



DAURIA, P. G
Expresión de Gastrin

2011

69522



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Facultad de Agronomía y Veterinaria
Departamento de Anatomía Animal

Maestría en Anatomía y Fisiología Veterinaria

**EXPRESIÓN DE GASTRINA Y SECRETINA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL
DURANTE EL DESARROLLO FETAL DEL CABALLO**

Magister en Anatomía y Fisiología Veterinaria, de la Facultad de
Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto

Pascual Guillermo Dauria

Director de Tesis: Dr. Dante Paz

Dra. Mirta A. Valentich

Dra. Alicia N. Rolando

Dra. María Cristina Romanini

Méd. Vet. Pascual Guillermo Dauria

63522

MFN:
Clasif: V. 708

AGRADECIMIENTO

Mi memoria me ha acompañado siempre con una singular fragilidad.

Es mi corazón el que resguarda con afecto sincero aquello que, por su magnitud, no puedo recordar cabalmente. Es él, y no el raciocinio, quien conserva íntegros los sentimientos de lo que aprecio.

Mi espíritu sutil no puede permanecer incólume frente a la omisión posible, ello se traduciría en una desatención, y hasta escasa consideración, hacia quienes han compartido la presente creencia.

A los seres e instituciones que se sienten involucrados en este esfuerzo, para los tiempos presentes y de siempre, vaya pues mi especial reconocimiento.

Mis sentimientos son y serán refugio para los partícipes, y mis sensaciones, ante ellos, se atesoran en mi intimidad.

DEDICATORIA

Este esfuerzo lo dedico a quienes:

*Con la calidez de su amor sincero,
crearon en mí, un remanso de paz y consuelo
en momentos de especial intensidad.*

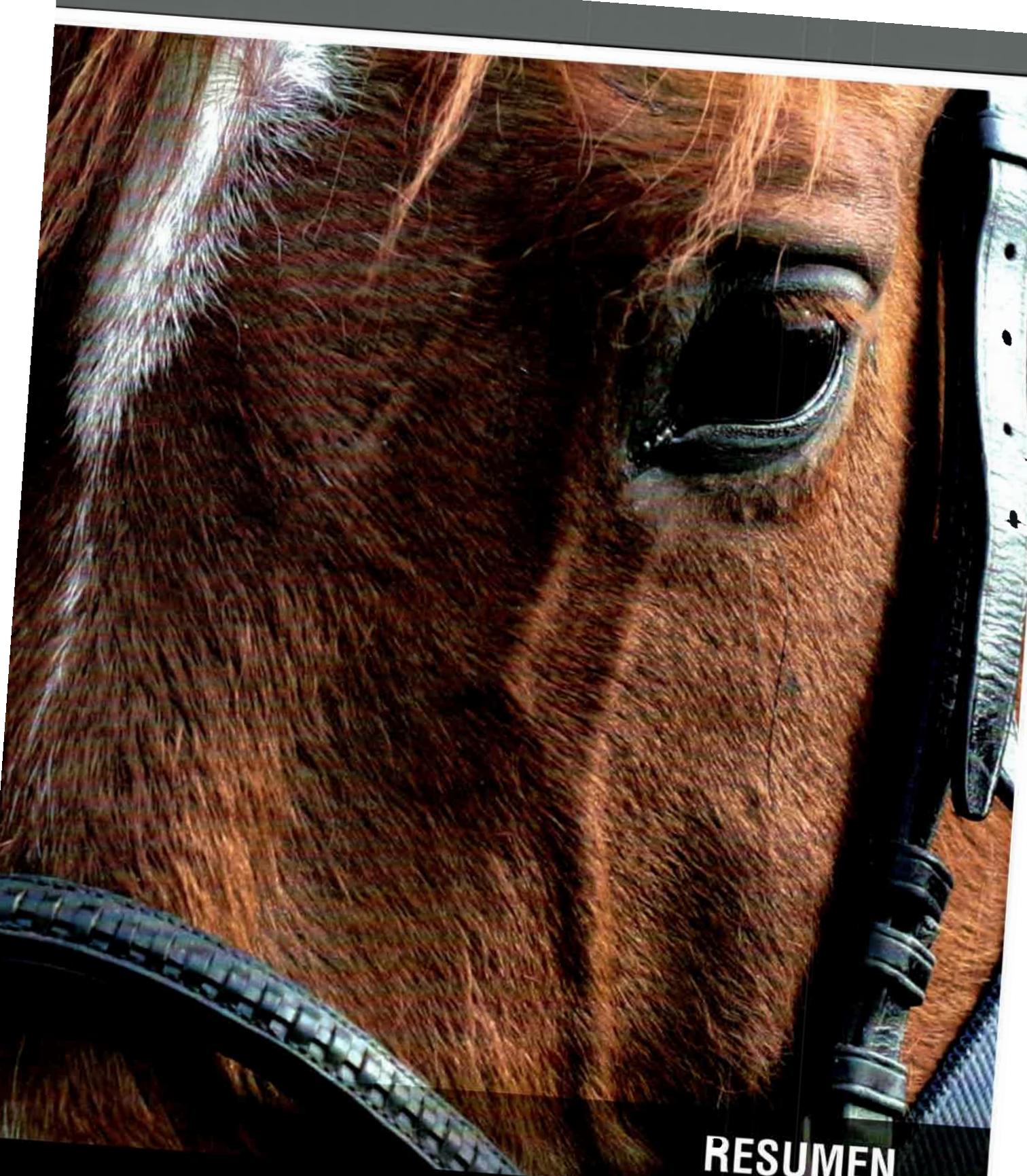
*Cerraron los ojos de sus almas
para abrirlos dentro de la mía.*

*Puedo contemplar, a través de mi corazón,
la belleza humana que caracteriza a cada uno
Y que se constituye en retoño de vida
para los tiempos que me restan.*

Este esfuerzo lo dedico.....a mi amada familia.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

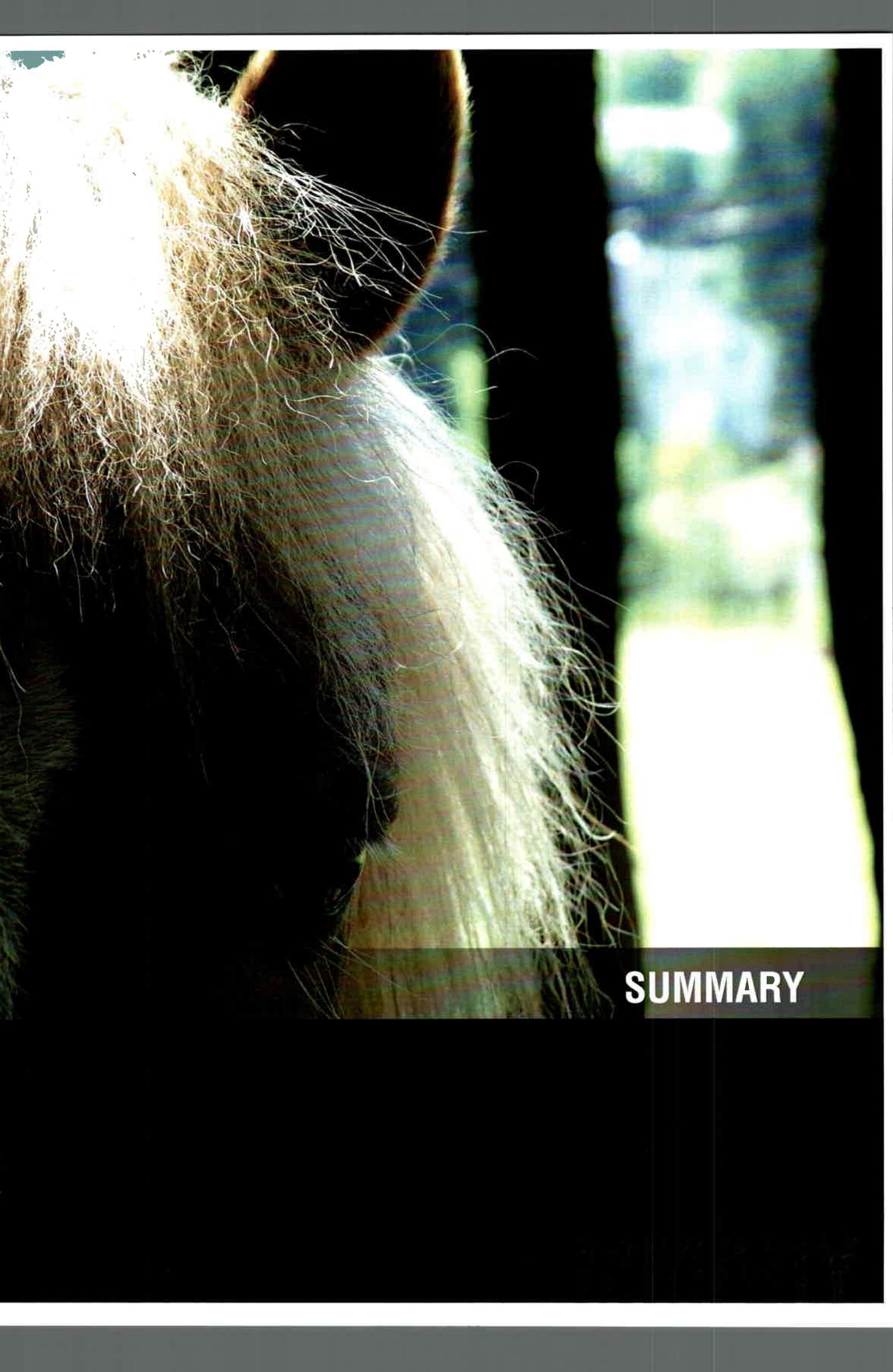
Resumen	1
Summary	2
Introducción	3
Fundamentación y Antecedentes	3
Objetivos	16
Materiales y Métodos	17
Recolección de muestras	17
Técnica de inmunohistoquímica	18
Expresión de resultados	20
Controles	20
Resultados	21
Valores crown-round (CR)	
Descripción histológica	23
Estudio inmunohistoquímico: Gastrina	37
Estudio inmunohistoquímico: Secretina	44
Discusión y Conclusiones	55
Discusión	55
Conclusiones	63
Bibliografía	68
Anexo I	76



RESUMEN

RESUMEN

El tracto alimentario posee células endocrinas diseminadas denominadas *células endocrinas asociadas al tracto digestivo* o *células enteroendocrinas*, concentradas principalmente en el estómago e intestino delgado. A través de ellas el tracto digestivo segrega hormonas que ejercen efectos no sólo en la digestión sino también en el metabolismo de los nutrientes ingeridos, emociones y conducta lo que muestra la relevancia que revisten en las diferentes etapas del individuo, entre las que se incluyen el crecimiento y la reproducción. Su presencia ya se detecta en la vida fetal temprana (período G1) en diferentes especies, lo que hablaría a favor de una posible actividad durante las etapas fetales más avanzadas (períodos G2-G3). La falta de estudios relacionados con la presencia de hormonas gastrointestinales (GI) durante el desarrollo fetal de caballos, nos induce a comenzar este estudio analizando, en una primera etapa, la expresión de gastrina y secretina dado el rol fundamental que ellas juegan en los procesos digestivos. El caballo, como unidad productiva, provoca impactos rentables en lugares dedicados a su explotación, lo cual conlleva a analizar distintos aspectos y situaciones que hacen al comportamiento de su desarrollo. En nuestro caso interesa identificar la presencia de las mencionadas hormonas (GI) en distintas etapas del desarrollo fetal (G1-G2 y G3). Se utilizaron fetos de caballo de diferentes períodos de gestación (G1-G2-G3). Las muestras de estómago, intestino delgado y grueso se fijaron en formol tamponado al 10%; incluyeron en parafina y procesaron mediante la técnica histológica convencional. Las preparaciones obtenidas se sometieron a la técnica de inmunohistoquímica para la determinación de gastrina y secretina. Los datos obtenidos arrojaron los siguientes resultados: para ambas hormonas, en los tres períodos, se detectaron células positivas de tipo abierto y cerrado. En fetos correspondientes al período G1, se identificaron células positivas a gastrina en tejido epitelial y conectivo. En el epitelio las células mostraron formas variadas con gránulos de aspecto no uniforme y distribución homogénea. En cuanto a secretina, se observó reacción en células ubicadas entre las células del epitelio de revestimiento presentando diferentes tamaño, morfología e intensidad. Asimismo, hubo positividad en el tejido conectivo donde las células resultaron ser de menor tamaño y con gránulos intensamente teñidos. En G2, a nivel de estómago, se identificaron células positivas a gastrina, principalmente en el epitelio superficial y criptas gástricas presentando, dichas células, forma redondeada y piramidal con gránulos de aspecto y distribución variada. En duodeno, las células positivas se localizaron entre los enterocitos, en las glándulas intestinales, en el tejido conectivo y en las glándulas de Brunner; mientras que en yeyuno-íleon no hubo reacción. Con respecto al intestino grueso, las células reaccionantes se observaron en la zona basal del epitelio, en las glándulas intestinales y en el tejido conectivo. Con relación a la hormona secretina, en duodeno se identificó reacción positiva en las células ubicadas entre los enterocitos, en el tejido conectivo del corion, presentando distintas formas y tamaño, y a nivel de la desembocadura de la glándula intestinal. En yeyuno la presencia de células positivas fue similar a la de duodeno salvo que la frecuencia de aparición resultó menor. En el ciego, las células reaccionantes se visualizaron entre las del epitelio de revestimiento y en glándulas intestinales, presentando forma e intensidad variable. En fetos del período G3, los resultados demostraron la presencia de estas hormonas en diferentes períodos de la gestación, incluida la etapa temprana del desarrollo. Su distribución fue similar a la de otras especies, aunque la localización mostró algunas variantes, al igual que algunos parámetros morfológicos. Se concluye que ambas hormonas se detectan a partir del período G1. La gastrina se encuentra presente en estómago, duodeno e intestino grueso, localizándose en el epitelio de revestimiento, criptas, glándulas y tejido conectivo. Con respecto a la secretina, las reacciones positivas se identificaron en el epitelio de revestimiento, glándulas y tejido conectivo de duodeno, yeyuno y ciego.



