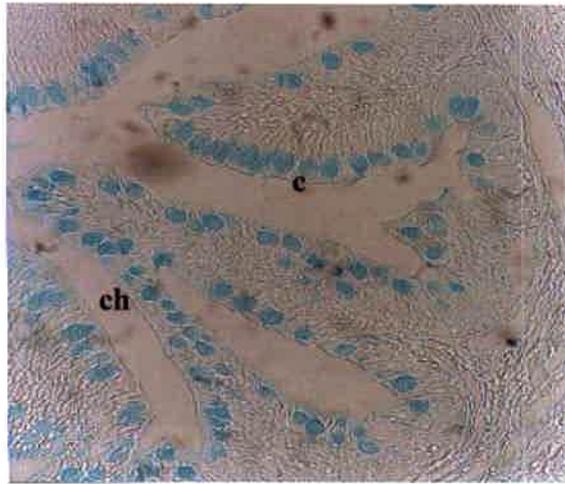


Fig. 10.- Microfotografía de Intestino Posterior AB/pH 0,5. Se observa chapa estriada (++) (**ch**) y células caliciformes (+++) (+) (**c**) (25X)

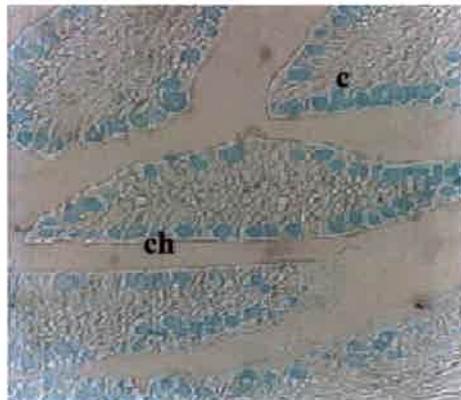


Fig. 11.- Microfotografía de Intestino Posterior AB/pH 0,5. Se observa chapa estriada (++) (**ch**) y células caliciformes (+++) (+) (**c**) (25X)

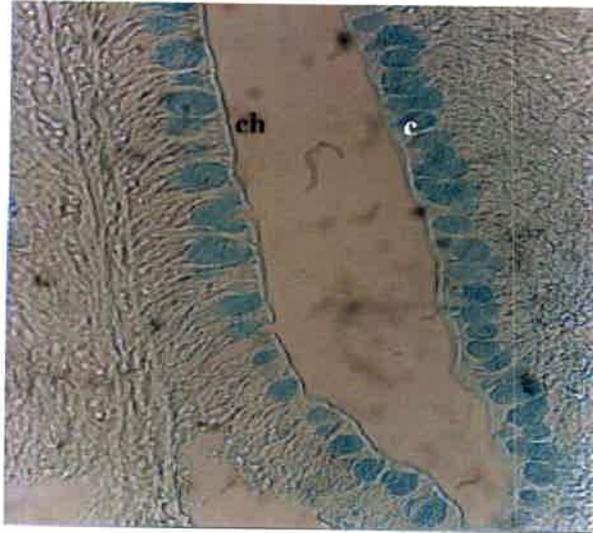


Fig.-12.- Microfotografía de Intestino Posterior AB/pH 0,5. Se observa chapa estriada (++) (ch) y células caliciformes (+++) (+) (c) (40X)

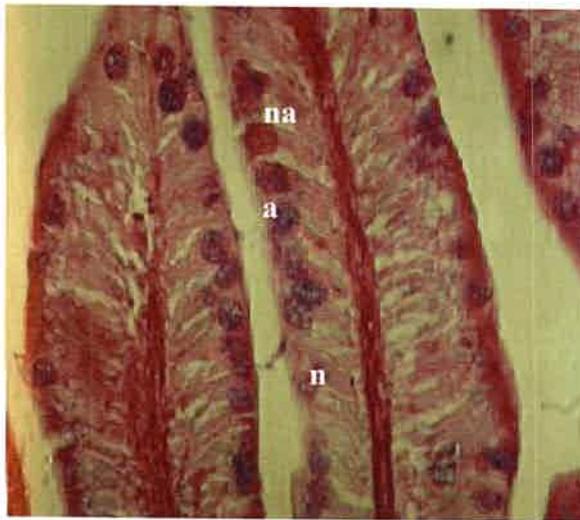


Fig. 13.- Microfotografía de Intestino Anterior PAS/AB/pH 2,5. Se observan células caliciformes (+++) (n) (na) (a) (25X).

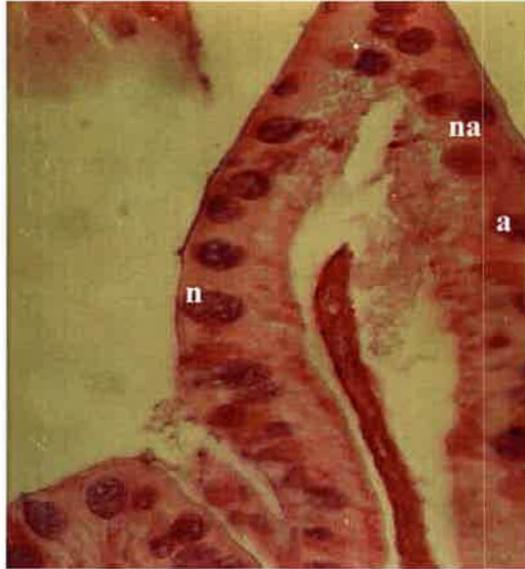


Fig. 14.- Microfotografía de Intestino Anterior PAS/ AB/pH 2,5. Se observan células caliciformes (+++) (n) (na) (a) (25X).

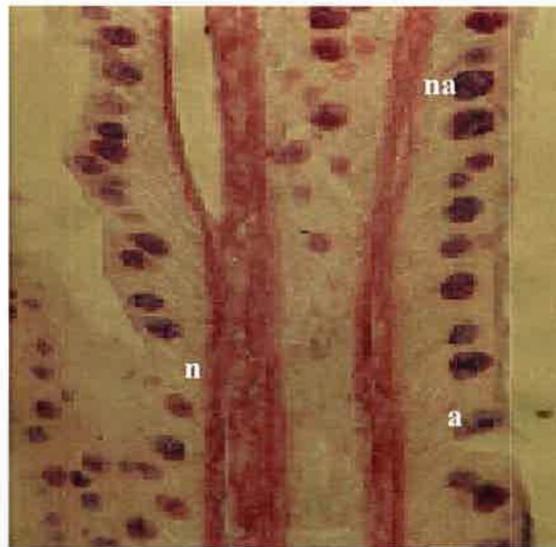


Fig. 15.- Microfotografía de Intestino Medio PAS/ AB pH 2,5. Se observan células caliciformes (+++) (n) (na) (a) (25X).

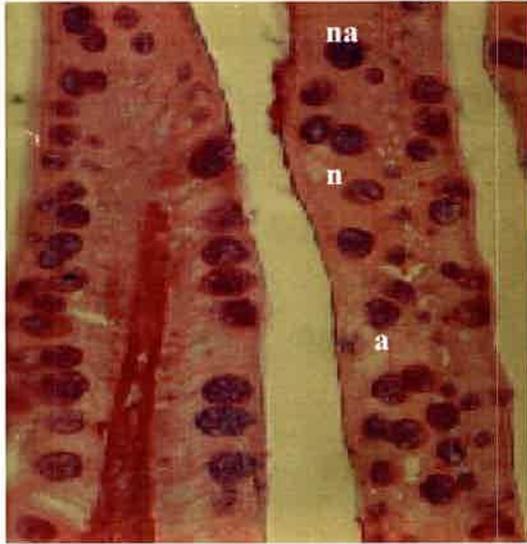


Fig. 16.- Microfotografía de Intestino Medio PAS/ AB/pH 2,5. Se observan células caliciformes (+++) (n) (na) (a) (25X).

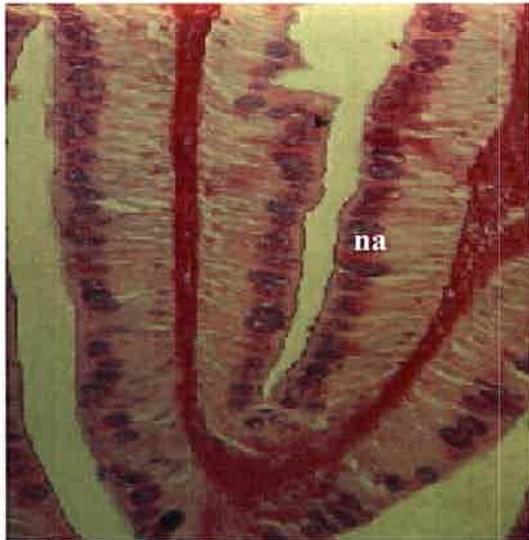


Fig. 17.- Microfotografía de Intestino Posterior PAS/ AB/pH 2,5. Se observan células caliciformes (+++) (na) (25X).

Estudio Inmunohistoquímico

• Gastrina

Intestino Anterior: se determinaron células enteroendocrinas positivas localizadas en el tejido epitelial de las regiones apicales y laterales de los pliegues intestinales (Tabla 2 y Fig.18 y 19).

Intestino Medio: la presencia de numerosas células positivas a gastrina se detectó en los pliegues flexuosos del intestino, específicamente en los enterocitos ubicados entre las células caliciformes (Tabla 2 y Fig. 20, 21 y 22). Las células presentan forma fusiforme con un cuerpo central y extremos aguzados. El citoplasma posee un aspecto intensamente granular (Fig. 23 y 24).

Intestino Posterior: no se evidenció positividad (Tabla 2).

• Secretina

Intestino Anterior: se destaca la presencia de células enteroendocrinas con marcada reacción en el límite entre los tejidos epitelial y conectivo del corion submucoso, correspondiente al pliegue intestinal (Tabla 2 y Fig. 25). Las células presentan forma redondeada con núcleo de cromatina laxa y citoplasma intensamente teñido (Fig. 26 y 27).

Intestino Medio: se determinó reacción intensa en células epiteliales localizadas entre las células caliciformes y hacia la membrana basal (Tabla 2 y Fig. 28 y 29) como así también en tejido conectivo (Tabla 2 y Fig. 30). Las células epiteliales positivas tienen forma piramidal con núcleo de cromatina laxa y citoplasma intensamente teñido (Fig. 31). Las células ubicadas en el tejido conectivo adoptan una forma alargada con presencia de gran cantidad de gránulos.

Intestino Posterior: se identificaron células reactivas de forma alargada con gránulos localizados desde la membrana basal hacia la parte apical del epitelio (Tabla 2 y Fig.32).

• **Motilina**

Intestino Anterior: se destaca la presencia de células epiteliales reaccionantes ubicadas en las base de los pliegues intestinales, éstas presentan finos gránulos dispersos en el citoplasma (Tabla 2 y Fig.33).

Intestino Medio: en la base del epitelio se identificaron células positivas a motilina de aspecto redondeados con gránulos citoplasmáticos (Tabla 2 y Fig. 34, 35 y 36). También están presentes en el tejido conectivo, manifestando reacción moderada (Tabla 2 y Fig. 37).