SUMMARY

SUMMARY

Along the whole alimentary tractus, the epithelium of coating contains endocrine cells which are called endocrine cells associated to the digestive tract or enteroendocrine cells. These are mainly concentrated in the stomach and small intestine. Through them the digestive tract secretes a group of hormones basically peptides have which deep effects not only in the own digestion but also in the metabolism of the nutrients taken. Its action also involves the emotions and behaviour which make evident the importance that they have in the different stages of the individual, including growth and reproduction. However, its presence is detected in the early foetal life (G1 period) in different species, which would suggest a possible activity during more advanced foetal stages (G2-G3). Due to the lack of studies related to the presence of gastrointestinal hormones (G1) during the foetal development of horses we considered convenient to begin this study, analysing in a first stage, the gastrin and secretin expression. This choice is based on the fact that such hormones play a fundamental role in the digestive processes. It is accepted that the horse, as productive unit, causes profitable impacts in places devoted to its exploitation, it is conducive to analyze different aspects and situations which contribute to the behaviour of its development. In the case we are working on it is important to identify the presence of the mentioned gastrointestinal hormones in different stages of the foetal development (G1-G2-G3). The samples of stomach, small intestine and large intestine were fixed in formol tamponed at 10%; they were included in paraffin and were processed by the conventional histological technique. The preparations obtained were submitted to the immunohistochemistry technique for gastrin and secretin determination. The results were: in foetuses of G1 period, positive cells to gastrin in ephitelial level and connective tissue were identified. The cells had different forms with non uniform granules and homogeneous distribution. Respect to secretin, a reaction was observed in cells situated between the cells of the epithelial covering, presenting different size, morphology and intensity. However there was positivity in the connective tissue where the cells were smaller and had intensely dyeing granules. In G2 positive cells to gastrin in stomach were identified, mainly in the superficial epithelium and gstric crypts, presenting rounded and pyramid form with varied aspect and distribution. In duodenum, positive cells are located between the enterocytes, in the intestinal glands, in submucosa connective tissue and in Brunner glands; which in jejunum-iliun there was no reaction. With respect to the large intestine, the reactant cells were observed in ephitelium`s basal zone, in the intestinal glands and in the connective tissue. In relation to secretin, in duodenum a positive reaction in cells situated between epithelial covering cells was identified, in the corion connective tissue, presenting different form and sizes, and the level of the intestinal gland mouth. The presence of positive cells was similar in jejunum-iliun and duodenum, except for the frequency of appearance which was lower. In the caecum, reactant cells were visualized between ephitelial covering cells and intestinal glands, presenting varied form and intensity. In fetus of the period G3, the pattern of positive expression indicated in the prior period, was similar referring gastrin as a secretin. The results showed the presence of these hormones in different periods of gestation, including the early stage of development. Its distribution was similar to the one from other species, although the localization showed some variants, as well as some morphological parameters. It is concluded that both hormones are detected from the period G1. The gastrin is present in stomach, duodenum and large intestine situated in the ephitelium covering, crypts, glands and connective tissue. With respect to the secretin, the positive reactions were identified in the ephitelium covering, glands and connective tissue of the duodenum, jejunum-iliun and caecum.



INTRODUCCIÓN

EXPRESIÓN DE GASTRINA Y SECRETINA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL DURANTE EL DESARROLLO FETAL DEL CABALLO.

DIRECTOR: Dr. Dante Paz

TESISTA: Med. Vet Pascual Guillermo Dauria

El caballo

Es un ser que posee la belleza, sin la vanidad; la fuerza, sin la insolencia; el valor, sin la ferocidad; y todas las virtudes del hombre sin sus vicios.

EL CABALLO, es la más noble conquista del hombre. (Homenaje del Jockey Club Río Cuarto).

INTRODUCCIÓN

A lo largo de todo el tracto alimentario, el epitelio de revestimiento contiene células endocrinas diseminadas que se denominan **células endocrinas asociadas al tracto digestivo o células enteroendocrinas**. Están concentradas principalmente en el estómago y el intestino delgado, pero se encuentran también en el esófago distal y en el intestino grueso, así como en los conductos de los órganos que drenan al intestino (es decir, los conductos biliares y pancreáticos) (UCGS, 2003, 2007; Ceccarelli et al 1985, 1987, 1990, 1995; Krause et al 1985; Agungpriyono et al.2000; Alumets et al., 1977,1983; Castaldo et al., 1994; Dall'Aglio et al., 1998; Kitamura et al.,1984; Maala et al., 1997; Peranzi et al., 1984; Sjölund et al., 1983; Falkmer et al., 1989).

A través de ellas el tracto digestivo segrega un conjunto de hormonas, básicamente peptídicas, que ejercen profundos efectos no sólo en la propia digestión, sino también en el metabolismo de los nutrientes ingeridos. Su accionar se traduce, inclusive, sobre las emociones y la conducta (Uvnäs-Moberg,1989) lo que pone de manifiesto la relevancia que ellas revisten en las diferentes etapas del individuo, entre las que se incluyen el crecimiento y la reproducción; aunque su presencia ya se detecta en la vida fetal temprana en el humano (Bryant et al.,1982), en el cerdo (Alumets et al., 1983), en ovinos (Ceccarelli et al., 1991) y en bovinos (Gilloteau et al., 1998).

Las células enterocromafines, denominadas así por su semejanza con las células cromafines de la médula adrenal, posteriormente demostraron afinidad por las tinciones con sales de plata motivo por el cual se las denominó argentafines (Pearse,

1969; Grimelius et al., 1980). Estas consideraciones coinciden con aquellas que, como sinónimo antiguo, hacen referencia al de células enterocromafines habida cuenta de su reacción con el dicromato potásico para producir un pigmento marrón. Los métodos inmunocitoquímicos han demostrado la existencia de muchas más células enteroendocrinas de las que pueden observarse con los métodos argénticos, e indican al mismo tiempo su principal producto de secreción. Estas técnicas han sustituido pues, eficazmente, a los métodos argénticos empíricos para la detección de estas células. En cortes histológicos comunes las células enteroendocrinas son difíciles de identificar con la tinción habitual de Hematoxilina/Eosina (H/E), ya que no muestran características morfológicas notables (UCGS, 2007).

En general, a las células enteroendocrinas, se las describen como células pequeñas, con un núcleo redondo esférico y un citoplasma con tinción débil. Están situadas en contacto con la membrana basal en la que asientan las células epiteliales mucosas; muchas de aquellas células no están en contacto con la luz. Las vesículas neurosecretoras se concentran fundamentalmente en la porción basal de las mismas, razón por la cual se las llamó células acidófilas basigranulares, lo cual permite observar una acidofilia más evidente en la zona basal de la célula (UCGS, 2007). Esto concuerda con la función endocrina de estas células ya que el producto de secreción es liberado al tejido conectivo intersticial.

Por su parte, Bassan et al., 2000, desde un punto de vista histológico, describen a las células enteroendocrinas como células con citoplasma claro, dado que no hay suficiente RNA para revelar basofilia ni membranas que le confieran acidofilia. Asimismo, refiere a la presencia de gránulos secretorios que exhiben metacromasia enmascarada, reaccionan con la hematoxilina plúmbica, las sales de cromo y las de plata.

Por su lado, Gázquez Ortiz et al., 2004, hacen referencia a las células endocrinas del estómago, sin precisar especie animal alguna, como aquellas que se localizan en la base de las glándulas fúndicas en contacto con la membrana basal no siendo observables con las técnicas usuales de laboratorio. Desde un punto de vista morfológico, presentan las características típicas de una célula de secreción endocrina, es decir, que se trata de una célula piramidal, en cuyo borde basal se ubican gránulos de secreción de diversos tamaños. A estas células se les atribuye la

secreción de gastrina, aunque existen otras células gastroendocrinas que secretan otras hormonas, como la colecistocinina (CCK). La secreción hormonal se vierte a los capilares del corion. El mismo autor describe a las células enteroendocrinas del intestino delgado como aquellas que, de manera dispersa y en menor número que los enterocitos, se ubican o localizan especialmente en las criptas. Se trata de células con núcleo esférico y citoplasma escasamente teñido con la técnica de H/E, el cual presenta pequeños gránulos acidófilos en la zona basal. En los mamíferos domésticos estas células se distribuyen en forma y frecuencia variable por lo que algunos tipos celulares se encuentran en todo el tramo del intestino delgado, mientras que otras lo hacen en determinados segmentos. Las células G forman parte de la población celular endocrina junto a otras como las células S, CCK (productora de colecistocinina), etc. Respecto al ciego, hace referencia a la presencia de escasas células enteroendocrinas ubicadas en el tercio inferior de las criptas.

Asimismo, Dellmann, 1993, al referirse a la localización de las células endocrinas en el estómago de diferentes especies domésticas (carnívoros, cerdo, caballo), menciona que ello ocurre en todas las regiones glandulares de dicho órgano extendiendo su presencia hacia el intestino delgado. Describe a las células como débilmente teñidas siendo difícil su identificación en los cortes teñidos con H/E. Poseen pequeños gránulos los cuales se alojan en la base de la célula.

Algunas células llegan a alcanzar la superficie luminal mientras que otras no logran hacerlo.

En humanos, las células de tipo abierto tienen su polo mucoso cubierto por microvellosidades permitiendo la comunicación directa de estas células con el contenido de la luz intestinal; de esta forma responden a la presencia de nutrientes, secreciones intestinales (principalmente jugo biliar y pancreático), cambios en el pH u otros factores estimuladores e inhibidores contenidos en el quimo.

Las células endocrinas de tipo cerrado secretan sus péptidos mediante procesos citoplasmáticos en la proximidad de células epiteliales, actuando entonces de un modo paracrino. (Sakamoto et al., 1985, Ortea López, 1995).

En caballos, Ceccarelli et al., 1995, describen a este último tipo celular como escaso, de forma redondeada u oval, con frecuentes procesos citoplasmáticos discurriendo o proyectándose a lo largo de la membrana basal. Desde una perspectiva más funcional que morfológica, Fujita, 1976 y Fujita et al., 1988, se refieren a las células de tipo

abierto, también llamadas receptoras, como aquellas que muestran cierta habilidad para recibir y transmitir estímulos luminales en forma no mecánica; es decir que, ante un estímulo, la célula toma una partícula determinada, la incorpora y luego metaboliza. En cambio, las células de tipo cerrado, muestran una supuesta habilidad para recibir y transmitir estímulos mecánicos como el alargamiento, esto significa que, ante un estímulo, la célula enteroendocrina reacciona mecánicamente alargando su citoplasma. Ambos tipos celulares han sido hallados en otros mamíferos como el corzo (Ceccarelli et al., 1995), las que respetaron la forma piramidal revistiendo la característica de tipo abierto; detectándose una mayor presencia de ellas en la porción proximal del duodeno.

En el intestino grueso del corzo, las células halladas fueron escasas.

Para el caso específico de la gastrina, dicho autor observó células de tipo abierto en la mucosa de la región pilórica del estómago y en el intestino delgado. En el duodeno identificó escasas células G y menos aún en el intestino grueso. Más específicamente, las células positivas a gastrina se detectaron en el cuello de las glándulas de la región pilórica del estómago, tal como ocurre con el buey (Rizzotti et al., 1980 a) y en el caballo (Kitamura et al., 1984). Estos autores no efectuaron determinaciones de secretina.

Al conjunto de células mencionadas en los párrafos precedente, se las han considerado como miembros de la gran familia de células enteroendocrinas (Fujita et al., 1988), participando en la estimulación de las fibras musculares lisas y secreción exocrina de glándulas intestinales (Furness y Costa, 1982). Muchos de los péptidos intestinales fueron identificados primeramente en el cerebro bajo la denominación de neuropéptidos como lo es la secretina. Referirse entonces a sistema neuroendocrino implicaría incluir no sólo a las células enteroendocrinas sino también a las de otros aparatos para brindar así un sistema más amplio. Esto obedece a que las hormonas que se encuentran en el tracto digestivo también lo están en las células nerviosas actuando como neurotransmisores en las sinapsis; como hormonas circulantes luego de ser liberadas a la circulación sanguínea o bien cumplir con una función paracrina. Referirse a sistema enteroendocrino es hacer alusión al conjunto de células de la mucosa del tracto gastrointestinal e islotes de Langerhans que secretan péptidos por mecanismos de acción paracrina o al torrente circulatorio con el fin de actuar como hormonas circulantes. Cualquiera sea el mecanismo empleado, las funciones secretorias y de motilidad las regulan en consonancia con el sistema nervioso entérico

(Geneser, 2000). Dichas células constituyen la población celular más grande y se ubican en todas las regiones del tracto gastrointestinal. En la actualidad todas las células que a nivel de dicho tracto producen péptidos, se agrupan bajo la denominación de células **endocrinas gastroenteropancreáticas (GEP)**.

Por lo tanto, las hormonas gastrointestinales son secretadas por células endocrinas especializadas que se distribuyen en el tracto gastrointestinal (GI). La estimulación nerviosa de las mismas se lleva a cabo por vía parasimpática (vagal), mientras que la inhibición por vía simpática (esplácnica).

Dichas células se disponen entre las células epiteliales y caliciformes, encontrándose, en términos generales, en mayor cantidad en duodeno y yeyuno tendiendo a disminuir hacia el ileon y colon (Polak y Priestley, 1992). En la oveja, se han identificado células productoras de gastrina en el yeyuno proximal y en el ileon distal, siendo morfológica y estructuralmente diferentes de las células G de la mucosa pilórica. Por su parte, Kitamura et al., 1990, identificaron gastrina en la porción terminal del intestino y recto en mamíferos insectívoros (*Suncus marinus*). Si bien en un principio las células enteroendocrinas fueron identificadas mediante letras, como las células de los islotes pancreáticos, con el advenimiento de la inmunohistoquímica y ultraestructura, la clasificación se planteó desde una óptica funcional basada en el producto de secreción (Galán Torres, 1995).

Es así que, en el estómago de humanos, se reconocen a las células G vinculadas con la secreción de gastrina; las D con la somatostatina y a las ECL (enterochromaffin like cells) con la histamina. En humanos, las células G son muy escasas en el duodeno y glándulas de Brunner, encontrándose mayoritariamente en las glándulas pilóricas del antro gástrico. Sus gránulos toman una ubicación basal respecto al núcleo y en el vértice se encuentra un penacho de microvellosidades lo que le imprime el carácter de tipo abierto dentro del universo de las células enteroendocrinas. La secreción de la hormona contenida dentro de dichos gránulos se efectúa por exocitosis y es transportada por sangre a las células blanco (Ortea López, 1995).

La distensión de la pared del tubo digestivo, la presencia de alimentos en éste o el pH bajo son estímulos que provocan la secreción hormonal, la cual actúa localmente en el propio tubo digestivo reforzando la digestión. Las hormonas también son liberadas a la circulación sanguínea para actuar en distintas partes del tubo gastrointestinal en lo referente a motilidad y secreción de enzimas digestivas y de ácido. Es así que, en humanos, la hormona gastrina (antro gástrico y duodeno proximal), estimula la

motilidad y la secreción del jugo gástrico (ácido y pepsinógeno), a la vez que favorece el crecimiento y mantenimiento de la mucosa gástrica (efecto trófico). La presencia de aminoácidos y distensión estomacal actúan como estímulo para la liberación de gastrina y de GRP (péptido liberador de gastrina), el cual es liberado por las fibras vagales posganglionares que inervan a las células G. Por el contrario, la inhibición de la secreción de la hormona se atribuye a la acumulación de ácido en la luz estomacal (retroalimentación negativa) (Harrison, 1991) como así también a la secreción de somatostatina (Varro et al., 1990). Experimentalmente se demostró en humanos que, después de una comida, la inyección de G y S producen una vasodilatación esplácnica, lo cual no significa que fisiológica y naturalmente ocurra este mecanismo, pero dejaría ver el efecto vasodilatador que podría haberles a estas hormonas (Narváez-Sánchez et al., 2004). Desde otra óptica funcional, en caballos adultos, se comprobó el efecto estimulador que la gastrina y secretina ejercen sobre la liberación de la insulina (Dupre et al., 1973).

A continuación se detallan algunos aspectos bioquímicos y fisiopatológicos de la gastrina,

Se trata de un péptido que se presenta en varias formas moleculares en función de su tamaño, carga eléctrica molecular y actividad biológica. Generalmente se muestra, en sus formas mayores, como un péptido grande de 34 aminoácidos (G-34) o como un péptido pequeño de 17 residuos (G-17) obtenido a partir del extremo COOH de G-34. Las formas menores, conocidas como minigastrina (G-14, G-6, G-4) juegan un papel responsable en la actividad biológica de la molécula, siendo precisamente los últimos cinco aminoácidos del extremo COOH, la porción funcional de la gastrina.

Dicha hormona es producida, almacenada y segregada por las llamadas **células G**, localizadas en el antro gástrico y en la parte superior del duodeno. Su liberación parece estar mediada por agentes químicos que actúan directamente sobre dichas células y que proceden de la sangre; de las terminaciones nerviosas; de las células paracrina vecinas o bien del contenido gástrico. Su secreción es estimulada por iones Ca^{2+} y Mg^{2+} ; por la hormona del crecimiento; la adrenalina y la bombesina. La inhibición de la secreción de gastrina se produce por un descenso del pH gástrico (valores de pH en torno a 2,5 ó inferiores), por la somatostatina, el glucagón, la secretina y por el péptido intestinal vasoactivo.

La gastrina tiene varias funciones fisiológicas importantes, entre las que se pueden destacar, gracias a su interacción con histamina y acetilcolina, la estimulación de la

secreción ácida de las células parietales gástricas; la proliferación de la mucosa del estómago; la contracción del esfínter esofágico inferior y la contracción del músculo liso y su actividad eléctrica.

Desde un punto de vista patológico, la secreción excesiva de gastrina da lugar a un conjunto de signos y síntomas que se conoce como síndrome de Zollinger-Ellison.

(Psicobiología.Net :N3:Participación Plástica y Funcional, 2006).

Las **células S** son las encargadas de producir secretina y actúan estimulando las células secretoras del sistema de conductos excretores del páncreas para la liberación de jugo pancreático con elevado contenido en bicarbonato y agua, pero escasas enzimas. Asimismo, estimula la secreción de bicarbonato por la bilis (Ortea Lopez, 1995). La secretina es liberada ante la presencia de productos de degradación proteica y el quimo ácido presentes en el intestino delgado superior (Lloyd, 2000).

A continuación se describen algunas consideraciones particulares de la hormona secretina. Se trata de un péptido lineal de 27 aminoácidos que se encuentra relacionado estructuralmente con el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el péptido inhibidor gástrico (GIP), glucagón, el factor hipotalámico liberador de hormona del crecimiento (GRF), con el péptido histidina N-terminal isoleucina C-terminal (PHI) y con la helodermina.

Se produce gracias a la acción de las células S, que se encuentran localizadas en el intestino delgado, en concreto en el duodeno, aunque también están presentes en el cerebro. Su secreción depende del grado de acidificación del contenido duodenal, necesitándose valores de pH de 4,5 o inferiores.

Entre las funciones de la secretina se destacan su efecto inhibitorio sobre la liberación de gastrina y la secreción ácida del estómago, aunque, realmente, su principal efecto fisiológico es el de servir como modulador positivo de la secreción exocrina pancreática rica en bicarbonato, durante el proceso de la digestión. También cabe destacar su papel en la secreción de otras sustancias como la insulina gracias a las células b de los islotes pancreáticos, de pepsina y mucus gástrico, además favorece la secreción de agua y electrolitos por la vesícula biliar así como la actividad secretora de las glándulas de Brunner. Por otro lado, inhibe el tono del esfínter esofágico inferior y la motilidad gástrica. Su excreción es llevada a cabo en el riñón. (Psicobiología.Net:N3:Participación Plástica y Funcional, 2006).

La colecistoquinina-CCK- (duodeno y yeyuno) inhibe la evacuación gástrica favoreciendo la digestión y la absorción de nutrientes en la circulación, como asimismo estimula la liberación de bilis y secreción de enzimas pancreáticas. La secretina (duodeno y yeyuno) estimula la secreción pancreática de bicarbonato neutralizando la acidez del jugo gástrico; la producción de pepsina y la producción de bilis a nivel hepático. El polipéptido pancreático inhibe la secreción exocrina pancreática y estimula el vaciamiento gástrico. La motilina regula la motilidad gastrointestinal. Por otra parte, todas estas hormonas participan en el crecimiento del grosor de la mucosa del tubo digestivo, especialmente la hormona enteroglucagón (Uvnäs-Moberg, 1989).

La somatostatina, originalmente descrita en el hipotálamo de vertebrados, es otra de las hormonas identificadas en el tracto digestivo, incluyendo los humanos. Ejerce un efecto inhibitorio ya que disminuye la motilidad gastrointestinal, bloquea la secreción de ácido clorhídrico en el estómago, la evacuación de bilis, la absorción de nutrientes y la liberación de las hormonas gastrina y colecistoquinina, contrarrestando, así, el efecto activador sobre el crecimiento que estas dos últimas hormonas ejercen en el tracto GI. Se ha determinado un mecanismo paracrino inhibitorio de la somatostatina a nivel del estómago de distintos mamíferos (Reichlin, 1983). A diferencia de las otras hormonas GI, la liberación de la somatostatina se inhibe por acción vagal. La vagotomía en terneros mostró una disminución en el número de células endocrinas, incluida la gastrina, lo que sugeriría que el nervio vago tiene una influencia en el sistema de regulación intrínseca que se encuentra bajo el control de células endocrinas (Soehartono et al., 2002).

Otras hormonas gastrointestinales tales como motilina y el GIP (péptido inhibitorio de gastrina) se aislaron del duodeno y yeyuno; el VIP (péptido vasoactivo intestinal) del íleon y colon; el GRP (péptido liberador de gastrina) del antro y fundus del estómago; el glucagón del páncreas, intestino delgado (especialmente del yeyuno), fundus gástrico (perro) y en feto humano; la neurotensina mayoritariamente del íleon; insulina y PP (polipéptido pancreático) del páncreas; la sustancia P del íleon, etc. En la actualidad se reconocen más de 25 péptidos gastrointestinales. En humanos se observó que del total de la población celular endocrina, el mayor porcentaje correspondió a las células positivas a serotonina, seguidas, en orden porcentual, por glucagón; gastrina y colecistoquinina; GIP; somatostatina; neurotensina y secretina (Sjölund et al., 1985).

Determinados péptidos se vinculan en forma preferencial con determinados tejidos o estructuras. La gastrina, secretina, GIP, enteroglucagón y neurotensina se asocian al epitelio; mientras que el VIP, sustancia P y GRP a la lámina propia, submucosa y músculo. La somatostatina y colecistoquinina se asocian al epitelio y capas no epiteliales dependiendo del segmento del tracto gastrointestinal en cuestión. Por otra parte, una misma célula endocrina puede expresar dos o más péptidos (Ferri et al., 1983).

Es reconocido que hormonas GI, como la colecistoquinina, neuropéptido Y (NPY), neurotensina, somatostatina, sustancia P, VIP, etc., son también producidas por neuronas a nivel del SNC y SNP; especialmente aquellas que se ubican en el tracto entérico. Actúan sobre células "target" sin entrar a la sangre, ejerciendo efectos biológicos fuera del sistema digestivo. Los péptidos identificados en cerebro muestran una distribución regional, tales como la CCK en corteza y estructura telencéflica (hipocampo).

La marcada elevación de peso que paulatinamente experimenta el lactante desde su nacimiento, hace pensar en la presencia de un tracto digestivo previamente desarrollado y activo para esa etapa, teniendo presente los mecanismos anabólicos que ocurren en la misma. Algunas experiencias realizadas en humanos muestran que los niveles altos de gastrina del recién nacido puede explicarse, en parte, a la estimulación previa de la función gastrointestinal durante la vida fetal, donde el tracto GI recibe un "entrenamiento" en el útero para la futura tarea de la digestión (Uvnäs-Moberg, 1989). Más aún, se demostró que la ingestión de líquido amniótico es importante para el desarrollo del tracto GI del feto ya que ello va seguido de una secreción de gastrina fetal (para estimular la maduración del tracto GI), somatostatina y ácido gástrico con una cronología similar a la que se observa en el recién nacido en el período posprandial (Uvnäs-Moberg, 1989).

Se ha comprobado que los niveles de somatostatina son más elevados en niños enfermos. Durante el estrés es conocido que el sistema simpático se activa lo cual provoca una inhibición de la motilidad y secreción del tracto GI, como así también la disminución de hormonas que estimulan el anabolismo, lo cual conlleva a pensar que la somatostatina sería la responsable de la disminución del crecimiento y de las alteraciones gastrointestinales (Uvnäs-Moberg, 1989). Se han observado también

modificaciones cualitativas y cuantitativas en células productoras de hormonas gastrina y somatostatina en animales de experimentación (ratas) sometidos a dietas modificadas (Koko et al.; 1998). Sobre el particular no se ha encontrado información referente a lo que sucede en los estadios fetales en situación similar.

Si bien lo explicitado responde mayormente a experiencias efectuadas en humano, al menos, en algunos aspectos, ciertos trabajos fueron llevados a cabo en animales domésticos, como lo revelan estudios relacionados con la presencia y distribución de células endocrinas a lo largo del sistema gastrointestinal (Capella et al., 1969; Capella et al., 1972; Domeneghini and Castaldo, 1981; Peranzi et al., 1984; Ceccarelli et al., 1985, 1987, 1990; Ceccarelli et al., 1995), tanto en individuos adultos (Kitamura et al., 1984; Kim et al., 1998; Furuse et al., 1999; Rizzotti et al., 1979, 1980 a,b), como en etapas tempranas del desarrollo (Ceccarelli et al., 1991; Alumets et al., 1977; Guilloteau et al., 1998). Experiencias similares se realizaron en algunos mamíferos (Peranzi et al., 1984; Ceccarelli et al., 1995; Maala et al., 1997; Baltazar et al., 1998; Lucini et al., 1999); como así también en lagartos (Díaz de Rada, 1992) y peces (Chiba et al., 1995; Kiliaan et al., 1996).