Intestino Posterior: las células positivas se encontraron en la túnica muscular tanto en la circular interna (Tabla 2 y Fig.38 y 39) como en la longitudinal externa (Tabla 2 y Fig.40).

• **Péptido Intestinal VasoActivo (VIP)**

Intestino Anterior: en el corion submucoso se identificaron células positivas con intensa reacción y con abundantes gránulos citoplasmáticos que impiden la visualización del núcleo (Tabla 2 y Fig. 41 y 42).

Intestino Medio y Posterior: se determinó, en el tejido conectivo, la presencia de células reactivas con citoplasma finamente granular y con un núcleo central con cromatina laxa (Tabla 2 y Fig. 43).

Tabla 2.- Expresión de las diferentes regiones del tracto intestinal del pejerrey a las hormonas gastrina, secretina, motilina y péptido intestinal vasoactivo (VIP).

Hormonas	Estructura	Intestino Anterior	Intestino Medio	Intestino Posterior
gastrina	Tejido Epitelial	+++	+++	-
	Tejido conectivo	-	-	-
	Muscular Circular Interna	-	-	-
	Plexo nervioso	-	-	-
	Muscular Longitudinal Externa	-	-	-
Secretina	Tejido Epitelial	+++	+++	+++
	Tejido conectivo	-	+++	-
	Muscular Circular Interna	-	-	-
	Plexo nervioso	-	-	-
	Muscular Longitudinal Externa	-	-	-
motilina	Tejido Epitelial	+++	+++	-
	Tejido Conectivo	-	++	-
	Muscular Circular Interna	-	-	+++
	Plexo Nervioso	-	-	-
	Muscular Longitudinal Externa	-	-	+++
VIP	Tejido Epitelial	-	-	-
	Tejido Conectivo	+++	+++	+++
	Muscular Circular interna	-	-	-
	Plexo nervioso	-	-	-
	Muscular Longitudinal Externa	-	-	-

Referencias: (+++) intensa reacción (++) moderada reacción (+) débil reacción (-) reacción negativa



Fig. 18.- Microfotografía Intestino Anterior. Gastrina. Se observan células enteroendocrinas (+++) en epitelio (g) (16x).



Fig. 19.- Microfotografía Intestino Anterior. Gastrina. Se observan células positivas (+++) en epitelio (g) (25x).



Fig. 20.- Microfotografía Intestino Medio. Gastrina. Se observan células enteroendocrinas (+++) en epitelio (g) (16x).

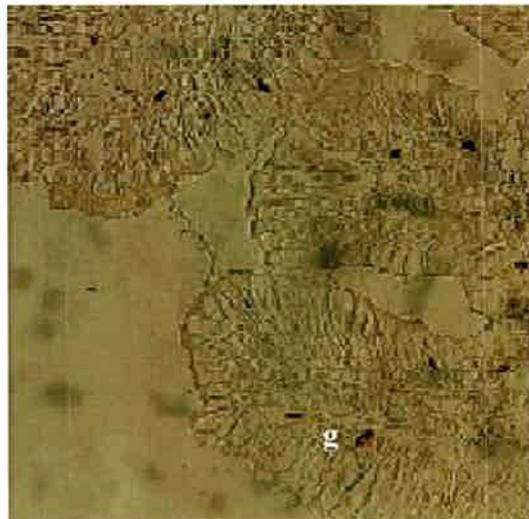


Fig. 21.- Microfotografía Intestino Medio. Gastrina. Se observan células enteroendocrinas (+++) en epitelio (g) (25x).

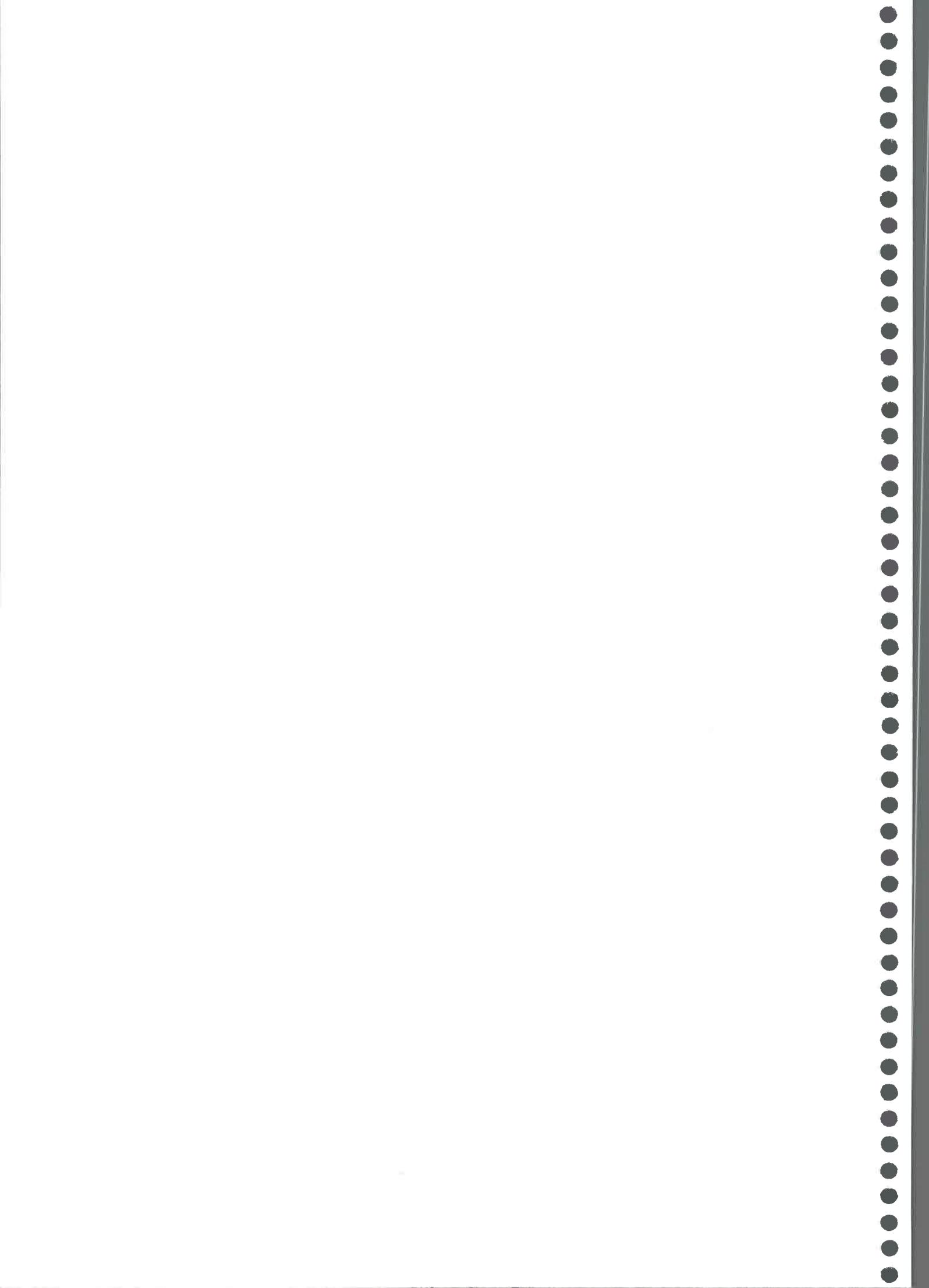




Fig. 22.- Microfotografía Intestino Medio. Gastrina. Se observan células enteroendocrinas (+++) en epitelio (g) (40x).

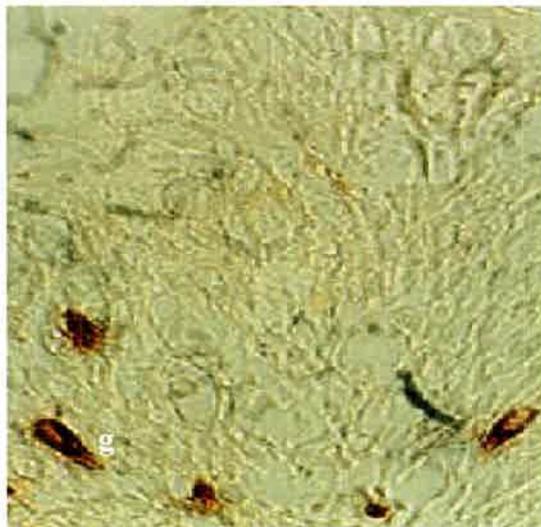


Fig. 23.- Microfotografía Intestino Medio. Gastrina. Se observan células epiteliales enteroendocrinas (+++) fusiformes y de aspecto granular (g) (100x).

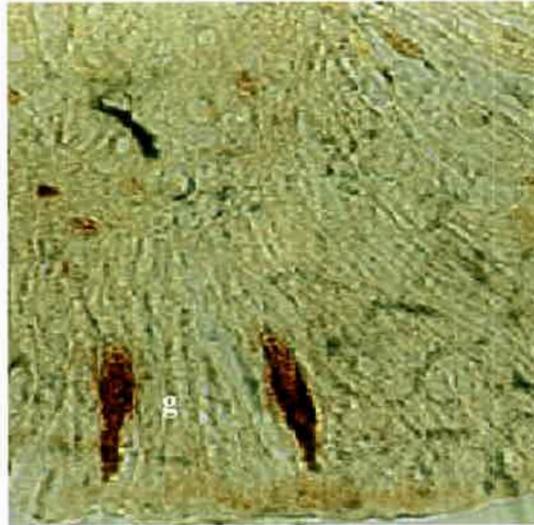


Fig.24.- Microfotografía Intestino Medio. Gastrina. Se observan células enteroendocrinas (+++) fusiforme y granular en el epitelio (g) (100x).

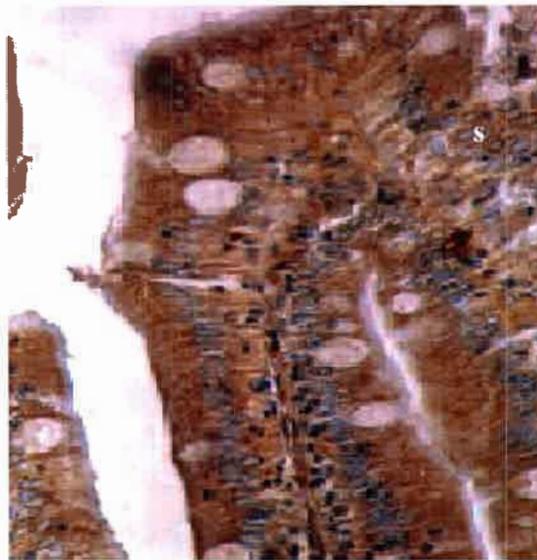


Fig. 25.- Microfotografía Intestino Anterior Secretina . Se observan células enteroendocrinas (+++) (s) (40x).

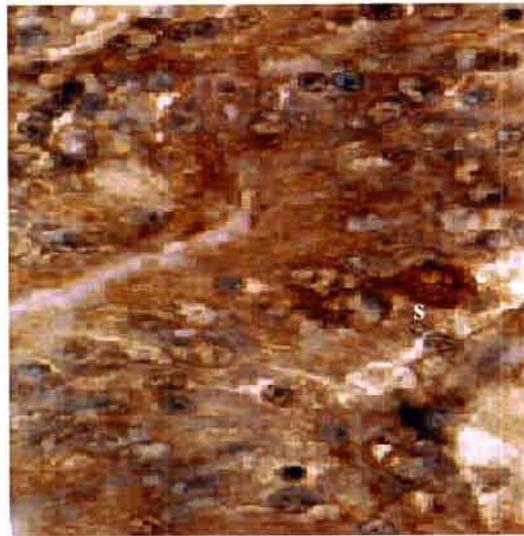


Fig. 26.- Microfotografía Intestino Anterior. Secretina. Se observan células positivas (+++) de forma redondeada. (s). (100x).

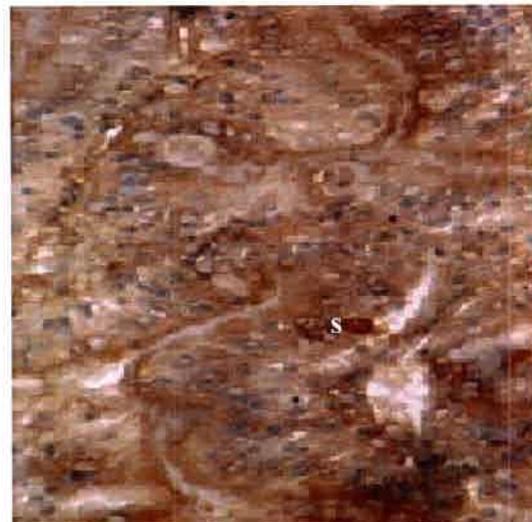


Fig. 27.- Mirofotografía Intestino Anterior. Secretina. Se observan células enteroendocrinas (+++) de forma forma redondeada (s) (40 x)

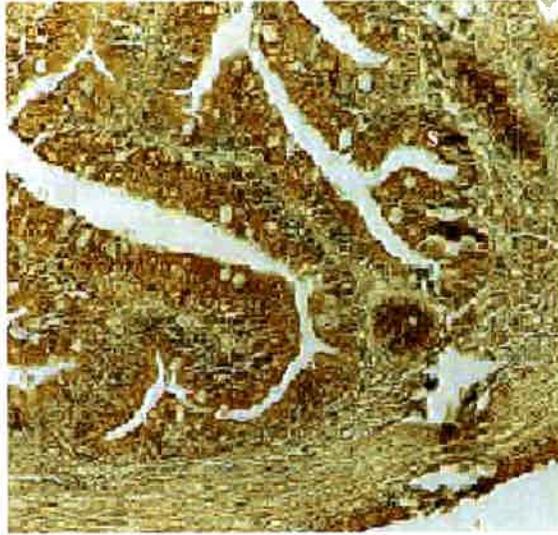


Fig. 28.- Mirofotografía Intestino Medio. Secretina. Se observan células enteroendocrinas (+++) en epitelio (s) (25 x)

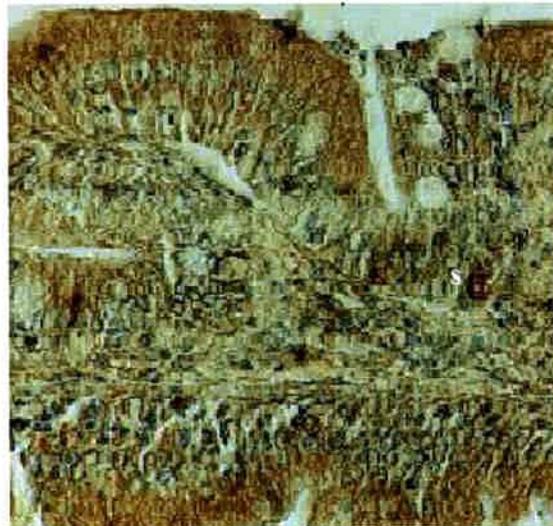


Fig. 29.- Microfotografía Intestino Medio. Secretina. Se observan células enteroendocrinas (+++) en epitelio (s) (25x).

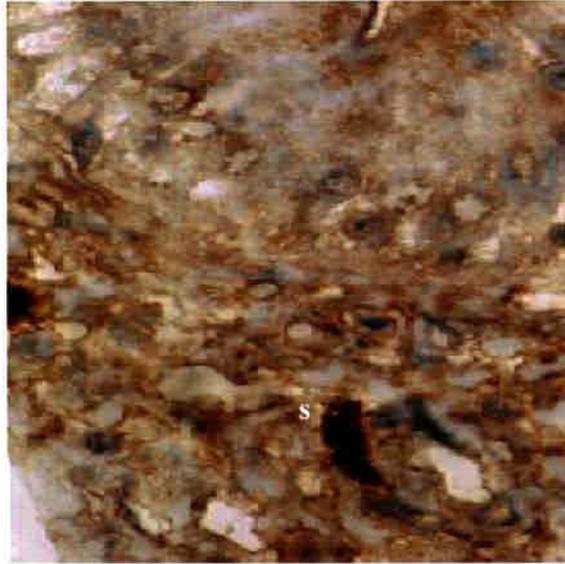


Fig. 30.- Microfotografía Intestino Medio. Secretina. Se observan células enteroendocrinas (+++) en tejido conectivo de forma alargada y aspecto granular. (s). (100x).

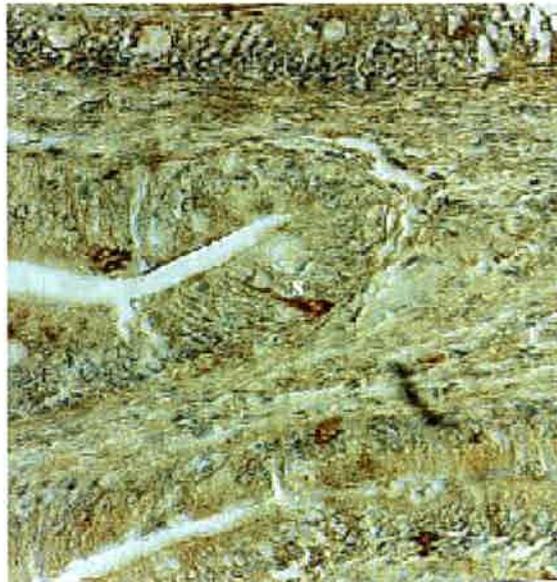


Fig. 31.- Microfotografía de Intestino Medio. Secretina. Se observan células enteroendocrinas (+++) en epitelio (s) (25 x).

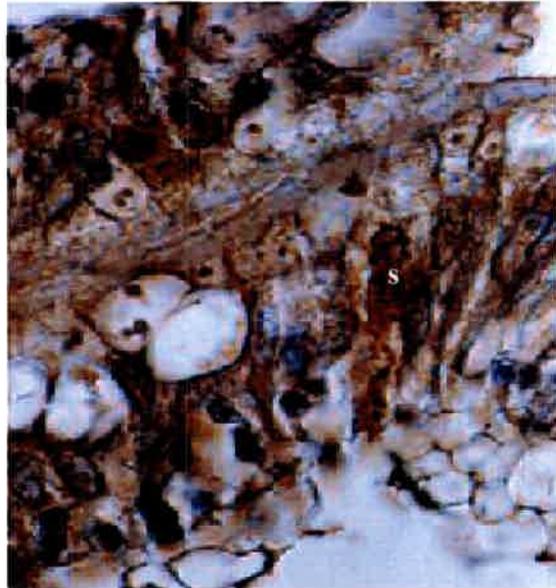


Fig. 32.- Microfotografía Intestino Posterior. Secretina. Se observan células positivas de forma alargada y aspecto granular (+++) (s) en epitelio (100x).



Fig. 33.- Microfotografía Intestino Anterior. Motilina. Se observan células enteroendocrinas (+++) en epitelio (m). (25x).

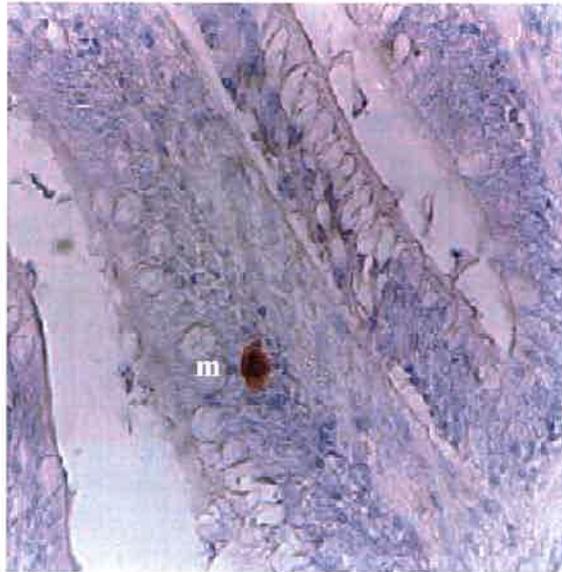


Fig. 34.- Microfotografía Intestino Medio. Motilina. Se observa, en el epitelio, células positivas (+++), redondeadas y granulares (**m**). (25x).

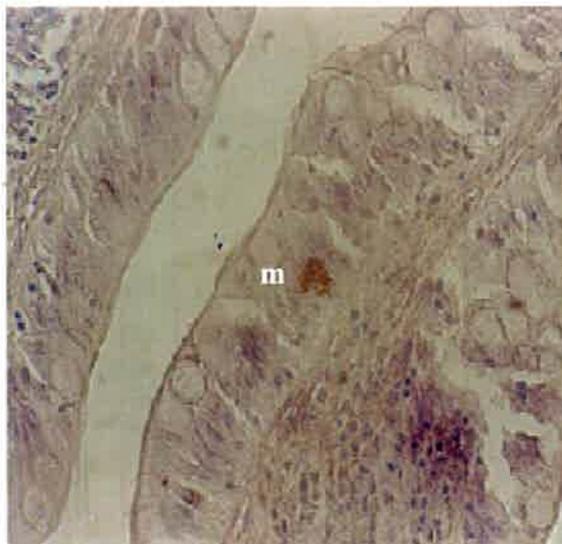


Fig. 35.-Microfotografía Intestino Medio. Motilina. Se observan, en el epitelio, células enteroendocrinas (+++) de forma redondeada. (**m**). (40x).

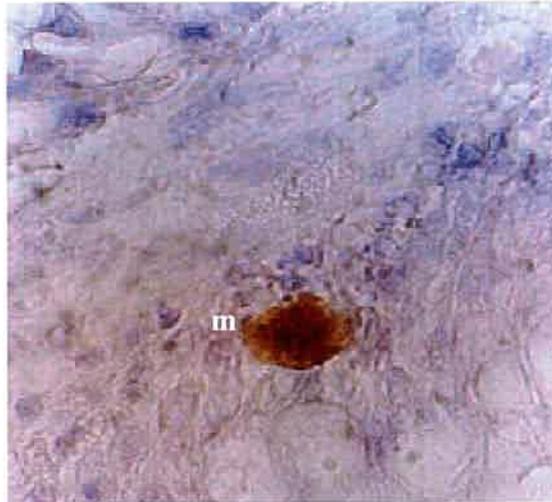


Fig.36.- Microfotografía Intestino Medio. Motilina. Se observa célula positiva (+++) en el epitelio.(m). (100x).