Kitamura et al., 1984, determinaron con la técnica de inmunohistoquímica, la distribución de células enteroendocrinas en caballos adultos. Las encargadas de producir gastrina fueron observadas únicamente en la región pilórica del estómago y en la porción proximal del intestino delgado; mientras que las células productoras de secretina se observaron en el duodeno. En el colon y recto se detectaron células inmunoreactivas a la somatostatina y glicetina. En el duodeno de equinos adultos se han reconocido, mediante técnicas inmunohistoquímicas, células que contienen serotonina, CCK, gastrina y somatostatina; mientras que el glucagón y somatostatina se identificaron en células del colon y recto respectivamente (Ceccarelli et al., 1990). Las células enterocromafines no se identificaron en las porciones distales del duodeno (Ceccarelli et al., 1995) mostrando diferencias con lo hallado en otros animales domésticos donde dichas células se encontraron a lo largo de todo el tracto gastrointestinal (Peranzi et al., 1984; Ceccarelli et al., 1987, 1991; Krause et al., 1984, 1985; Rizzotti et al., 1979). La carencia de células enterocromafines en el intestino grueso del equino no es fácil de explicar; quizás se necesite información referente a tipo y distribución de terminaciones nerviosas en porciones intestinales (Ceccarelli et al., 1995). Células endocrinas, distintas a las enterocromafines, mostraron una

distribución similar a la descrita en los animales monogástricos y polícavitarios (Rizzotti et al., 1979, 1980; Ceccarrelli et al., 1985).

En potrillos Pony de hasta 7 días de nacidos se mencionan como hallazgos importantes los relacionados a la respuesta hormonal intestinal (gastrina, motilina, neurotensina, polipéptido pancreático, enteroglucagón) frente a una ingesta de forrajes (Ousey et al., 1995). La gastrina provoca la liberación de ácido clorhídrico y pepsinógeno en el estómago para la digestión proteica (Tietz et al., 1986). En el potrillo recién nacido la carencia de una respuesta a la gastrina se puede deber a la absorción intacta de inmunoglobulinas en el tracto digestivo, proveyéndose así de defensa a la circulación, por consiguiente, una respuesta pobre de gastrina en potrillos recién nacidos limita la secreción de ácido clorhídrico y pepsinógeno. En potrillos de un día de edad, la concentración de pepsinógeno es alta en relación a aquellos que poseen más días de nacidos. Por ello, la baja concentración de gastrina en potrillos recién nacidos, puede ayudar a prevenir la degradación proteica limitándose la secreción del ácido clorhídrico lo cual, a su vez, reduce la desnaturalización química de la proteína y previene el establecimiento de las condiciones óptimas para la acción del pepsinógeno. Se observó que la concentración de gastrina plasmática y del polipéptido pancreático fue significativamente más baja y alta, respectivamente, después de la primera alimentación y con los valores obtenidos en las alimentaciones subsiguientes (Ousey et al., 1995).

También se menciona la incidencia similar que tiene la ingesta láctea en neonatos de otras especies, traducido como cambios en la concentración plasmática de hormonas intestinales (Bunn & Tichen, 1984; Toullec et al., 1992; Oben et al., 1992; Ousey et al., 1995). Unos estudios (Smyth et al., 1989; Ousey et al., 1995) hacen referencia al incremento de la concentración plasmática de gastrina en potrillos jóvenes después de una alimentación que declina en la edad postnatal, lo que sugiere que existirían diferencias con relación a lo observado en neonatos de otras especies. Por su lado, Sandini et al., 1998 demostraron que en caballos sometidos a una dieta voluminosa se produce una rápida aparición de gastrina en el plasma como también una elevación en la concentración de la misma, en contraposición a lo que ocurre con una dieta poco voluminosa. Esto explicaría la incidencia de la distensión gástrica en la liberación de la hormona. A su vez, una dieta rica en granos, provoca una aparición lenta de dicha hormona que cuando aquélla consiste en heno; aunque la concentración plasmática

de gastrina perdura más tiempo cuando la dieta es rica en granos. Experimentalmente no encontraron, entonces, que la gastrina actúe como hormona de estrés en el caballo.

En condiciones anormales se producen impactos que afectan la acción hormonal a nivel del tracto gastrointestinal. Es así que los desórdenes alimentarios representan una causa significativa en la mortalidad de potrillos después del nacimiento (Platt, 1973). Ciertos trabajos realizados sobre caballos neonatos (Cranwell & Hansky, 1980; Lucas et al., 1980 c, d; Toullec et al., 1992; Ousey et al., 1995) revelan la importancia que pueden tener los desórdenes gástricos sobre el rol fisiológico de la gastrina, enteroglucagón, motilina, neurotensina y polipéptido pancreático, lo cual podría constituirse en un indicador importante relacionado con el estado nutricional. No hay datos referentes sobre fetos en esta especie.

Dado que los valores altos de hormonas gastrointestinales (polipéptido pancreático, motilina y enteroglucagón) obtenidos del cordón umbilical de fetos humanos coincidieron con un estado de estrés que los mismos padecieron (Lucas et al., 1985); y que en niños afectados con gastroenteritis aguda los valores de enteroglucagón se mostraron elevados es que, análogamente, la determinación de hormonas intestinales para los estados de enfermedad en potrillos recién nacidos puede tener relevante importancia (Ousey et al., 1995).

Lo manifestado precedentemente permite deducir que un aspecto interesante para abordar, respecto a las hormonas GI, es el referido al comportamiento de las mismas durante el desarrollo fetal en animales, dado que la mayoría de las situaciones aluden a períodos postpartos. Como ya se explicitó, en el período posnatal temprano de diferentes especies incluida el caballo, el individuo posee una dotación de hormonas gastrointestinales que regulan la actividad fisiológica del tracto gastrointestinal, por lo que es de esperar que, en el período prenatal, ocurra una situación similar ya que, la etapa crítica que representa el nacimiento debería requerir, previamente, de un marco morfofisiológico apropiado para llevar a cabo las funciones que el momento biológico exige.

Dada la falta de estudios relacionados con la presencia de hormonas GI durante el desarrollo fetal de caballos, es que hemos considerado oportuno comenzar este



estudio analizando, en una primera etapa, la expresión de gastrina y secretina. Esta elección se basa en que, dichas hormonas, juegan un rol fundamental en los procesos digestivos. Además, los estudios efectuados en otras especies, han revelado la presencia de estas hormonas en etapas tempranas del desarrollo, lo que hablaría a favor de una posible actividad durante las etapas prenatales.

Si se acepta que el caballo, como unidad productiva, provoca impactos rentables en lugares dedicados a su explotación, no deja entonces de ser conducente analizar distintos aspectos y situaciones que hacen al comportamiento de su desarrollo. En el caso que nos ocupa, interesa el comportamiento referente a hormonas gastrointestinales en distintas etapas del desarrollo fetal.



OBJETIVOS

OBJETIVOS

General

Determinar la presencia y distribución de las hormonas gastrointestinales gastrina y secretina a lo largo del desarrollo fetal del caballo mediante inmunohistoquímica.

Específicos

- Analizar en que momento se verifica la diferenciación de las células gastrointestinales que expresan gastrina y secretina.
- Analizar la distribución de gastrina y secretina en las distintas etapas del desarrollo fetal del caballo tratando de verificar si este patrón de distribución es coincidente con lo que se observa en ejemplares adultos.



MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Se fijó como criterio dividir al período de gestación en tres tercios, representando, cada uno de ellos, diferentes instancias o momentos del desarrollo fetal. Los tercios de gestación se identifican con la letra G y los números 1, 2 y 3. Cada uno de ellos abarca 111 días.

Para determinar la edad de los fetos se recurrió al método descrito por Bergin et al, 1968, CR: crown-rump (medida que se corresponde con los días de gestación), el cual se basa en medir la longitud existente entre la punta de la frente y punta del anca.

Los valores correspondientes a la relación CR-días de gestación fueron tabulados por Roberts, 1971 y se detallan en la tabla N° 1. Para la especie en cuestión, se considera estado fetal a partir de los 35 días de gestación. La media obtenida para ese período se corresponde con un valor de 1,75 cm de longitud, mientras que el valor más alto determinado fue de 125 cm de longitud que se traducen en 330 días de gestación.

En nuestro caso, la disponibilidad de muestras estuvo sujeta a las posibilidades que surgieron en el lugar de muestreo para los tercios de gestación propuestos. Se estima oportuno hacer notar que la heterogeneidad de los ejemplares que arribaron al frigorífico, por la diversidad de su procedencia, no permitió realizar un muestreo concentrado en un momento del año, ya que se trata de animales provenientes de lugares sin manejo reproductivo controlado.

En virtud de lo expuesto, se muestrearon un total de 18 fetos, que acorde a los valores de CR encontrados, se correspondieron con el siguiente detalle: 3 (tres) al período G1; 12 (doce) al período G2 y 3 (tres) al período G3.

Período	G 1	G 2	G 3
N° de Muestras	3	12	3

Las muestras de fetos de caballos de diferentes razas y edades fueron obtenidas en el frigorífico AIMAR SRL - Río Cuarto – Córdoba. El estado de preñez se determinó por palpación rectal y ecografía transrectal. Las hembras diagnosticadas y seleccionadas fueron identificadas con caravanas. Una vez efectuado el sacrificio de las mismas, se procedió a la extracción del útero de cada ejemplar. En las instalaciones del establecimiento se determinó la edad de los mismos a través de la medición de la longitud cráneo-caudal. Posteriormente, por laparatomía costal baja, se abordó la cavidad abdominal de los fetos a fin de proceder a la extracción del estómago, intestino delgado y grueso, los cuales se aislaron y limpiaron previamente, a los efectos de obtener muestras para luego someterlas al proceso de fijación con formol tamponado al 10% para la preservación morfológica (Fox, et al., 1985). Una vez trasladadas al laboratorio, y transcurridas 24-36 horas, las piezas se incluyeron en parafina a fin de efectuar, posteriormente, los cortes entre 5-6 micras con un micrótopo de cuchilla fija.

Para el presente trabajo se escogió el Método Inmunoquímico Indirecto denominado “**Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC)**” por su alto grado de sensibilidad (Vissio, 2000), ya que confiere una gran amplificación de la inmunomarca (Vissio, 2000). Este método se fundamenta en la gran afinidad que muestra la avidina por la biotina (Guesdon, 1979; Hsu et al., 1981), lo cual favorece la formación de complejos estables; y a esto se agrega la sencillez para lograr la unión entre dichos complejos y la peroxidasa (Vissio, 2000).

Esta técnica indirecta consiste en emplear un anticuerpo secundario marcado o conjugado con peroxidasa para detectar un anticuerpo primario o específico no conjugado que se une al antígeno (hormona). Esto permite que el anticuerpo secundario pueda ser utilizado con distintos anticuerpos primarios, o sea que con el empleo de un único anticuerpo secundario se puede detectar un número variable de antígenos, es decir, de hormonas.

La ejecución de la técnica elegida requirió someter las muestras a diversos pasos, que se resumen a continuación:

- Secado en estufa de 37 °C.
- Desparafinado con xilol.

- Hidratación con alcoholes de graduación decreciente.
- Lavado con solución buffer fosfato (PBS).
- Incubación con Blotto al 1%.
- Incubación del anticuerpo primario a 4 °C en cámara húmeda.
- Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Incubación con el anticuerpo terciario (Complejo ABC) a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Revelado con diaminobenzidina (DAB).
- Coloración de contraste con Hematoxilina.
- Montaje.
- Observación final al microscopio óptico.

Para la determinación de la gastrina, se empleó como anticuerpo primario, el N policlonal Novocastra, en una dilución 1:1000 y el kit ABC (avidina-biotina-peroxidasa) VECTASTIN Elite. Para el revelado se acudió al kit Vector DAB. Los productos fueron adquiridos a una empresa comercial privada. Para el caso de la hormona secretina se empleó el anticuerpo policlonal antisecretina de conejo (porcino).

La distribución de las células inmunoreactivas a gastrina y secretina se evaluaron, bajo microscopio óptico, en áreas determinadas de cada tejido. Las diferencias en la distribución de los componentes celulares en las diferentes áreas del tracto gastrointestinal, en las distintas etapas del desarrollo fetal, se compararon con los resultados de la bibliografía en cuanto a la expresión de estas hormonas en fetos de otras especies y en ejemplares adultos de algunas especies domésticas y salvajes. Se efectuó un registro gráfico fotográfico de las células inmunoreactivas, como así también de las estructuras histológicas sometidas a la técnica histológica convencional para disponer de un patrón de referencia de la arquitectura de los órganos de fetos de diferentes edades. El equipo fotográfico empleado consta de un microscopio marca Leitz sobre el que se montó una cámara fotográfica automática.



Expresión de Resultados

Los resultados obtenidos por medio del estudio inmunohistoquímico de los tejidos reaccionantes a las hormonas motivo del presente estudio, se expresaron en forma cualitativa, según la siguiente clasificación:

Reacción intensa: (+++)

Reacción moderada: (++)

Reacción débil: (+)

Reacción negativa: (-)

Con el objetivo de minimizar la subjetividad de las evaluaciones, tres investigadores participaron de las mismas, seleccionando, al azar, los preparados histológicos en cuestión.