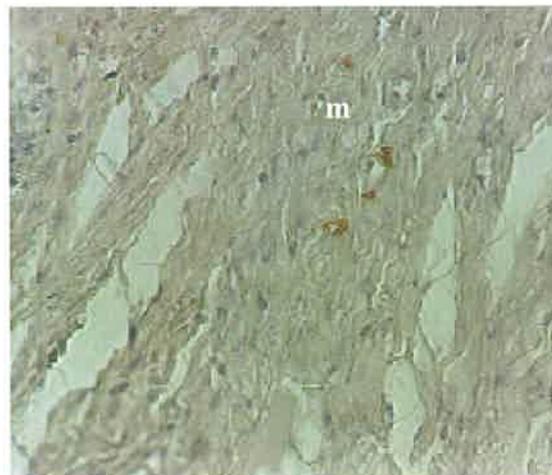


Fig. 37.- Microfotografía Intestino Medio. Motilina. Se observan, en el tejido conectivo, células enteroendocrinas (++) (m). (16x).



Fig. 38.- Microfotografía Intestino Posterior. Motilina. Se observan , en la capa muscular circular interna, células positivas (+++) (m). (40x).

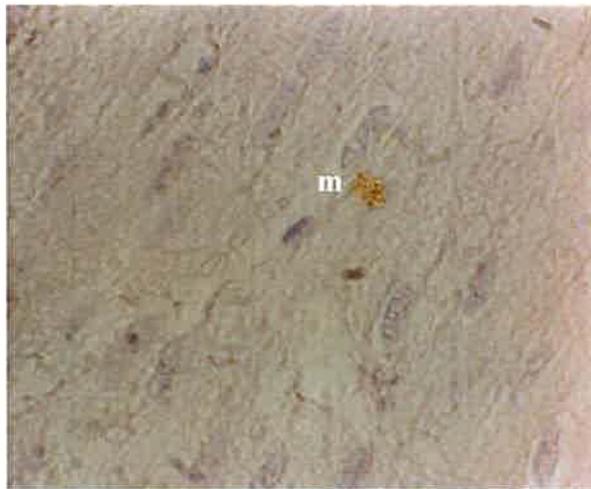


Fig. 39.- Microfotografía Intestino Posterior. Motilina. Se observan en músculo liso, células enteroendocrinas (+++) (m). (40x)

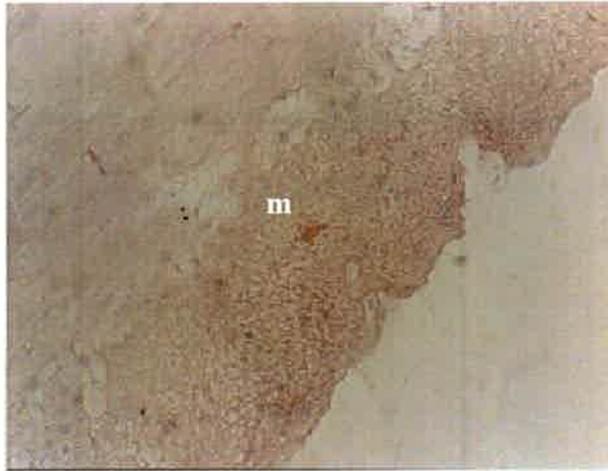


Fig.40.- Microfotografía Intestino Posterior. Motilina. Se observa en capa muscular longitudinal externa, células positivas. (++) . (m). (25x).

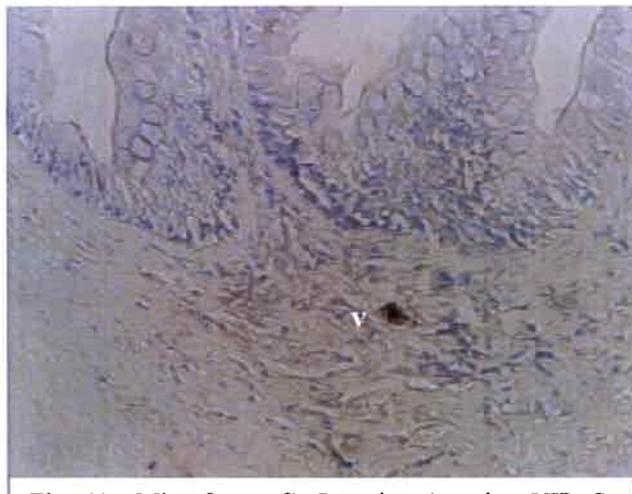


Fig. 41.- Microfotografía Intestino Anterior. VIP. Se observan, en corion- submucoso, células enteroendocrinas. (+++) . (v). (25x).

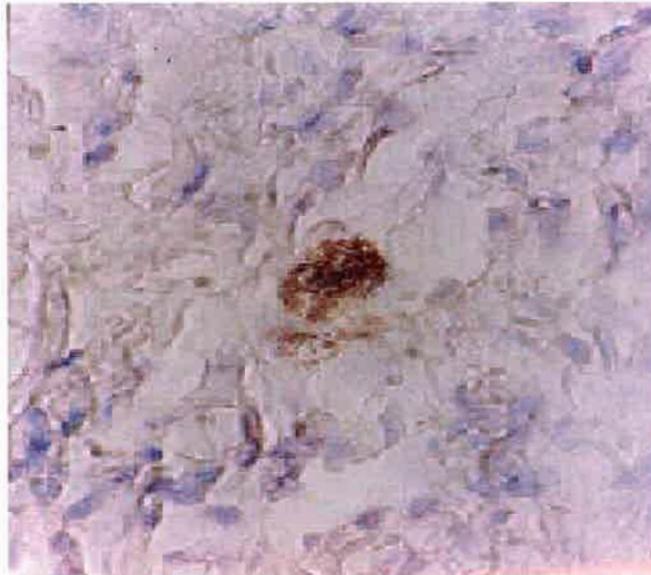


Fig. 42.- Microfotografía Intestino Anterior. VIP. Se observa células positivas (+++)en corion-submucoso de aspecto granular. (v).(40x)



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizaron distintas estructuras correspondientes a la diferentes tunicas del tracto intestinal del pejerrey desde diversas ópticas: morfológica, histoquímica e inmunohistoquímica para identificar la presencia de sustancias con grupos carboxílicos y/o sulfatados y para la determinación de hormonas gastrointestinales como gastrina, secretina, motilina y péptido intestinal vasoactivo, respectivamente.

La técnica histoquímica convencional permitió identificar la presencia de mucinas ácidas y levemente neutras en la chapa estriada de las células epiteliales de la mucosa intestinal, correspondiente a las tres regiones del tracto intestinal del pejerrey, (intestino anterior, medio y posterior) (Baglolle *et al.*, 1997) y mucinas neutras, ácidas, débilmente ácidas y neutras-ácidas en las células caliciformes a lo largo del tracto intestinal. Estas observaciones coinciden con estudios realizados por Fiertak y Kilarski (2002) en células caliciformes intestinales de diferentes especies de Teleósteos y por Méndez *et al.*, (2003) en células caliciformes del intestino delgado de pollo donde predominaron glicoconjugados neutros y ácidos sulfatados. Como así también, con los trabajos de Montalvo *et al.*, (1967) que demostraron, tanto en intestino delgado como grueso de la alpaca, mucinas neutras y débilmente ácidas y en algunas células caliciformes la presencia de grupos neutros-ácidos, sobretudo en duodeno y yeyuno. Por otro lado, Piñols Felis, (2000) en colon de ratas determinó, predominantemente, mucinas neutras, ácidas y neutras-ácidas, mientras que en el tracto digestivo del picure, principalmente en intestino delgado, se pusieron en evidencia mucinas ácidas carboxílicas y sulfatadas (García Crespo, 1988). En el desarrollo de una especie de pez del género *Acipenser*, se demostró que en las etapas más avanzadas del desarrollo embrionario, aumentaba la presencia de glicoconjugados neutros y ácidos (Carmona *at al.*, 2000). En los peces, como el pejerrey, donde el estómago no es glandular, el intestino está obligado a tener mecanismos para la preparación del alimento y para la absorción y digestión del mismo. Uno de estos mecanismos propuestos está asociado con la acción del mucus producido por las células caliciformes del epitelio intestinal (Tibbetts, 1997). Esto explicaría la presencia de los diferentes tipos de mucinas existentes en la chapa estriada y las células

caliciformes, determinados por la técnica histoquímica convencional y por la de lectinohistoquímica (Castagnino *et al.*, 2000, 2001, 2005).

Los resultados obtenidos del estudio inmunohistoquímico para **gastrina** muestran un intenso grado de reacción de las células enteroendocrinas y un patrón de distribución diferencial a la largo del tracto intestinal. En el intestino anterior y medio las células positivas se localizan en el tejido epitelial presentando un aspecto intensamente granular. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por diversos autores como, Yoshida *et al.*, (1983) en el intestino anterior de peces de cuerpos aplanados *Paralichthys olivaceus* donde las células G expresan una evidente marcación al anticuerpo aplicado. Asimismo, Abad *et al.*, (1987) demostraron la presencia de células productoras de gastrina en el epitelio intestinal de peces sin estómago. Por otro lado, Holmgren y Nilsson (1983) en el pez pequeño tiburón identificaron fuerte positividad en células enteroendocrinas del intestino anterior y medio; mientras que en el intestino posterior, la hormona fue identificado en las fibras nerviosas. En cambio, en el intestino posterior del pejerrey no hubo marcación. Galán *et al.*, (1996) estudiaron a nivel microscópico, ultramicroscópico e inmunohistoquímicamente las células enteroendocrinas G, en el tracto gastrodigestivo del perro, demostrando la presencia de las mismas en la región antral, pilórica y en las vellosidades del duodeno. En cambio, hubo inmunoreactividad negativa en yeyuno íleon e intestino grueso. Resultados coincidentes con los obtenidos en la región posterior del intestino del pejerrey. Galán Torres *et al.*, (2000) demostraron en el aparato digestivo de perros una alta concentración de gastrina sérica en el estómago y en menor grado en el duodeno, mientras que en el hombre ocurre lo contrario. Además, comprobaron que un factor que influye es la edad, mientras que no hay datos concluyentes sobre el factor sexo. En general, en individuos sanos y jóvenes, los niveles de gastrina plasmática están en relación inversa con la rapidez en la secreción del ácido gástrico. Lichtenberger (1982) determinó la importancia del alimento (aminoácidos y péptidos como triptófano y fenilalanina) en la regulación de la formación y liberación de gastrina. Ésta es importante para la secreción del ácido que permite la disolución y digestión del alimento y a su vez es necesaria para el crecimiento normal de la mucosa del estómago, intestino delgado y colon. Por otro lado, Chao *et al.*, (2005) demostraron la ausencia de receptores de gastrina en cáncer de colon de humanos. Dayal (1991) y De Groot (1989),

en sus respectivas investigaciones, marcan la importancia de establecer los valores fisiológicos de gastrina sérica, en condiciones normales, en aparato digestivo de perros, como referencia para evaluar algunas patologías observadas en esa especie y que van acompañadas con aumentos más o menos marcados de la hormona en cuestión.

La determinación inmunohistoquímica de **secretina** arrojó resultados positivos en tejido epitelial a lo largo del **tracto intestinal**, mientras que la reactividad en tejido conectivo se expresó sólo en el **intestino medio**. Las células enteroendocrinas presentes en intestino anterior están localizadas en la región basal del epitelio de los pliegues intestinales y se caracterizan por la marcada reacción citoplasmática. Mientras que en la región media intestinal las células secretoras se observaron tanto en el epitelio como en el tejido conectivo, adoptando, algunas, una forma piramidal y un citoplasma intensamente reaccionante mientras que otras presentan forma alargada con un citoplasma evidentemente granular. Estas observaciones son coincidentes con los resultados obtenidos por Abad *et al.*, (1987) en peces teleósteo; no así con los encontrados en el intestino de peces ciprínidos donde no se identificaron células secretoras de secretina (Ku *et al.*, 2004). Por otro lado, Nasca *et al.*, (1975) en perros, y Guyton y Hall (2001) en humanos, determinaron que células de la mucosa duodenal y de la parte proximal del yeyuno son secretoras de secretina en respuesta a la presencia de ácido en el lumen de dichos órganos, especialmente cuando el pH es de 4,5 o valores más bajos. Posteriormente, estimula la secreción pancreática rica en bicarbonato pero con escasas enzimas pancreáticas, actuando también sobre estómago e hígado para la producción de pepsina y bilis, respectivamente (Sacha Rodríguez, 2006). Estudios efectuados para establecer si hay relación o no entre la calidad de la grasa (ácido oleico y aceite de girasol) en una dieta y la secreción de secretina, determinaron que no hubo cambios significativos en la concentración en plasma de la hormona mencionada (González *et al.*, 1998). Por otro lado, Jansen y Lamers (1982) demostraron la relación que se establece entre las altas concentraciones de gastrina , secretina y de calcio en sangre.

Los estudios realizados para identificar estructuras reaccionantes a **motilina**, arrojaron resultados positivos en tejido epitelial, conectivo y muscular. En **intestino anterior** y

medio, las células reaccionantes se encontraron en la parte basal del epitelio de los pliegues y otras fueron identificadas en tejido conectivo (intestino medio). Sakai *et al.*, (2003) en ratas, Fujimiya *et al.*, (1998) en conejos, Usellini *et al.*, (1984) en perros y humanos, Nishikubo *et al.*, (2005) en niños prematuros, demostraron la presencia de motilina en células epiteliales de las vellosidades y criptas del duodeno, presentando formas diversas según la especie: células alargadas y poligonales (ratas); células con gránulos redondeados, de tamaño mediano y ubicados en la región basal y perinuclear del citoplasma (conejos); células con gránulos pequeños y redondeados (hombre) y de forma irregular (perros). Estos autores sostienen que la presencia de motilina en el epitelio podría cumplir un rol en la diferenciación y crecimiento del epitelio intestinal. Por otro lado, Fang *et al.*, (2004) determinaron, en el tejido conectivo del intestino delgado de ratas, la presencia de motilina donde probablemente participa controlando el patrón de contracciones del músculo liso en el tracto gastrointestinal alto. El estallido de secreción hormonal se lo relaciona, temporalmente, con el comienzo de las contracciones y estimula el complejo motor migratorio que ayuda a limpiar el material no digerido del estómago y del intestino. En equinos se ha demostrado que la motilina está involucrada en los mecanismos de regulación de la motilidad intestinal, principalmente en el yeyuno (Sasaki y Yoshihara, 1999). En el **intestino posterior** se observaron células positivas en las capas circular interna y longitudinal externa de la túnica muscular. Estas observaciones son coincidentes con las obtenidas por Depoortere (1995); Feighner *et al.*, (1999) y G Van Assche *et al.*, (1995) en el músculo liso de colon de humanos como así también en conejos (Poitras *et al.*, 1996). La alta densidad de receptores encontrados en el músculo liso del intestino grueso, abre nuevas perspectivas para la aplicación terapéutica de macromoléculas con propiedades antagónicas a la motilina. Considerando este aspecto, se identificó una baja densidad de receptores en el músculo de pacientes con neoplasia. En pollos se identificó reacción débil en el tejido muscular y los receptores encontrados difieren a los presentes en mamíferos (Kitazawa *et al.*, 1995). Mientras que en el colon de ratas la reactividad fue negativa (Sakai *et al.*, 2003). Por otro lado, Lucini *et al.*, (1999) demostraron que durante la etapa postnatal las hormonas gastrointestinales muestran cambios en su distribución. En el caso de la motilina hay un leve aumento con la edad. Cabe destacar que las células endocrinas se mantienen constantes en todos los estadios, en cambio las hormonas contenidas en ellas, varían durante el desarrollo ya que probablemente están

involucradas en las diferentes fases del proceso alimentario, con el tipo de alimento y cumplen un rol en el crecimiento del intestino.

El **péptido intestinal vasoactivo (VIP)** se encontró en componentes del tejido conectivo a la largo del tracto intestinal y las células presentaron intensa marcación con abundantes gránulos citoplasmáticos. Similar situación, se observó en los trabajos realizados en el pez mielga donde se puso en evidencia la positividad al VIP en estructuras perteneciente al corion submucoso de todo el tracto intestinal (Holmgren y Nilsson, 1983). Asimismo, en el desarrollo del intestino de la perca del mar se logró determinar la presencia y distribución de VIP donde se le atribuye un importante rol en la motilidad intestinal (Pederzoli *et al.*, 2004). En cambio en el pez lucioperca la reactividad se identificó en los plexos nerviosos mientéricos del intestino anterior donde probablemente actúe como neuromodulador o neurotransmisor del intestino (Cinar y Dylar, 2002). Resultados surgidos de las investigaciones realizadas en mamíferos coinciden en algunos aspectos y difieren en otros con los obtenidos en el pejerrey. Por ejemplo, Chino *et al.*, (2002) determinaron, también, fuerte reacción en las neuronas del corion submucoso de intestino de ratas, pero se encontró VIP asociado con óxido nítrico. Similar situación fue descrita por Berezin *et al.*, (1994) en caninos; Ny *et al.*, (1997) en neuronas de los plexos submucosos y mientéricos del intestino de perros y gatos, infiriendo que probablemente esa asociación cumple un rol importante como molécula mensajera en el sistema nervioso entérico. Estudios comparativos realizados en muestras de íleon normal y patológicas de caballo, arrojaron datos que muestran que es mayor el contenido del péptido intestinal vasoactivo en pacientes sanos. Esto probablemente pueda tener una aplicación en el diagnóstico y tratamiento de caballos con “grass sickness” (Bishop *et al.*, 1984). Por otra parte parte, Secor (2001) determinó en el tracto gastrointestinal del pitón, altas concentraciones de VIP en estómago y más bajas en intestino delgado. Vincze *et al.*, (2000), demostraron que la distribución de la hormona en cuestión no cambia durante la vida fetal y tiene un patrón similar al del adulto.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En base al objetivo general:

“**Determinar** la presencia y distribución de mucinas neutras y/o ácidas como así también las hormonas gastrointestinales gastrina, secretina, motilina y VIP (péptido intestinal vasoactivo) a lo largo del tracto intestinal del pejerrey”.

Se concluye que:

- Las células caliciformes de intestino anterior y medio poseen mucinas neutras, neutras-ácidas y ácidas.
- Las células caliciformes de intestino posterior evidencian, principalmente, mucinas neutras-ácidas.
- La chapa estriada a lo largo del tracto intestinal expresó positivamente mucinas ácidas.
- Hay reacción positiva a gastrina, secretina, motilina y al péptido intestinal vasoactivo en diferentes estructuras del tracto intestinal, principalmente en tejido epitelial y conectivo.
- Las hormonas gastrointestinales analizadas presentan un patrón de distribución diferencial a lo largo del tracto intestinal:
 - Gastrina está presente en tejido epitelial de intestino **anterior** y **medio**.
 - Secretina se encuentra en el tejido epitelial de todo el **tracto intestinal** y en el conectivo del **intestino medio**.

- Motilina se expresa en epitelio de la **región anterior** y **media** del intestino. En el conectivo del **intestino medio** y en la túnica muscular de **intestino posterior**.
- Péptido intestinal vasoactivo (VIP) está presente en tejido conectivo de todo el **tracto intestinal**.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Siendo el pejerrey de agua dulce (*Odontesthes bonariensis*) una especie de gran interés científico, deportivo y comercial, que en las últimas décadas se ha difundido, no sólo en el ámbito nacional sino también en el internacional (Japón, Chile, entre otros), con el fin de llevar a cabo una actividad agropecuaria no tradicional para producir alimentos de alto valor nutritivo y de bajo costo, se desprende que es muy importante conocer su biología: crecimiento, reproducción, alimentación, la estructura y funcionamiento de órganos como de sustancias químicas y hormonas gastrointestinales que pudieran estar involucradas en el proceso alimentario.

Es por ello, que los resultados obtenidos de esta Tesis aportan ciertos conocimientos anatómicos, morfológicos, químicos y fisiológicos que contribuirán, con los ya existentes y con los que se obtendrán en futuras investigaciones, para ser aplicados a la cría, alimentación y comercialización de la especie en estudio.

Sin embargo, quedan algunos aspectos a considerar y profundizar:

- Ampliar el espectro de anticuerpos para identificar otras hormonas gastrointestinales y el probable rol que puedan cumplir en el tracto digestivo.
- Determinar la presencia y distribución de dichas hormonas en otras etapas del ciclo de vida de los pejerreyes (larvas-juveniles) y compararlos con los resultados ya encontrados en los adultos, mediante un análisis cualitativo y cuantitativo.
- Investigar la implicancia de las diferentes hormonas gastrointestinales en el proceso digestivo.

- Analizar el contenido estomacal para verificar si la dieta modifica o influye en la secreción de las hormonas objetos de estudio.
- Establecer los valores fisiológicos séricos normales de las diversas hormonas que puedan servir de referencia para evaluar algunas patologías en peces.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

- ABAD, M.; BINKHORST, F.; ELBAL, M. and ROMBOUT, J. (1987). A comparative immunocytochemical study of the gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system in a stomachless and a stomach-containing teleost. *General Comparative Endocrinology* 66 (1): 123-136.
- AIKEN, K and ROTH, K. (1992) Temporal differentiation and migration of Substance P, Serotonin and Secretin immunoreactive enteroendocrine cells in the mouse proximal small intestine. *Developmental Dynamics* 194: 303-310.
- AKIRA, CH.; YOSHIHARU, H. and SHINJA, O. (1995). Ontogenic development of neuropeptide Y-like immunoreactive cells in the gastroenteric pancreatic endocrine system of the dogfish. *Cell Tissue Research*. 282: 33-40
- ALDMAN, G.; JONSSON, A.C.; JENSEN, J. and HOLMGREN, S. (1989). Gastrin/CCK-like peptides in the spiny dogfish, *Squalus acanthias*; concentrations and actions in the gut. *Comparative Biochemistry Physiology* 92 (1): 103-108.
- ALZOLA, R.; DAURIA, P.; DE LA CRUZ, J.; LUPIDIO, M.; CASTAGNINO, R., GHEZZI, M.; CASTRO, A., GIMENO, E. and RODRÍGUEZ, J. (2004). Immunocytochemical localisation of gastrin and secretin in the stomach of the lama (*Lama glama*). *BIOCELL*. 28 (2): 3
- ANDERSON, T. (1986) Histological and cytological structure of the gastrointestinal tract of the luderick, *Girella tricuspidata* (Pisces, Kyphosidae) in relation to diet. *Journal of Morphology* 190: 109-119.
- AQUINO, A. (1991) Alimentación de *Odontesthes bonariensis* (Osteichthyes, Atherinidae) en el embalse El Cadillal (Tucumán, Argentina). *Biología Acuática* 15 (2): 176-177.
- BAGLOLE, C.; MURRAY, H.; GOFF, G. and WRIGHT, G. (1997) Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. *Journal of Fish Biology* 51: 120-134.
- BARRENECHEA, M.A.; LOPEZ, J. and MARTINEZ, A. (1994) Regulatory peptides in gastric endocrine cells of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: general distribution and colocalizations. *Tissue Cell* 26(3): 309-21.