CONTROLES

Control negativo:

Las muestras que se utilizan con este fin debe ser sometidas a un proceso igual al desconocido con la diferencia que aquéllas no debe contener el antígeno buscado (Boenisch, 2002).

Para el caso que nos ocupa, las preparaciones histológicas correspondientes al tracto gastrointestinal de fetos de caballo fueron tratadas con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en reemplazo de los anticuerpos correspondientes.

Control positivo:

Como en lo especificado para el control negativo, las muestras experimentan un proceso idéntico al desconocido, pero en este caso deben contener el antígeno buscado. (Boenisch, 2002).

Con relación a esta instancia se recurrió al tracto gastrointestinal del pejerrey (*Odonthestes bonariensis*).

Para la puesta a punto de la técnica de inmunohistoquímica, en ejemplares de la misma especie, se recurrió al empleo de muestras de caballos adultos.



RESULTADOS

RESULTADOS

Los valores hallados en las muestras de fetos de caballo en los diferentes períodos de gestación analizados (G1, G2, G3), se detallan en la tabla 1 conjuntamente con los valores determinados por Roberts, 1971.

En el Período G1, el feto más pequeño acusó una longitud de CR de 2,7 cm (rango 2,5-4,0 de Roberts), la cual se correspondió con una edad de gestación de 40 días. El valor mayor fue de 11,8 cm (rango 10-14 de Roberts) para 90 días de gestación.

En el Período G2, el valor menor de CR fue de 18 cm (rango 15-25 de Roberts); y el valor mayor fue de 70 cm (rango 55-70 de Roberts). La edad de gestación se correspondió con 120 y 210 días respectivamente.

En el Período G3, el valor menor de CR fue de 66 cm (rango 60-80 de Roberts) y el mayor fue de 93 cm (rango 70-130 de Roberts). Para dichos valores la edad de gestación se correspondió con 240 y 300 días respectivamente.

En la **tabla 1** se consignan y correlacionan los valores de rango y los valores medios o promedios de CR con los días de gestación, según los resultados obtenidos por Roberts. Conjuntamente, y aplicando el mismo criterio, se consignan los valores de los fetos de caballos muestreados para el presente trabajo a los efectos de realizar una correlación entre ambas mediciones.

De los resultados de Roberts, con respecto a la relación longitud media CR -días de gestación, se desprende que el valor medio más bajo obtenido es de 1,75 cm de longitud para 35 días de gestación; mientras que el valor más alto es de 125 cm de longitud que se traducen en 330 días de gestación.

Si a los valores de Roberts se los encasillasen en tercios de gestación, se podría deducir que, para el Período G1, el valor promedio menor de CR (rango 1,5-2) es de 1,75 cm, correspondiéndole una edad de gestación de 35 días; mientras que el valor promedio mayor (rango 10-14), para el mismo Período, es de 12 cm y se corresponde con 90 días de gestación.

Tabla 1. Valores de crown-round. Correlación entre medidas-días de gestación: Períodos de gestación establecidos para el presente estudio.

VALORES SEGÚN ROBERTS				PERÍODOS	VALORES PROPIOS		VALORES SEGÚN ROBERTS	
X Medidas C - R (cm)	Medidas C - R (cm)	Días de Gestación	Peso Corporal		Feto Nº	Medidas C - R (cm)	Medidas C - R (cm)	Días de Gestación
0,32	0,32	16	-	G 1	11	2,7	2,5 - 4,0	40
0,66	0,66	20	-		12	4,9	3,0 - 6,0	50
0,72	0,6 - 0,85	25	-		19	11,8	10 - 14	90
0,95	0,9 - 1,0	30	0,2		1	41,0	35 - 60	180
1,75	1,5 - 2,0	35	0,8		2	41,0	35 - 60	180
3,25	2,5 - 4,0	40	1,8		3	62,0	55 - 70	210
3,55	2,6 - 4,5	45	3,0 - 4,0		4	43,0	35 - 60	180
4,50	3,0 - 6,0	50	5,5 - 6,5		5	62,0	55 - 70	210
5,75	4,0 - 7,5	60	10 - 20		7	18,0	15 - 25	120
12,0	10 - 14	90	100 - 180		9	48,0	35 - 60	180
20,0	15 - 25	120	700 - 1000	G 2	10	58,0	35 - 60	180
31,0	25 - 37	150	1,5 - 3,0		13	70,0	55 - 70	210
47,5	35 - 60	180	3,0 - 5,0		15	25,4	15 - 25	120
62,5	55 - 70	210	7,0 - 10,0		16	23,8	15 - 25	120
70,0	60 - 80	240	12,0 - 18,0		18	19,0	15 - 25	120
85,0	80 - 90	270	20,0 - 27,0	G 3	8	66,0	60 - 80	240
100,0	70 - 130	300	25,0 - 40,0		14	72,0	60 - 80	240
125,0	100 - 150	330	30,0 - 50,0		17	93,0	70 - 130	300

G 1	G 2	G 3
0 - 111 días: Feto Nº 11, 12, 19 Feto de menor tamaño: 2,7 cm (C - R) Feto de mayor tamaño: 11,8 cm (C - R)	112 - 222 días: Feto Nº: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 13, 15, 16, 18 Feto de menor tamaño: 18 cm (C - R) Feto de mayor tamaño: 70 cm (C - R)	223 - 330 días: Feto Nº: 8, 14, 17 Feto de menor tamaño: 66 cm (C - R) Feto de mayor tamaño: 93 cm (C - R)

Para el Período G2, en la tabla de Roberts el valor promedio menor (rango 15-25) es de 20 cm correspondiéndose con 120 días de gestación; mientras que el valor promedio mayor es de 62,5 cm (rango 55-70) de CR para 210 días de gestación.

En el Período G3, el valor promedio menor de CR de la tabla de Roberts es de 70 cm (rango 60-80) para una edad de gestación de 240 días. El valor promedio mayor de 125 cm (rango 100-150) de CR se correlaciona con una edad de 330 días.

A fin de brindar una información complementaria desde la arquitectura histológica, es que a continuación se describen algunos aspectos morfológicos de órganos del tracto gastrointestinal correspondiente a fetos de diferentes edades.

FETO PERTENECIENTE AL TERCER TERCIO DE GESTACIÓN (35 semanas).

ESTÓMAGO

Túnica Mucosa

Tinción con H/E:

A nivel de la región fúndica la mucosa presenta pliegues (áreas gástricas) y la superficie se encuentra revestida por un epitelio cilíndrico simple, intensamente acidófilo y profusamente granuloso. Se visualizan criptas o fosetas cortadas transversalmente acompañadas de esbozos glandulares, es decir, no se determina la presencia de glándulas fúndicas desarrolladas. Los restantes componentes de esta túnica, es decir corion y muscular de la mucosa toman una disposición similar a la que presenta el individuo adulto. En la región pilórica la arquitectura histológica se corresponde de manera similar con la de la región fúndica; mientras que en la región cardial, la mucosa presenta un epitelio plano estratificado que se correspondería con la zona aglandular de esta región.

Tinción con PAS:

A nivel del tejido epitelial se evidencia una reacción marcadamente positiva en concordancia con lo observado en el adulto. Las células muestran un epitelio mucoso que se tiñe más marcadamente en el tercio superior de la superficie celular.

Tinción con Alcian Blue ph 0,5 y 2,5:

A la observación, las muestras tratadas con el colorante a pH 0,5, presentan una marcación negativa.

Con pH 2,5, una ligera reacción se detecta a nivel de la superficie apical de las células. No obstante, y considerando lo expuesto como una reacción negativa, estaría en consonancia con lo hallado en los adultos, es decir, la presencia de glicoconjugados neutros.

Túnica Submucosa

Conserva características histológicas similares a las descritas en el individuo adulto.

Túnica Muscular

Esta túnica permite diferenciar dos capas de músculo liso, a saber: circular interna y longitudinal externa, presentando un mayor desarrollo aquella que adquiere ubicación interna. No se diferenció la capa oblicua.

Túnica Serosa

Respeto el patrón estructural que involucra al mesotelio y tejido conectivo.

DUODENO**Túnica Mucosa*****Tinción con H/E:***

No se observan plicas o pliegues intestinales como en el animal adulto. Las vellosidades se encuentran revestidas por un epitelio cilíndrico simple, núcleo redondo y ubicación central, es decir no desplazado hacia la base celular como se observa en los adultos. Entre estas células se intercalan las células caliciformes. Están presentes

las glándulas intestinales, inmersas en un corion de tejido conectivo laxo. La muscular de la mucosa adopta una disposición circular.

Tinción con PAS:

Las células caliciformes, de gran tamaño y aspecto granular conjuntamente con la diferenciación apical de las células epiteliales muestran una reacción positiva frente a esta tinción.

Tinción con Alcian Blue ph 0,5 y 2,5:

Con el colorante a pH 0,5 se detecta una tinción suave o leve de las células caliciformes, microvellosidades y glándulas submucosas o de Brunner.

A pH 2,5 la manifestación tintorial, para las estructuras mencionadas, es más intensa lo cual indica la leve acidez que presentan los glicoconjugados.

Túnica Submucosa

Se diferencia un tejido conectivo vascularizado en el cual se disponen las glándulas submucosas. Las mismas dejan ver, en los cortes transversales, una luz redondeada amplia y definida. La variación cualitativa y cuantitativa de estas glándulas depende de las especies incluido el humano (Marcondes Macéa et al., 2006).

Túnica Muscular

Dos capas de músculo liso, una con disposición circular interna y la otra longitudinal externa, reflejan la imagen observada en los adultos,

Túnica Serosa

No presentan características particulares o diferenciales con relación a las del individuo adulto.

YEYUNO

Túnica Mucosa

Tinción con H/E:

Las vellosidades, de marcada longitud, muestran un revestimiento epitelial no uniforme ya que escasas células redondeadas, núcleo central y citoplasma blanco (sin teñir), alternan con otras cúbicas. Entre estas células, asoman otras de gran tamaño, con cierto matiz lila, similares a las caliciformes. Se distinguen claramente las glándulas intestinales inmersas en un corion de tejido conectivo laxo. No menos manifestación expresa la capa muscular de la mucosa.

Tinción con PAS:

El epitelio muestra células caliciformes que dan reacción positiva, al igual que la diferenciación apical de los enterocitos. Esta imagen se refleja en algunas glándulas intestinales ubicadas en el corion.

Tinción con Alcian Blue ph 0,5 y 2,5:

Con el colorante a pH 0,5 se detecta, en general, una tinción muy suave o leve de las células caliciformes y microvellosidades ya que unas pocas muestran una intensidad mayor.

A pH 2,5 la reacción tintorial es francamente positiva con respecto a la tinción a pH 0,5.

Túnica Submucosa

Se diferencia un tejido conectivo vascularizado que revela la presencia del plexo nervioso (submucoso o de Meissner). A diferencia de lo observado en los individuos adultos, en esta túnica no se hallan presentes acinos glandulares.

Túnica Muscular

Conserva las mismas características que las descritas en el duodeno.

Túnica Serosa

No presenta particularidad alguna en su arquitectura histológica con relación al individuo adulto.

CIEGO

Túnica Mucosa

Tinción con H/E:

La luz presenta un aspecto plegado, y el revestimiento intestinal se observa de tipo cilíndrico simple con células caliciformes. En la lámina propia se visualizan cortes transversales y longitudinales de las glándulas o criptas intestinales; como así también la muscular de la mucosa que completa la túnica en cuestión.

Tinción con PAS:

El epitelio muestra células caliciformes de gran tamaño que dan reacción positiva frente a esta tinción al igual que la diferenciación de membrana apical de los enterocitos.

Tinción con Alcian Blue ph 0,5 y 2,5:

Con el colorante a pH 0,5 se detecta, en general, una tinción suave o leve de las células caliciformes y microvellosidades. Unas pocas muestran una intensidad mayor. A pH 2,5 la manifestación tintorial es francamente positiva con respecto a la tinción a pH 0,5.

Túnica Submucosa

Se diferencia un tejido conectivo vascularizado y la presencia del plexo nervioso (submucoso o de Meissner).

Túnica Muscular

Presenta la doble disposición circular interna y longitudinal externa, con más desarrollo en la primera de las mencionadas pero que, conjuntamente, le imprimen un espesor considerable a la túnica.

Túnica Serosa

No presenta particularidad alguna con respecto al individuo adulto.

FETO PERTENECIENTE AL SEGUNDO TERCIO DE GESTACIÓN (22 semanas)

ESTÓMAGO

Túnica Mucosa

Tinción con H/E:

La misma presenta pliegues que sobresalen (áreas gástricas). El epitelio de revestimiento es de tipo cilíndrico simple, con núcleos redondeados y de ubicación basal, y un citoplasma con aspecto granular y de tinte acidófilo el cual se manifiesta mayormente visible en la zona apical del mismo. Entre dichas células alternan algunas de aspecto globoso que recuerdan a las células caliciformes. Se delinea claramente el perfil glandular ante la presencia de esbozos glandulares sin tipos celulares definidos o precisos, que contactan con las fosetas gástricas.

Una banda muscular lisa, de considerable grosor, hacia donde se proyectan o extienden los esbozos glandulares, se anuncia como la muscular de la mucosa.

Tinción con PAS:

En la porción apical de las células epiteliales se presenta un acúmulo de mucus que muestra una reacción positiva frente a la tinción. En las células globosas se observa la misma reacción en un citoplasma finamente granular, semejante al de las células epiteliales.