- BAYLISS, W.M. and STARLING, E. H. (1902) The mechanism of pancreatic secretion. *Journal Physiology (London)* 28: 325-353.
- BEORLEGUI, C.; MARTINEZ, A. and SESMA, P. (1992) Some peptide-like colocalizations in endocrine cells of the piloric caeca and intestine of *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei) *Cell Tissue Research* 269 (2): 353-357.
- BEREZIN, I.; SNYDER, S.; BREDT, D. and DANIEL, E. (1994) Ultrastructural localization of nitric oxide synthase in canine small intestine and colon. *American Journal Physiology- Cell Physiology* 266 (4): 981-989.
- BISHOP, A.; HODSON, N.; MAJOR, J.; BLOOM, S. and POLAK, J. (1984) The regulatory peptide system of the large bowel in equine. *Experientia* 40(8): 801-806.
- BRIAN, S. and DYER, H. (2006) Sistematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). *BIOCELL*. 30 (1): 69-88
- BUDDINGTON, R. and DOROSHOV, K. (1986) Structural and functional relations of the white sturgeon alimentary canal (*Acipenser transmontanus*). *Journal of Morphology* 190: 201-213.
- BURRELL, M.; VILLARO, A.; RINDI, G.; SOLCIA, E.; POLAK, J. and SESMA, P. (1991) An histological and immunocytochemical study of the neuroendocrine cells in the intestine of *Podarcis hispanica* Steindahner, 1870 (Lacertidae). *Cell Tissue Research* 263: 549-556.
- BURRELL, M.; VILLARO, A. and SESMA, P. (1992) Evidence for the colocalization of gastrin/cck and PYY/PP immunoreactive substances in the small intestine of the lizard *Podarcis hispanica*: Immunocytochemical and ultrastructural study. *General Comparative Endocrinology* 23: 87-93.
- CARMANCHAHI, P.; FERRARI, C.; ALDANA MARCOS, H.; AFFANI, J.; SOÑEZ, C. and PAZ, D. (2000) Characterization of glycoconjugates sugar residues in the vomeronasal organ of the armadillo *Chaetophractus villosus*. *Journal of Anatomy* 196: 357-370.
- CARMONA, R., LLORENTE, J.; CAMACHO, S.; SANZ, A.; GARCÍA GALLEGO, M. and OSTO-GARRIDO, V. (2000) Evolución histológica e histoquímica del tracto digestivo de *Acipenser naccarii* durante la ontogenia temprana. *Revista Ciencias Veterinarias* 38 (2): 4-11.

- CASTAGNINO, R.; DE LA CRUZ, J.; DAURIA, P.; SONA, L.; PAZ, D.; TUNINETTI, J. and IBÁÑEZ, N. (2000). Applications of lectins for the identification of glycoconjugates in the digestive tract of atherine (*Odontesthes bonariensis*). *BIOCELL* 24 (1): 145.
- CASTAGNINO,R.; DE LA CRUZ,J.; DAURIA,P.; TUNINETTI,J. and SONA,L. (2001) Behaviour of certain lectins in the identification of glycoconjugates in the intestinal tract of atherine. *BIOCELL* 25 (1): 138.
- CASTAGNINO, R.; DE LA CRUZ, J.; DAURIA, P.; NAVARRO, O.; TISSERA, J.; DAITA, J.; CORTEGIANO, F.; LEDESMA, C. and ALEM, P. (2005). Ciclo anual de glicoconjugados en el tracto intestinal del pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) en la laguna Camoatí. *BIOCELL* 26 (1): 182.
- CHAN-PALAY, V.; ITO, M.; TONGROACH, P.; SAKURAI, M. and PALAY, S. (1982) Inhibitory effects of motilin, somatostatin and taurine in enteric neurons. *Neurobiology* 79: 3355-3359.
- CHAO, C.; TALLMAN, M.; IVES, K.; TOWNSEND, C. and HELLMICH, M. (2005) Gastrointestinal hormone receptors in primary human colorectal carcinomas. *Journal Research* 26: 106-118.
- CHAVES, C. (2001) Bases de la Inmunohistoquímica. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan 5: 15-45.
- CHENG, H. and LEBLOND, C. (1974) Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. Enteroendocrine cells. *American Journal Anatomy* 141: 503-520.
- CHINO, Y.; FUJIMURA, M.; KITAHAMA, K. and FUJIMIYA, M. (2002) Co-localization of NO and VIP in neurons of the submucous plexos in the rat intestine. *Peptides* 23(12): 2245-2250.
- CHITRAY, B. (1965) The anatomy and histology of the alimentary canal of *Puntius serana* (Ham) with a note on feeding habits. *Ichthyologica* 1: 53-62.
- CINAR, K. and DILER, A. (2002) Immunohistochemical localization of glucagon, substance P and vasoactive intestinal peptide in gastrointestinal tract mucosa of zander. *Journal of Fish Biology* 60: 303-307.

- CLARK, M.; WRIGHT, T.; BERTRAND, P.; VERLINDEN, M. and FURNESS, J. (1999) Motilin receptors in the rabbit duodenum. *Clinical Experimental Pharmacology Physiology* 26: 242-245.
- COLAUTTI, D.; REMES LENICOV, M. and BERASAIN, G. (2003) Inmunohistoquímica en vertebrados. *Biología Acuática* 20: 12-16.
- COSTA, M. and FURNESS, J. (1982) Neuronal peptides in the intestine. *Journal Medicine* 38: 247-252.
- CUMMINGS, J.; SELLERS, A. and LOWE, J. (1985) Distribution of substance P-like immunoreactivity in the enteric neurons of the large colon of normal and amitraz-treated ponies: an immunocytochemical study. *Journal Equine Veterinary* 17 (1): 23-29.
- CUNNINGHAM, J. (1995) *Fisiología Veterinaria*. 1º Ed. Editorial Interamericana-McGraw-Hill.
- DAURIA, P.; CASTAGNINO, R.; DE LA CRUZ, J.; SONA, L.; MAC LOUGHLIN, V., NAVARRO, O.; PERROTA, F. and ARMANDO, R. (2005) Immunohistochemistry identification of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the intestinal tract of horse foetus. *BIOCELL* 29 (1): 30.
- DAYAL, Y. (1991) Neuroendocrine cells of the gastrointestinal tract: Introduction and historical perspective. In: *Endocrine pathology of the gut and pancreas*. Dayal, Y. De CRC Press, Boca Ratón. Florida. pp 1-31.
- DE GROOT, L. (1989) Gastrointestinal polipeptides. *Endocrinology* 1: 48-54.
- DE LA CRUZ, J.; NAVARRO, O.; CASTAGNINO, R.; DAURIA, P.; TISSERA, J.; CORTEGGIANO, F., DAITA, J., LEDESMA, C. and ALEM, P. (2006). Determinación del VIP (péptido intestinal vasoactivo) en diferentes tejidos y estructuras del caracol (*Hélix aspersa*). *BIOCELL* 30 (1): 168.
- DEPOORTERE, J. (1995) Involvement of motilin receptors. *Hormone Metabolisme* 24: 45-51.
- DIAZ DE RADA, O. (1992) Endocrine cells cells and nerves in the stomach of the lizard *Podarcis hispanica* detected by immunocytochemistry. *Tissue and Cell*. 24: 705-713.

- DOMENEGHINI, C.; RADAELLI, G., ARRIGHI, S.; BOSI, G. and DOLERA, M. (2004) Cholinergic, nitrenergic and peptidergic (Substance P and CGRP- utilizing) innervation of the horse intestine. A histochemical and immunohistochemical study. *Histology Histopathology* 19 (2): 357-370
- EDKINS, J. (1905) The chemical mechanism of gastric secretion. *Journal Medicine* 69: 352-356.
- EL-SALHY, M. and GRIMELIUS, L. (1981) The endocrine cells of gastrointestinal mucosa of a squamate reptile, the grass lizard (*Mabuya quinquetaniata*). A histological and immunohistochemical study. *Biomedicine Research* 2: 639-658.
- EZEASOR, D. and STOKOE, W. (1980) Scanning electron microscopic study of the gut mucosa of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal Fish Biology* 17: 529-539.
- EZEASOR, D. (1986) The structure and functional significance of stratum compactum in the gut of the rainbow trout (*Salmo gairdneri Rich.*). *Z Mikroskopy Anatomy Forsch.* 100: 536-544.
- FANG, P.; DONG, L.; LUO, Y.; LONG WAN, X. and CHAI, N. (2004) Effects of motilin and ursodeoxycholic acid on gastrointestinal myoelectric activity of different origins in fasted rats. *World Journal of Gastroenterology* 10 (17): 2509-2513.
- FEIGHNER, S.; TAN, C.; PONG, S.; AUSTIN, C.; CASCIERI, M.; STOCCO, R. and HOWARD, A. (1999) Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system. *Science* 284: 2184-2188.
- FERRARI, C.; CARMANCHAHI, P.; MUGNAINI, M. and PAZ, D. (1999) Identification and localization of glycoconjugates in the olfactory mucosa of the armadillo. *Journal of Anatomy* 194: 395-405.
- FERRI, G.; ADRIAN, T.; GATHEL, M.; O'SHAGHNESSY, D.; PROBERT, L.; LEE, Y.; BUCHAM, A.; POLAK, M. and BLOOM, S. (1983) Tissue localization and relative distribution of regulatory peptides in separated layers from the human bowel. *Gastroenterology* 84: 777-786.
- FIERTAK, A. and KILARSKI, W. (2002). Glycoconjugates of the intestinal goblet cells of four cyprinids. *Cellular Molecular Life Science* 59: 1724-1733.

- FIORUCCI, A. (1993) Effects of motilin on exocrine secretions. *Digestive Disease Science* 44: 1000-1006.
- FOX, C.; JHONSON, F.; WHITING, J. and ROLLER, P. (1985) Formaldehyde fixation. *Journal Histochemistry and Cytochemistry* 33: 845-853.
- FUJIMIYA, M.; OKUMIYA, K.; KWOK, Y.; ST-PIERRE, S. and MCINTOSH, C. (1998) Immunoelectron microscopic study of differential localization of motilin in the duodenal epithelium. *Peptides* 19: 65-73.
- FUJITA, T. and KOBAYASHI, S. (1977) Structure and function of gut endocrine cells. *Cytology* 6: 187-233.
- GALÁN, J.; ALONSO, F.; MORATINOS, P.; GONZÁLEZ, J.; FRAILE, B. and LOBO, M. (1996) The G-cells in the dog: a Light and electrón microscope immunocytochemical study. *The Histochemical Journal* 28(12): 883-893.
- GALÁN TORRES, J.; GUTIERREZ-ORTEGA, C.; AGUILERA MARTÍNEZ, A. and ROSALES, M. (2000) Valores normales de gastrina sérica en el perro. Relación con la edad y el sexo. *Medicina Veterinaria* 17(3): 54-62.
- GALL, C.; SEROOGY, K. and BRECHA, N. (1986). Distribution of VIP and NPY-like immunoreactivities in rat main olfactory bulb. *Brain Research* 374: 389-94.
- GARCÍA CRESPO, G. (1988) Aportes estructurales e histoquímicas sobre el tubo digestivo del picurú. *Revista Ciencias Veterinarias* 55: 469-480.
- GENESER, F. (2000) *Histología*. 3° Ed. Buenos Aires.
- GEORGOPOULOU, V; SIRE, M. and VERNIER, J. (1986) Immunological demonstration of intestinal absorption and digestion of protein macromolecules in trout (*Salmo gairdneri*). *Cell Tissue Research* 245: 387-395.
- GIMENO, E.; MASSONE, A. and PORTIANSKY, E. (1997) Introducción a las técnicas de inmunohistoquímicas y aplicaciones en Patología Veterinaria. En Manual del 8° Curso Internacional de Posgrado en Técnica Inmunohistoquímica, Lectinhistoquímica y Microscopía Electrónica. Instituto

de Patología "Dr. Bernardo Epstein" y Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. pp 49-77.

- GONZALEZ, M.; YAGO, D.; MAÑAS, M.; and CALPEÑA, R. (1998) Rol of the quality of dietary fat on the postprandial levels of secretin, cholecystokinin and pancreatic polypeptide in humans. *Ars Pharmaceutica* 39 (3-4): 165-173.

- GOUNARIS, A.; ALEXIOU, N.; COSTALOS, C.; DANILIDOU, M. and CONSTANTELOU, E. (1998) Gut hormone levels in neonates under phototherapy. *Early Humane Development* 51(1): 57-60.

- GREGORY, R. and TRACY, H. (1964) The constitution and properties of two gastrins extracted from hog antral mucosa. *Gut* 5: 103-114.

- GROSSMAN, M. (1981) General concepts. In: *Gut hormones*. S.R. Bloom and J. and Polar, K. Eds. Churchill. Livingstone. Edimburgh. Pp. 17-22.

- GROSSMAN, M. (1995) Variación estacional de la dieta del pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Revista Asociación Ciencias Naturales del Litoral* 26: 9-18.

- GUYTON, A. and HALL, J. (2001) *Tratado de Fisiología Médica*. 10° Ed. McGraw-Hill Interamericana.

- G VAN ASSCHE, T.; THIJIS, I.; DEPOORTERE, T. and PEETERS, L. (1995) Excitatory effect of motilin on the isolated human colon. *Gastroenterology* 108: 70-73.

- HARPER, A. and RAPER, H. (1943) Pancreozymin, a stimulant of the secretion in the small intestine. *Journal Physiology (London)* 102: 115-125.

- HARPER, A. (1998) Hormonas gastrointestinales. *Bioquímica* 51: 678-680.

- HERNESS, M. (1989) Vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in rodent taste cells. *Neuroscience* 33: 411-419.

- HOLMGREN, S. and NILSSON, S. (1983) Bombesin, gastrin/CCK, 5-hydroxytryptamine, neurotensin, somatostatin and VIP-like immunoreactivity and catecholamine fluorescence in the gut of the elasmobranch, *Squalus acanthias*. *Journal Physiology* 234 (3): 595-618.
- HSU, S.; RAINE, L. and FANGER, H. (1981) Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *Journal Histochemistry and Cytochemistry* 29: 577-580.
- INAKUCHI, H.; KAWAI, K.; TAKEUCHI, Y. and SANO, Y. (1984) Immunohistochemical study on the morphology of enterochromafin cells in the human fundic mucosa. *Cell Tissue* 235: 703-705.
- INOUE, K.; YAMAAJ, T. and KITADA, Y. (1992) Parasympathetic postganglionic nerve fibers in the fungiform papillae of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Brain Research* 596: 299-304.
- IVY, A. and OLDBERG, E. (1928) Hormonal mechanism of gallbladder contraction and evacuation. *American Journal Physiology* 86: 599-613.
- JANSEN, J. and LAMERS, C. (1982) Effect of changes in serum calcium on secretin-stimulated serum gastrin in patients with Zollinger-Ellison syndrome. *Gastroenterology* 83: 173-178.
- JORPES, J.; MUTT, V.; MAGNUSSON, S. and STEELE, B. (1962) Aminoacid composition and N-terminal sequence of porcine secretin. *Biochemistry Biophysical Research* 9: 275-279.
- JORPES, J.; MUTT, V. and TOCZKO, K. (1964) Further purification of cholecystokinin and pancreozymin. *Acta Chemistry* 18: 2408-2410.
- KAPOOR, B.; SMITH, H. and VERIGHINA, I. (1975) The alimentary canal and digestion. *Acta Marine Biological* 13: 109-239.
- KARILA, P.; SHAHBAZI, F.; JENSEN, J. and HOLMGREN, S. (1998) Projections and actions of tachykinergic, cholinergic and serotonergic neurones in the intestine of the Atlantic cod. *Cell and Tissues Research*. 291 (3): 403-413.
- KATAYAMA, Y.; NODA, Y.; HIRAI, K. and HONDA, K. (2005) Motilin inhibits ganglionic transmission in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *Neuroscience Research* 25: 120-126.

- KAWAMURA, O.; SEKIGUCHI, T.; KUSANO, M.; NISHOKA, K. and ITOH, Z. (1993) Peptides and neuropeptides. *Digestive Disease Science* 38: 870-876.
- KERANEN, U.; VANHATALO, S.; KIVILUOTO, T.; KIVILAAKSO, E. and SOINILA, S. (1995) Co-localization of NADPH diaphorase reactivity and VIP in human colon. *Journal Autonomic Nervous System* 54(3): 177-183.
- KILIAAN, A.; JOOSTEN, H.; BAKKER, R.; DEKKER, K. and GROOT, J. (1989) Serotonergic in the intestine of two teleosts, *Carassius auratus* and *Oreochromis mossambicus*, and the effect of serotonin on transepithelial ion-selectivity and muscle tension. *Neuroscience* 31: 817-24
- KILIAAN, A.; HOLMGREN, S.; JONSSON, A.C.; DEKKER, K. and GROOT, J. (1992) Neurotensin, substance P, gastrin/cholecystokinin and bombesin in the intestine of the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and the goldfish (*Carassius auratus*): immunochemical detection and effects on electrophysiological characteristics. *General Comparative Endocrinology* 88 (3): 351-63.
- KILLIAN, A.; HOLMGREN, S.; JONSSON, A.; DEKKER, K. and GROOT, J. (1993) Neuropeptides in the intestine of two teleost species (*Oreochromis mossambicus*, *Carassius auratus*): localization and electrophysiological effects on the epithelium. *Cell Tissue Research* 271: 123-34.
- KILIAAN, A.; SCHOLTEN, G. and GROOT, J. (1996) Ultrastructural study of the presence of vasoactive intestinal polypeptide and serotonin in mucosal nerve fibres and endocrine cells of the intestine of goldfish (*Carassius auratus*) and tilapia (*Oreochromis mosambicus*). *Cell Tissue Research* 283: 143-150.
- KILIAAN, A.; SCHOLTEN, G. and GROOT, J. (1997) Exocytotic release of vasoactive intestinal polypeptide and serotonin from mucosal nerve fibres and endocrine cells of the intestine of the goldfish (*Carassius auratus*) and the tilapia (*Oreochromis mossambicus*): an ultrastructural study. *Histochemical Journal* 29: 45-51.
- KITAZAWA, T.; TANEIKE, T. and OHGA, A. (1995) Excitatory action of motilin on the gastrointestinal smooth muscle isolated from the chicken. *Peptides* 16: 1243-1252.
- KONTUREK, S.; KAESS, H.; KWIECIEN, N.; DORNER, M. and TECKENTRUPP, U. (1976) Characteristics of intestinal phase of gastric secretion. *American Journal of Physiology* 230 (2): 335-340.

- KU, S.; LEE, J. and LEE, H. (2004) Immunohistochemical study of the endocrine cells in gut of the stomachless teleost, *Zacco platypus* (Cyprinidae). *Anatomy Histology Embryology*. 33 (4): 212-219.
- LANGER, M.; VAN NOORDEN, S.; POLAK, J. and PEARSE, A. (1979) Peptide hormone-like immunoreactivity in the gastrointestinal tract and endocrine pancreas of eleven teleost species. *Cell Tissue Research* 199 (3): 493-508.
- LARSEN, J.; BOECK, V. and OTTESEN, B. (1981) Effect of vasoactive intestinal polypeptide in cerebral blood flow in the goat. *Acta Physiology* 111: 471-474.
- LARSSON, L. (1993) Tissue preparations methods for light microscopic immunohistochemistry. *Application Immunohistochemistry* 1: 2-16.
- LEE, J.; KU, S.; PARK, K. and LEE, H. (2004) Immunohistochemical study of the gastrointestinal endocrine cells in the Korean ancha perch. *Journal of Fish Biology* 65 (1): 170-181.
- LI, Z.; YOUNG, H. and FURNESS, J. (1995) Do vasoactive intestinal peptide (VIP) and nitric oxide synthase immunoreactive terminals synapsis exclusively with VIP cell bodies in the submucous plexus of the guinea pig ileum. *Cell Tissue Research*. 281 (3): 485-491.
- LICHTENBERGER, L. (1982) Importance of food in the regulation of gastrin release and formation. *Gastrointestinal and Liver Physiology* 243: 429-441.
- LOPEZ, J.; ECHEVERRIA, M. and VAZQUEZ, J (1989) Histological and immunocytochemical study of the endocrine pancreas of the lizard *Podarcis hispanica Steindachner, 1870* (Lacertidae) *General Comparative Endocrinology* 71: 212-220.
- LUCINI, G.; GIROLAMO, P.; COPPOLA, L.; PAINO, G. and CASTALDO, L. (1999) Postnatal development of intestinal endocrine cell populations in the water buffalo. *Journal of Anatomy* 195: 439-446.
- MAALA, C.; LANDICHO, E. and DYCHEEPUAT, D. (1997) Immunocytochemical demonstration of endocrine cells in the large intestine of Philippine carabao (*Bubalus bubalis* L.). *Journal of Veterinary Medicine* 34: 1-2, 45 – 52.