En los esbozos glandulares descritos precedentemente, puede observarse la misma reacción apical.

Tinción con Alcian Blue:

El epitelio manifiesta reacción negativa frente a esta tinción. En cambio, las células globosas, reaccionan positivamente.

Túnica Submucosa

Se diferencia un tejido conectivo laxo en proximidad de la mucosa que, en cercanía de la túnica muscular, adquiere las características de tejido conectivo denso acompañado de una evidente vascularización.

Túnica Muscular

El tejido muscular adopta una disposición circular interna y longitudinal externa, hallándose la primera más desarrollada que la segunda.

Túnica Serosa

Un mesotelio y tejido conectivo laxo, que alberga una marcada vascularización e inervación, coincide con aquella observada en el individuo adulto.

DUODENO**Túnica Mucosa*****Tinción con H/E:***

Las vellosidades, de moderada longitud, poseen un revestimiento epitelial cúbico alto, con núcleos redondeados, cromatina laxa y ubicación centro-apical. El citoplasma, fuertemente acidófilo y con aspecto granular a nivel del ápice celular, conserva la misma expresión cualitativa tanto en los fetos más pequeños como en los de mayor edad para el tercio de gestación en cuestión.

En la lámina propia se encuentran glándulas intestinales con escaso desarrollo; mientras que la muscular de la mucosa exhibe escasas células a la observación.

Tinción con PAS:

Una reacción positiva se observa a nivel de las células caliciformes del epitelio.



Tinción con Alcian Blue:

El mucus presente en las estructuras epiteliales de revestimiento y glandular reacciona de manera positiva frente a esta coloración.

Túnica Submucosa

Se distingue la presencia de una gran cantidad de acinos mucosos PAS positivos, y los plexos nerviosos se muestran en forma evidente.

Túnica Muscular

Dos capas de músculo liso, una de disposición circular interna y otra longitudinal externa, componen la presente túnica.

Túnica Serosa

No muestra mayores variaciones con relación a las del individuo adulto.

YEYUNO

Túnica Mucosa

Tinción con H/E:

Las vellosidades, muy desarrolladas, denotan la presencia de un epitelio que transita de tipo cúbico simple a cilíndrico simple. El citoplasma celular acusa una disminución de su acidofilia y los núcleos tienden a tomar una ubicación basal. Las células caliciformes conservan las características de aquellas descritas en el duodeno.

En el corion, de tejido conectivo laxo, se visualiza la incipiente aparición de glándulas intestinales. Una delgada lámina de tejido muscular liso completa la arquitectura de esta túnica.

Tinción con PAS:

Las células caliciformes, como asimismo la chapa estriada, son las estructuras que muestran una imagen positiva frente a esta tinción.

Tinción con Alcian Blue ph 0,5 y 2,5:

A pH 2,5 la manifestación tintorial es francamente positiva frente a las células caliciformes del epitelio de revestimiento y glandular como así también en el relieve apical de los enterocitos.

Túnica Submucosa

Esta túnica exhibe como claro componente un tejido conectivo denso con evidente vascularización.

Túnica muscular

Las capas circular interna y longitudinal externa de músculo liso de esta túnica, reflejan una disposición coincidente con la que presentan los individuos adultos.

Túnica Serosa

No muestra variación histológica alguna con relación a las características que habitualmente exhibe esta túnica en los individuos adultos.

CIEGO

Los componentes histológicos, a excepción de las vellosidades que en este órgano no se encuentran presentes, son similares a las del yeyuno.

FETO PERTENECIENTE AL PRIMER TERCIO DE GESTACIÓN**(7 semanas)****ESTÓMAGO****Túnica Mucosa*****Tinción con H/E:***

La mucosa se encuentra revestida por un epitelio cilíndrico simple pseudoestratificado que a medida que ocurre el desarrollo comienza a adquirir las características de cilíndrico simple. A diferencia de lo que ocurre en los fetos de mayor edad, en este

estadío de la gestación, en los fetos no se distinguen criptas o fosetas cortadas transversalmente acompañadas de esbozos glandulares. La ausencia de la capa muscular de la mucosa provoca la conjugación del corion con la submucosa lo cual se traduce, a este nivel, como corion-submucoso que no muestra evidencias de estructura glandular alguna.

Tinción con PAS:

A nivel del tejido epitelial se manifiesta una intensa reacción positiva que prácticamente, en algunas preparaciones histológicas, a veces, no permite la observación de una morfología celular clara o definida. Lo expuesto no debe asociarse con una imagen diferente a la del adulto en el sentido de que en éste, la reacción tintorial, no guarda diferencia con la del feto. Más bien podría denotar la característica que posee el epitelio superficial del estómago cual es la presencia de un precursor mucoso que ocupa la región apical de las células.

Por debajo del epitelio se encuentran unas células dispuestas de manera grupal, y otras en forma individual, que se asemejan a las células parietales habida cuenta que en ellas se distinguen núcleos redondeados, grandes y de ubicación central y un citoplasma, que si bien es escaso, denuncia una fuerte acidofilia. La muscular de la mucosa se manifiesta entrelazada con el tejido conectivo de la lámina propia.

Tinción con Alcian Blue ph 0,5 y 2,5:

A la observación, las muestras tratadas con el colorante a pH 0,5, presentan una reacción negativa.

Con pH 2,5, se detecta reacción a nivel de la superficie apical de las células.

Túnica Muscular

La túnica muscular permite diferenciar una sola capa de células musculares lisas con disposición circular, lo cual marca una diferencia con lo hallado en los fetos de mayor edad.

Túnica Serosa

Esta túnica no revela característica particular alguna.

Túnica Muscular

Se presenta una doble capa de músculo liso no muy desarrollada.

Túnica Serosa

Se visualiza como una delgada membrana.

YEYUNO

Túnica Mucosa

Tinción con H/E:

Las vellosidades, de marcada longitud, muestran un revestimiento epitelial no uniforme ya que escasas células redondeadas, con núcleo central y citoplasma blanco (sin teñir), alternan con otras cúbicas. Entre estas células, asoman otras, de gran tamaño y tinte lila, similares a las caliciformes, pero que en el feto muestran el color aludido y no blanco como ocurre en los adultos. Se distinguen claramente las glándulas intestinales inmersas en un corion de tejido conectivo laxo. No menos notoriedad expresa la capa muscular de la mucosa.

Tinción con PAS:

El epitelio muestra células caliciformes de gran tamaño, que dan reacción positiva al igual que la diferenciación apical de los enterocitos. Esta imagen se refleja en algunas glándulas intestinales ubicadas en el corion.

Tinción con Alcian Blue ph 0,5 y 2,5:

Con el colorante a pH 0,5 se detecta, en general, una tinción suave o leve de las células caliciformes y microvellosidades, ya que unas pocas muestran una intensidad mayor.

A pH 2,5 la reacción tintorial es francamente positiva con respecto a la de pH 0,5.

Túnica Submucosa

Se diferencia un tejido conectivo vascularizado y la presencia del plexo nervioso (submucoso o de Meissner).

Túnica Muscular

No guardan diferencias con respecto a lo descrito en el duodeno.

Túnica Serosa

Se presenta como una túnica de delgado espesor.

CIEGO

Túnica Mucosa

Tinción con H/E:

En fetos de menor edad, sobre la superficie luminal, no se diferencian mayormente los pliegues que ofrece esta región del tracto digestivo; no ocurriendo lo mismo con los ejemplares de mayor edad dentro del período G1. El epitelio responde a las características de pseudoestratificado, cuyo perfil es menos evidente en los fetos de menor edad., observándose, para los distintos ejemplares etarios una cantidad manifiesta de células caliciformes dispuestas unas al lado de las otras. Las glándulas intestinales no se encuentran presentes; al igual que la muscular de la mucosa.

Tinción con PAS:

Se observa una reacción positiva que se muestra notaria en el área apical de las células epiteliales, mientras que las células caliciformes no evidencian, comparativamente, diferencia alguna de coloración con respecto a la que muestra el animal adulto.

Tinción con Alcian Blue ph 0,5 y 2,5:

Con el colorante a pH 0,5 se detecta, en general, una tinción suave o leve de las células caliciformes y microvellosidades.

A pH 2,5, se observa una marcada reacción positiva en las células caliciformes, aunque en las microvellosidades, dicha marcación es escasa a lo largo del borde apical de los enterocitos.

Túnica Submucosa

El corion-submucoso, de tejido conectivo laxo, acusa una mayor vascularización en proximidad de la túnica muscular.

Túnica Muscular

Esta túnica presenta la doble disposición que adquiere el músculo liso según lo descrito en los órganos precedentes.

Túnica Serosa

Se presenta con un delgado espesor.

HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS EN LOS DIFERENTES PERÍODOS DE LA GESTACIÓN

GASTRINA

Primer Período - G 1 - (Primer Tercio de la gestación)

En corte transversal seriado de fetos de aproximadamente 50 días de gestación (etapa temprana del desarrollo), se detectó la presencia de células positivas a gastrina en estómago y asas intestinales, tanto a nivel del tejido epitelial como del tejido conectivo subyacente. Las células, intercaladas entre las del tejido epitelial, mostraron formas variadas. Es así que unas se presentaron piramidales (fig.1); otras alargadas (fig.2) y otras redondeadas (fig.3).

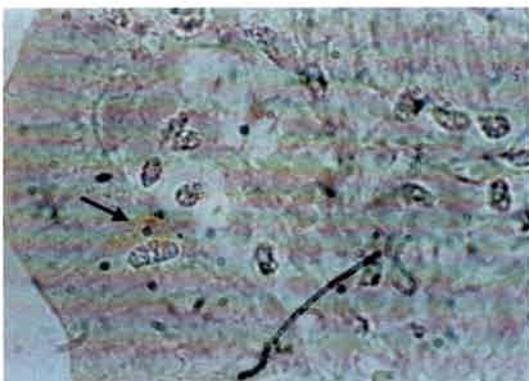


Fig.1. Feto de 50 días de gestación. Estómago. Célula positiva a gastrina (++), localizada entre las células epiteliales (→), de forma piramidal y de tipo abierta. El citoplasma se extiende hasta la superficie celular. 100x.

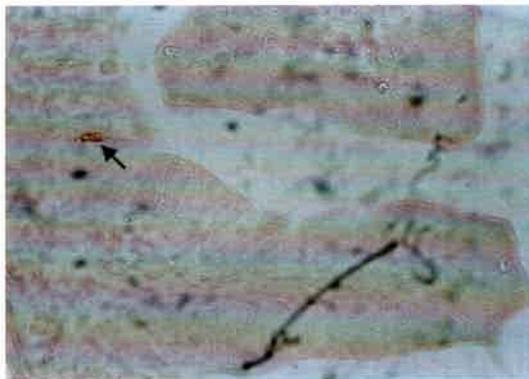


Fig.2. Feto de 50 días de gestación. Asas intestinales. Célula positiva a gastrina (++) ubicada en el epitelio de revestimiento (→). El núcleo y la célula presentan forma alargada. 100x.

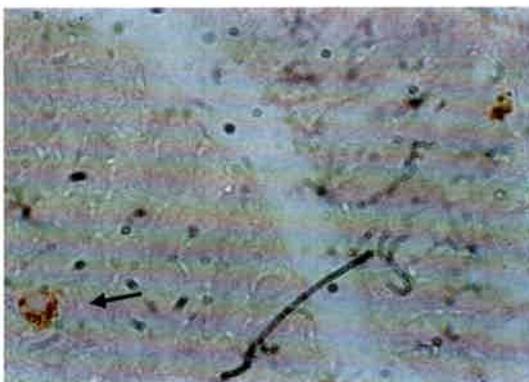


Fig. 3. Feto de 50 días de gestación. Asas intestinales. Célula positiva a gastrina ubicada entre el epitelio y tejido conectivo (→), con gránulos evidentes (+++) distribuidos en forma semilunar. El núcleo, redondo, se muestra poco teñido. 100x

En las células de formas redondeadas y piramidales, los núcleos se presentaron redondos y alargados respectivamente ubicándose, los primeros en la porción central de la célula, y los segundos en la parte basal de la misma. Respecto a aquellas que mostraron una forma celular alargada, el núcleo adoptó igual morfología, que la célula, extendiéndose a lo largo de la superficie citoplasmática (fig.2).

Los gránulos no mostraron un aspecto uniforme y no ocuparon o se concentraron en un lugar determinado de la célula sino que exhibieron una distribución homogénea sobre la superficie celular (fig.1 y 3).

Particularmente las células piramidales fueron las que respondieron a las de tipo abierto al extenderse hacia la superficie luminal (fig.1).

En el tejido conectivo subyacente al epitelio, se pudo determinar en las asas intestinales la presencia de células positivas a gastrina (fig.4).

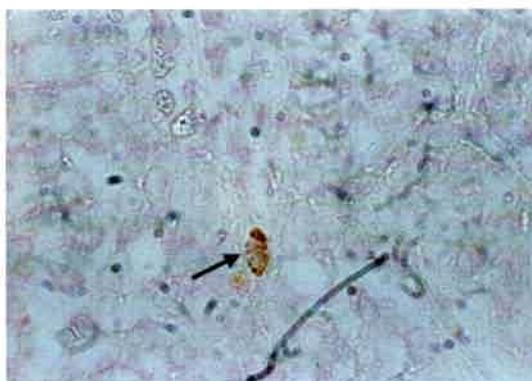


Fig. 4. Feto de 50 días de gestación. Asas intestinales. Célula positiva a gastrina localizada en el tejido conectivo (→). Presenta forma ovoidea y gránulos con tinción de intensidad variable (+++). 100x.

Segundo Período - G 2 - (Segundo Tercio de la gestación)

En fetos de 120 días de edad se observaron células positivas que adoptaron diferentes localizaciones.

Estómago

Es así que las halladas en menor número se localizaron en las criptas gástricas llegando a extenderse hacia el fondo de las mismas (fig.5); mientras que otras se

mostraron entre las células epiteliales superficiales (fig.6). La forma celular varió de redonda a piramidal.

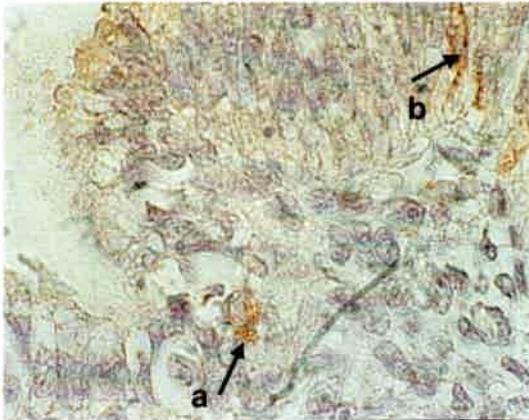


Fig. 5. Feto de 120 días de gestación. Estómago. Esbozo de una glándula gástrica que muestra una célula positiva (a→) redonda de tipo cerrado, con gránulos marcados (+++). En el ángulo superior derecho (b →) se observa una célula positiva, alargada y gránulos densos u oscuros, con núcleo alargado de cromatina laxa. 100x.

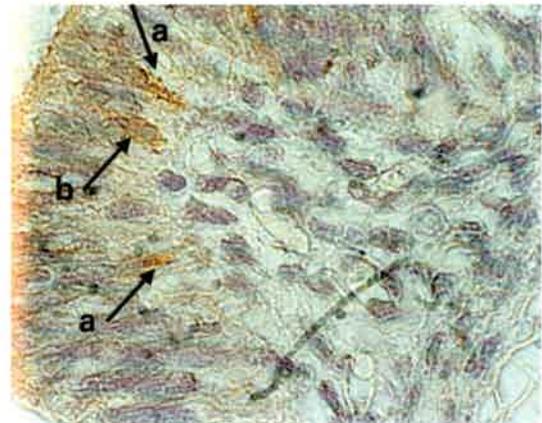


Fig. 6. Feto de 120 días de gestación. Estómago. Epitelio gástrico. Se observan tres células positivas (+++) a gastrina. Dos de ellas presentan gránulos basales (a→), mientras que la otra célula (b →) muestra un núcleo basal y prolongaciones citoplasmáticas que le confiere la característica de tipo abierto. 100x

Con relación a los gránulos, la distribución y aspecto de los mismos permitió apreciar cierta variabilidad. En algunas células la distribución fue dispersa; en otras se dispusieron alrededor del núcleo a manera de corona (fig.7); otras permitieron apreciar una distribución que abarcó toda la superficie citoplasmática en forma uniforme (fig. 8) y finalmente, en otras, los gránulos se localizaron mayormente en la base celular (fig.9).

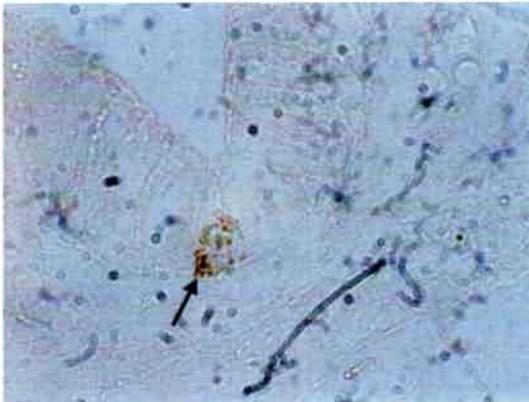


Fig. 7. Feto de 120 días de gestación. Estómago. A mayor aumento se observan gránulos (+++) "coronando" al núcleo. (→).100x.



Fig. 8. Feto de 120 días de gestación. Estómago. Epitelio de revestimiento. Obsérvese una célula piramidal, de tipo abierto (→), núcleo alargado. Los gránulos citoplasmáticos, de diferentes tamaño e intensidad de coloración (+++), se distribuyen en toda la superficie celular. 100x.

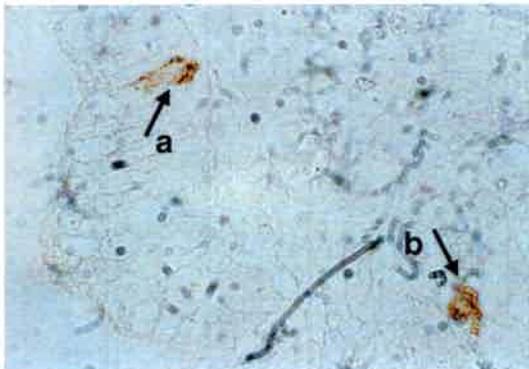


Fig. 9. Feto de 120 días de gestación. Estómago. En el epitelio se observa una célula piramidal de tipo cerrado con localización basal (a→); y otra célula, redonda (b→), localizada en la región apical del revestimiento epitelial. Ambas teñidas intensamente (+++). 100x.

Respecto al aspecto que presentaron los gránulos, en una misma célula algunos de ellos manifestaron un aspecto grueso e intensamente teñido (Fig.10); mientras que otros lo fueron más finos y débilmente teñidos (fig.7). En otros casos, dichos gránulos no evidenciaron diferencia alguna entre sí, es decir mostraron una apariencia homogénea.

En algunas células la presencia de gránulos fue escasa.

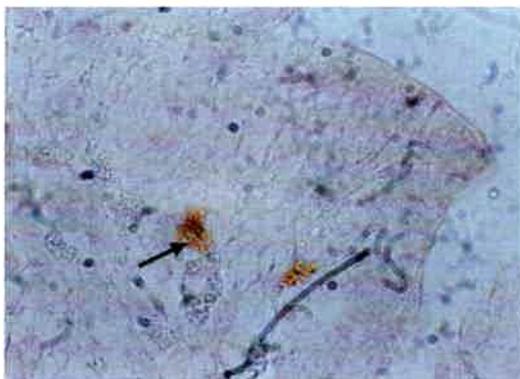


Fig. 10. Feto de 120 días de gestación. Estómago. Célula positiva (→) que muestra gránulos de aspecto grueso (+++). 100x.

Con referencia al tipo celular, si bien se determinó la presencia de las de tipo abierto (fig.8), la expresión dominante correspondió a las de tipo cerrado (fig.7).

Para este mismo período, los fetos de mayor edad (aproximadamente 210 días), no mostraron particularidad relevante con relación a las características celulares (localización y forma de las células; distribución y aspectos de los gránulos) descritas precedentemente en los fetos de menor edad.

Duodeno

En fetos de 210 días de edad, se observaron células con reacción positiva frente a los anticuerpos antigástrica. Las mismas se ubicaron entre los enterocitos y en las glándulas intestinales.

Asimismo, la presencia de dichas células se extendió hacia la submucosa ya que en ella, y entre los acinos glandulares, las mismas pudieron ser observadas (fig.11). Por otro lado, también se observó marcación positiva en células ubicadas en los acinos de las glándulas de Brunner (fig.12).

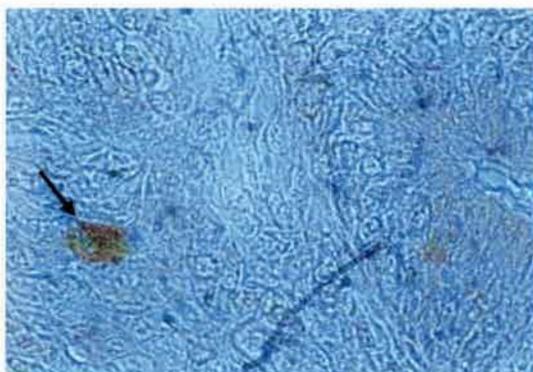


Fig. 11. Feto de 210 días de gestación. Duodeno. Célula positiva (→) localizada en el tejido conectivo que muestra una forma redonda y núcleo ligeramente desplazado. La inmunomarca es evidente (+++). Hacia la derecha de la microfotografía se observa una glándula intestinal en corte transversal. 100x.

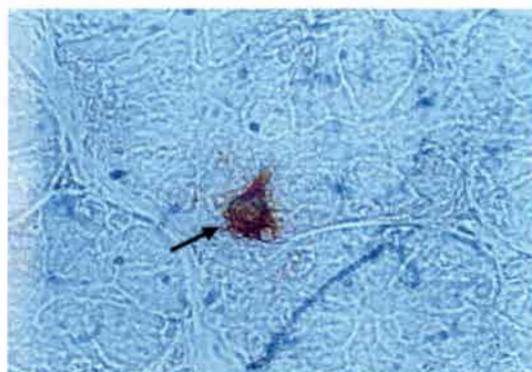


Fig. 12. Feto de 210 días de gestación. Duodeno. Célula positiva (→) localizada en un acino de la glándula de Brunner. Obsérvese la forma piramidal, núcleo central e intensa marcación (+++). Los gránulos se disponen en la periferia celular. 100x.

Yeyuno-Ileon

Las marcaciones de gastrina, en fetos de 120 y 180 días de edad resultaron negativas en este segmento del intestino delgado.

Intestino Grueso

A este nivel del tubo digestivo fue posible determinar la presencia de células positivas a gastrina. Las mismas se identificaron en distintos tejidos. En las figuras 13 y 14, se puede observar la presencia de dichas células.



Fig. 13. Feto de 210 días de gestación. Intestino grueso. Próximo a la zona basal del epitelio, se observa una célula positiva (+++) con núcleo escotado (a→). Contrapuesta a ésta, se diferencia una célula caliciforme de gran tamaño (b →). 100x.

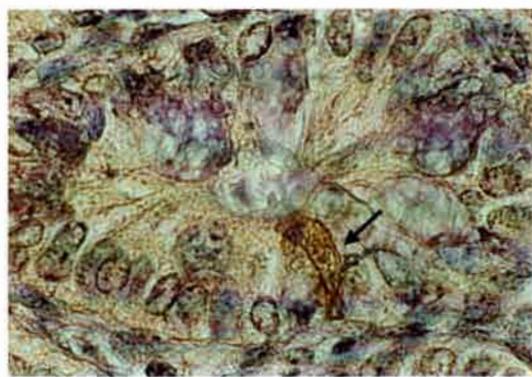


Fig. 14. Feto de 210 días de gestación. Intestino grueso. Corte transversal de una glándula intestinal. Célula positiva de tipo abierto (→), con intensa marcación (+++). El núcleo se encuentra desplazado hacia la luz glandular. 100x.

En la figura 15 se observan una célula positiva localizada en el tejido conectivo del corion, con citoplasma de apariencia homogénea.

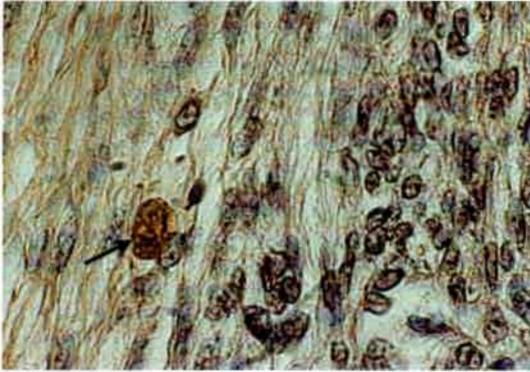


Fig. 15 Feto de 210 días de gestación. Intestino grueso. Célula positiva, localizada en el tejido conectivo (→) que muestra una tinción homogénea (+++) El núcleo se encuentra desplazado. 100x.

Tercer Período - G 3 - (Tercer Tercio de la gestación)

En este período las células positivas a gastrina no mostraron particularidad relevante con relación a la expresión observada en aquellas del período anterior.

SECRETINA

Primer Período - G 1 - (Primer Tercio de la gestación)

En cortes seriados de fetos de aproximadamente 50 días de edad, se hallaron células con marcas positivas en las asas intestinales, algunas de las cuales mostraron incipientes vellosidades luminales (fig.16).

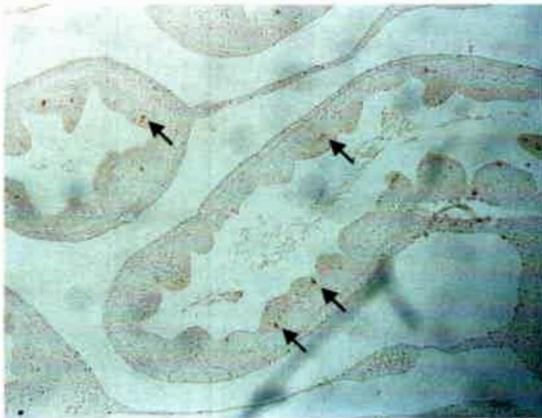


Fig. 16. Feto de 50 días de gestación. Asas intestinales. Corte transversal. Se observan varias células positivas (→) a secretina. 6.3x.

Las células fueron observadas entre las correspondientes a aquellas del epitelio de revestimiento (fig.17).