- MAGLIO, M. and PUTTI, R. (1998) Morphological basis of the interactions between endocrine cells types in the pancreatic islets of the teleost *Blennius gattoruggine*. *Tissue Cell* 30(6): 672-683.
- MARTOJA, R. (1970) Técnicas de Histología Animal. Ed. Toray Masson. Barcelona. Pp 250 -257.
- MCGUIGAN, J. (1968) Immunochemical studies with synthetic human gastrin. *Gastroenterology* 54: 1005-1011.
- MÉNDEZ, A.; GARCÍA, G.; MICHELANGELI, C. y SÍVOLI, L. (2003) Dietas con *Canavalia ensiformis* alteran el patrón de secreción de mucinas en el intestino delgado de pollos de engorde. *Revista Facultad de Ciencias Veterinarias* 44 (2): 97-105.
- MILLER, P.; ROY, A.; ST-PIERRE, S.; DAGENAIS, M.; LAPOINTE, R.; and POITRAS, P. (2000) Motilin receptors in the human antrum. *American Journal Physiology* 278 (1) : 18-23.
- MITUTA, T. (2001) La historia del pejerrey en Japón. En Grosman, F. Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso del pejerrey. Editorial Astyanax – Fuerte Federación. Buenos Aires 212 p.p.
- MONTALVO, A.; PLOOG, W. and COPAIRA, B. (1967) Estudio anatómico-histológico e histoquímico de las glándulas salivales y del intestino de la alpaca. *Biología IVITA (Perú)* 2: 47-60.
- MOWRY, R.W. (1956) Observations of the use of sulphuric ether for the sulphation of hydroxyl groups in the tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 4: 407.
- NISHIKUBO, T.; YAMAKAWA, A.; KAMITSUJI, H. and FUJIMURA, M. (2005) Identification of motilin cells duodenal epithelium of prematures died. *Gastroenterology* 47: 248-251.
- NOAILLAC-DEPEYRE, J. and GAS, N. (1976) Electron microscopy study on gut epithelium of the tench (*Tinca tinca L.*) with respects to its absorptive functions. *Tissue Cell*. 8: 511-530.

- NOAILLAC-DEPEYRE, J. and HOLLANDE, E. (1981) Evidence for somatostatin, gastrin and pancreatic polypeptide-like substances in the mucosa cells of the gut in fishes with and without stomach. *Cell Tissue Res.* 216(1):193-203.
- NY, L.; ALM, P.; LARSSON, B. and ANDERSSON, K. (1997) Morphological relations between haem oxygenases, NO-synthase and VIP in canine and feline gastrointestinal tracts. *Journal Autonomie Nervous System* 65(1): 49-56.
- O'DONOHUE, T.; BEINFELD, M.; CHEY, T.; CHANG.; ZIMMERMAN, E. and JACOBOWITZ, D. (1990) Identification, characterization and distribution of motilin immunoreactivity in the rat central nervous system. *Peptides.* 2: 467-477.
- PAZ, D. (2000) *Técnicas Inmunocitoquímicas Guía del Curso de Posgrado Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.*
- PEDERZOLI, A.; BERTOCCHI, I.; GAMBARELLI, A. and MOLA, L. (2004) Immunolocalisation of vasoactive intestinal peptide and substance P in the developing gut of *Dicentrarchus labrax* (P). *European Journal Histochemistry.* 48 (2): 179-184.
- PEREZ-TOMAS, R.; BALLESTA, J.; PASTOR, L.; MADRID, J. and POLAK, J. (1989) Comparative immunohistochemical study of the gastroenteropancreatic (GEP) endocrine system of three reptiles. *General Comparative Endocrinology* 76: 171-191.
- PIÑOLS FELIS, C. (2000) Estudio Histoquímico y Lectinhistoquímico de la mucosa colónica de ratas. *Revista Universitat de Lleida* 18: 132- 140.
- POITRAS, P.; LAHAIE, R.; ST-PIERRE, S. and TRUDEL, L. (1987) Comparative stimulation of motilin duodenal receptor by porcine or canine motilin. *Gastroenterology* 92: 658-662.
- POITRAS, P.; MILLER, P. and DICKNER, M. (1996) Heterogeneity of motilin receptors in the gastrointestinal tract of the rabbit. *Peptides* 17: 701-707.
- POLAK, J. and VAN NOORDAM, S. (1986) *Immunocytochemistry. Moderns methods and applications.* *Peptides* 5: 103-107.

- RAJJO, I.; VIGNA, S. and CRIM, J. (1988). Cholecystokinin immunoreactivity in the digestive tract of bowfin (*Amia calva*), bluegill (*Lepomis macrochirus*) and bullfrog (*Rana catesbeiana*). *General Comparative Endocrinology* 70 (1): 133-144.
- RINGUELET, R.; IRIART, R. and ESCALANTE, A. (1980) Alimentación del pejerrey en la laguna de Chascomús. Relaciones ecológicas de complementación y eficiencia trófica del plancton. *Limnobiología* 1 (10): 447-460.
- ROBINSON, G.; ELLIS, I. and LENNAN, K. (1990) Immunocytochemistry. In: Theory and practice of histological techniques. Ed. Bancroft, J.; Stevens, A. and Turner, D.; Churchill Livingstone. Edimburgh.
- ROJAS-GARCÍA, C. and RONNESTAD, I. (2002) Cholecystokinin and tryptic activity in the gut and body of developing Atlantic halibut larvae evidence for participation in the regulation of protein digestion. *Journal of Fish Biology* 61 (4): 973-986.
- ROMBOUT, J.; LAMERS, C. and HELFRICH, M. (1985) Uptake and transport of intact macromolecules in the intestinal epithelium of carps (*Cyprinus carpio L.*) and possible immunological implications. *Cell Tissue Research* 239: 519-530.
- ROMBOUT, J. (1997) Enteroendocrine cells in the digestive tract of *Barbus conchoni* (Cyprinidae). *Cell Tissue Research* 185: 435-450.
- ROMEIS, B. (1989) *Mikroskopische Technik*. 17^o Ed. Bok, P (de) Urban-Schwarzenberg. Munchen. Wien. Baltimore.
- ROSS, M.; KAYE, G. and PAWLINA, W. (2005) *Histología. Texto atlas color con Biología celular y molecular*. 4^o Ed. Edit. Médica Panamericana
- ROSTENE, W. (1984) Neurobiological and neuroendocrine functions of the vasoactive intestinal peptide (VIP) *Neurobiology* 22: 103-129.
- SACHA RODRIGUEZ, N. (2006) Principales hormonas que controlan los procesos digestivos. *Fisiología Gastrointestinal* 28: 34-59.

- SAKAI, T.; SATOH, M.; KOYAMA, H.; UMAHARA, M. and ITOH, Z. (2003) Localization of motilin-immunopositive cells in the rat intestine by light microscopic immunocytochemistry. *Peptides* 15: 987-991.
- SASAKI, N. and YOSHIHARA, T. (1999) The effect of motilin on the regulation mechanism of intestinal motility in conscious horses. *Journal Veterinary Medical Science* 61: 167-170.
- SCHOEMAN, J.; VOS, V. and ASWEGEN, G. (1998) Distribution of endocrine cells in the gut of the impala (*Aepyceros melampus*). *Peptides* 65 (1): 31-35.
- SECOR, R. (2001) Vasoactive intestinal peptide determination in the gastrointestinal tract in vertebrates. *Neuropeptides* 50: 116-123.
- SEVERINI, P (2000) The tachikynin peptide Family *Pharmacological Research* 54 (2): 285.
- SHIN, S.; IMAGAWA, K.; SHIMIZU, E.; NAGAI, K. and YANAIHARA, N. (1980) Heterogeneity of immunoreactive motilin. *Endocrinology Japonica* 1: 141-149.
- SJOLUND, K.; SANDEN, C.; HAKANSON, R. and SUNDLER, F. (1983) Endocrine cells in human intestine: an immunocytochemical study. *Gastroenterology* 85: 1120-1130.
- SOLCIA, E. (1981) *Physiology of the gastrointestinal tract*. Raven Press New York pp 39-58.
- SPICER, S. and SCHULTE, B. (1992) Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 40:1 –38.
- STROBAND, H. and DEBETS, F. (1978) The ultrastructure and renewal of the intestine epithelium of the juvenile grasscarp (*Tenopharyngodon idella* (Val)) *Tissue Research* 187: 181-200.
- STRÜSSMANN, C.; MORIYAMA, S.; HANKE, E.; CALSINA COTA, J. and TAKASHIMA, F. (1996a) Evidence of thermolabile sex determination in atherine. *Journal Fish Biology* 48: 643-651.
- STRÜSSMANN, C.; TAKASHIMA, F.; TODA, K. (1996b) Sex differentiation and hormonal feminization in atherine *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* 139: 31-45.

- STRÜSSMANN, C. ; SAITO, T.; USUI, M.; YAMADA, H. and TAKASHIMA, F. (1997) Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two atherinid fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina* hatchery. *Journal Experientia Zoology* 278: 167-177.
- SUNDLER, F.; HILKMAN, R. and LANDER, S. (1980) Peptidergic nervous system in the gut. *Clinical Gastroenterology* 9: 517-543.
- TIBBETTS, I.R. (1997) The distribution and function of mucus cells and their secretions in the alimentary tract of *Arramphus sclerolepis krefftii*. *Journal Fish Biology* 50: 809-820.
- USELLINI, L.; BUCHAN, A.; POLAK, J.; CAPELLA, C. and SOLCIA, E. (1984) Ultrastructural localization of motilin in endocrine cells of human and dog intestine by the immunogold technique. *Histochemistry* 81: 363-368.
- USELLINI, L. (1990) Ultrastructural identification of human secretin cells by the immunogold technique. Their costorage of chromogranin A and serotonin. *Histochemistry* 94: 113-120.
- UVNAS-MOBERG, K. (1989) El tracto gastrointestinal durante el crecimiento y la reproducción. *Investigación y Ciencia* 23: 48-54.
- VALVERDE MARIN, M. (1988). Estudio inmunocitoquímico y ultraestructural de las células endocrinas del intestino de *Rana Temporaria*. Linnaeus, 1758. *Ciencia de la Vida-Zoología*. Facultad de Ciencias-División Biológica. Universidad de Navarra. España
- VENIER, J. (1990) Intestine ultrastructure in relation to lipid and protein absorption in teleost fish. *Comparative Physiology* 5: 166-175.
- VINCZE, E.; CANTOR, O.; KAUSZ, M.; NEMETH, J.; ARIMURA, A. and KOVES, K. (2000) Comparative study on the appearance of various bioactive peptides in foregut derivatives during the ontogenesis. *Early Human Development* 60(1): 98-104.

- VISSIO, P. (2000) Técnicas inmunocitoquímicas. En: Guía de curso de posgrado. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA. 5: 21-23.
- WITT, H. (1995) Distribution of vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in the taste organs of teleost fish and frog. *Histochemical Journal*. 27: 161-165.
- WOODWARD, B. and BERGERON, T. (1984) Protein histochemistry of the granule cells in the small intestine of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal Fish Biology* 24: 453-458.
- YOSHIDA, K.; IWANAGA, T. and FUJITA, T. (1983) Gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system of the flatfish, *Paralichthys olivaceus*: an immunocytochemical study. *Histology Japonica* 46 (2): 259-266.
- ZHILER, F. (1982) Gross morphology of digestive tract of Cichlidae (Teleostei, Perciformes): Phylogenetic and functional significance. *Journal Zoology* 32: 544-571.

U.N.R.C.
Biblioteca Central



64972

64972