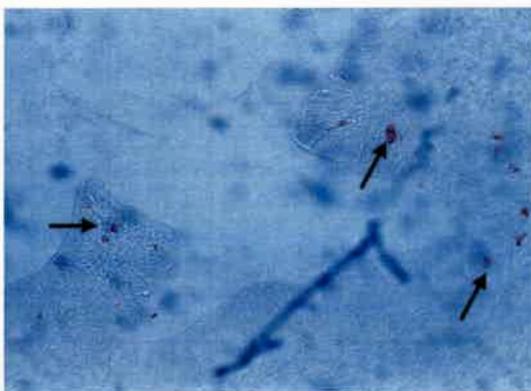


Fig. 17. Feto de 50 días de gestación. Asas intestinales. Corte transversal. A nivel del revestimiento epitelial de las vellosidades se distinguen células positivas a secretina (→) que muestran diferentes tamaños e intensidad de marcación. 16x.

Algunas de dichas células presentaron forma alargada, núcleo apical y gránulos dispuestos en la parte basal (fig.18); mientras que otras presentaron forma redonda (fig.19). Las células precedentes se enmarcaron dentro de las de tipo cerrado.

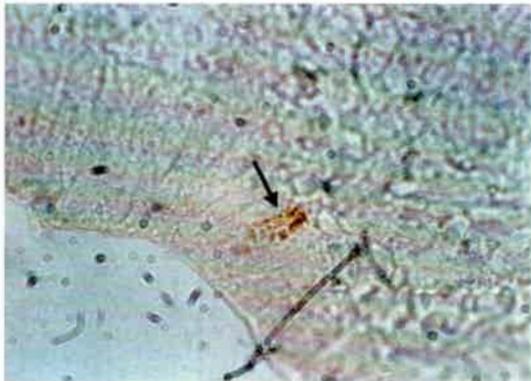


Fig. 18. Feto de 50 días de gestación. Asas intestinales. Célula positiva (→) a secretina que muestra un núcleo alargado con gránulos citoplasmáticos basales de reacción moderada (++). 100x.

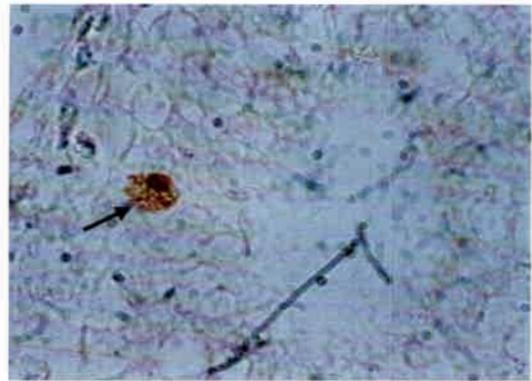


Fig. 19. Feto de 50 días de gestación. Asas intestinales. Célula positiva a secretina, de tipo cerrado (→), que muestra forma redonda, núcleo desplazado y granulaciones homogéneas evidentes (+++). 100x.

En las asas intestinales, con contorno más regular de la superficie luminal debido al poco desarrollo de las vellosidades, se localizaron entre las células del epitelio varias células con reacción positiva a secretina. La forma ovalada fue predominante entre las células positivas.

Con relación a la intensidad en la marca, en unas fue más intensa que en otras, y los gránulos, en algunas de las células, se mostraron más intensamente teñidos unos que otros. Asimismo, unas células, frente a la marcación, mostraron un citoplasma de aspecto homogéneo (fig.19). Si bien la mayoría de las mismas respondieron a las de tipo cerrado, pudieron observarse algunas de tipo abierto (fig.20).

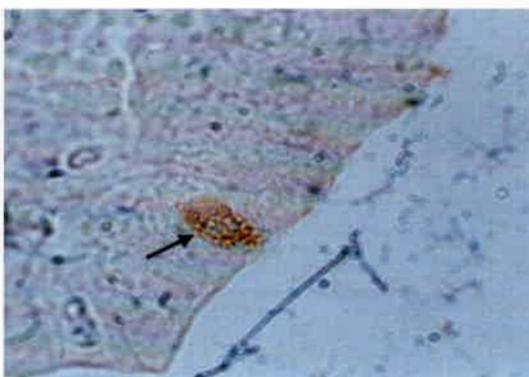


Fig. 20. Feto de 50 días de gestación. Asas intestinales. A mayor aumento se observa una célula positiva, de tipo abierto (→), con evidentes gránulos citoplasmáticos intensamente teñidos (+++). 100x.

En el tejido conectivo subyacente al epitelio de las asas intestinales pudo determinarse la presencia de células positivas de pequeño tamaño. Las mismas mostraron una reducida área citoplasmática en la que se hallaron inmersos gránulos intensamente teñidos (fig. 21).

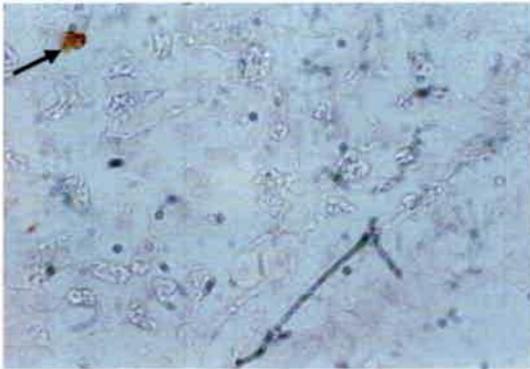


Fig. 21. Feto de 50 días de gestación. Asas intestinales. En el tejido conectivo se observa una célula (→) con intensa reacción (+++). En el ángulo inferior derecho de la figura se visualiza el tejido epitelial. 100x.

Segundo Período - G 2 - (Segundo Tercio de la gestación)

Duodeno

En fetos de aproximadamente 180 días de edad, se determinó la presencia de células positivas localizadas entre las correspondientes al revestimiento epitelial como así también en el corion. Las mismas evidenciaron marcación intensa. (fig.22).mostrando diferentes formas y tamaños. Es así que algunas revelaron un perfil piramidal con núcleo desplazado; mientras que otras se observaron redondas y resultaron ser las más pequeñas (fig.22).

Dentro del mismo período, pero en fetos de mayor edad (210 días), las células positivas también se visualizaron a nivel de la desembocadura de las glándulas intestinales, identificándose células redondeadas (fig.23). La mayoría de las células se correspondieron con las de tipo cerrado, inclusive aquellas halladas a nivel de la desembocadura de las glándulas intestinales. (fig.23); mientras que otras se observaron de mayor tamaño, con perfil piriforme y base orientada hacia la luz (fig.24).

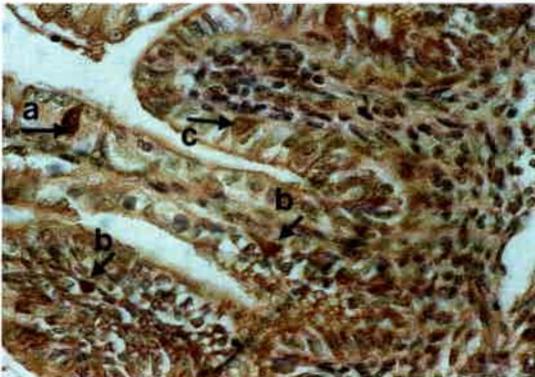


Fig. 22. Feto de 180 días de gestación. Duodeno. En el ángulo superior izquierdo, en una vellosidad en corte longitudinal, se observa en el epitelio (a→) y en el corion (b →) células positivas. En otras vellosidades, una célula se localiza en el corion (b →) y otra en el epitelio glandular(c→) Las células mencionadas muestran marcación intensa (+++). 40x.

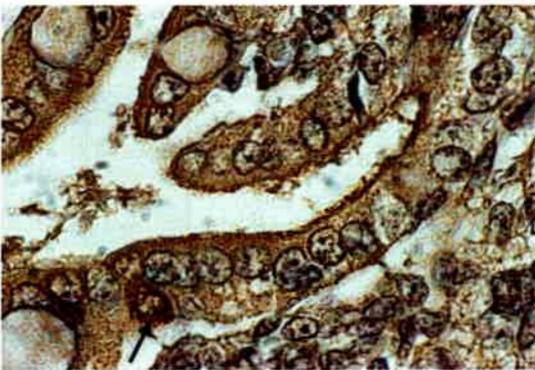


Fig. 23. Feto de 210 días de gestación. Duodeno. En el epitelio (→) se observa una célula positiva, de tipo cerrado, con núcleo central, redondo, y citoplasma con intensa marcación homogénea (+++). 100x.

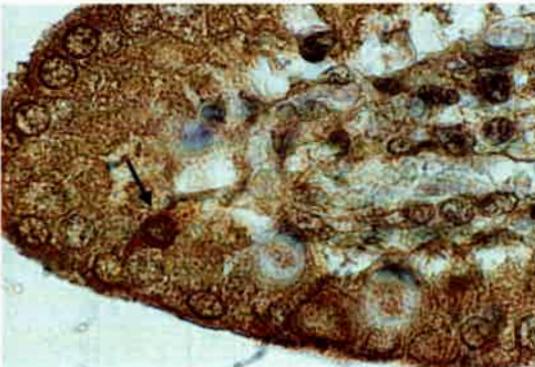


Fig. 24. Feto de 210 días de gestación. Duodeno. Vellosidad. Célula positiva (+++) en la zona basal del epitelio (→). El citoplasma se extiende hacia la superficie luminal mientras que el núcleo se encuentra desplazado hacia la base celular. 100x.

Yeyuno-Ileon

La frecuencia de aparición de células positivas en yeyuno fue menor con relación a la hallada en el duodeno, especialmente en los fetos de menor edad. La mayoría de estas células se ubicaron entre las del revestimiento epitelial (fig. 25); aunque su presencia se extendió no sólo a nivel de las glándulas intestinales sino también al corion, donde se observaron algunas células marcadas (fig.26).



Fig. 25. Feto de 180 días de gestación. Yeyuno. Corte transversal de una vellosidad. Célula positiva (+++) en el epitelio (→), de tipo abierto, forma alargada y núcleo voluminoso. En la zona contrapuesta se distingue una célula caliciforme. 100x.

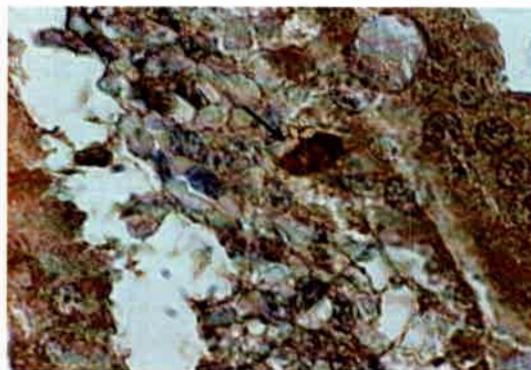


Fig. 26. Feto de 180 días de gestación. Yeyuno. Vellosidad. En el corion (→) se observa una célula positiva con intensa marcación (+++). Próxima a ella, en el epitelio, se distingue una célula caliciforme. 100x.

Dentro de este período, en los fetos de mayor edad, las células con marca positiva acusaron una forma predominantemente piramidal (fig.27). En las células con inmunomarca positiva que se identificaron a nivel de las vellosidades intestinales, primó la ubicación basal de los núcleos y el citoplasma mostró un tinte amarillento de apariencia homogénea.

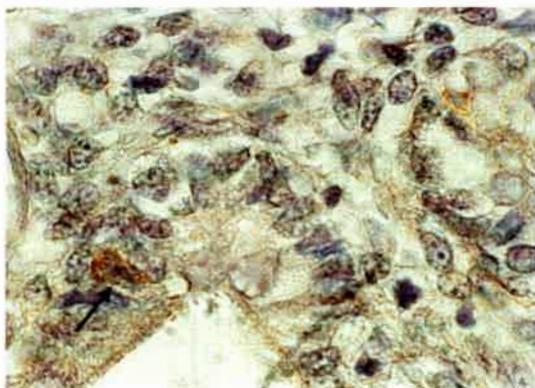


Fig. 27. Feto de 210 días de gestación. Yeyuno. Epitelio de revestimiento. Obsérvese una célula positiva piramidal (→), núcleo central y citoplasma con gránulos homogéneos y evidentes (+++) 100x.

A nivel de las glándulas intestinales, se observó marcación positiva a lo largo de la extensión de las mismas (fig.28). Es así que unas células positivas se localizaron en el tercio superior de las glándulas, es decir próximo a su desembocadura (fig. 29); otras lo hicieron en el tercio medio (fig. 30) mientras que otras lo hicieron en el tercio inferior o fondo (fig. 31). En el tejido conectivo subyacente al tejido epitelial, también pudo determinarse la presencia de células positivas.

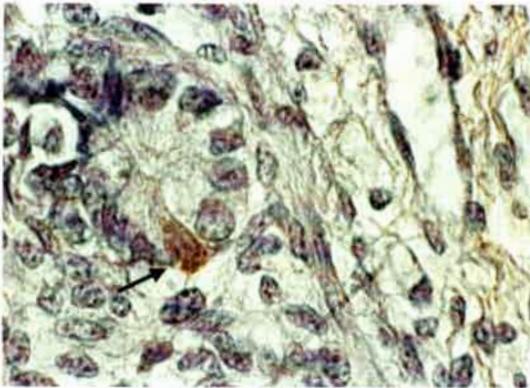


Fig. 28. Feto de 210 días de gestación. Yeyuno. Glándula intestinal. Corte transversal. Célula piramidal (→), con núcleo de ubicación apical y gránulos muy reactivos (++). 100x.

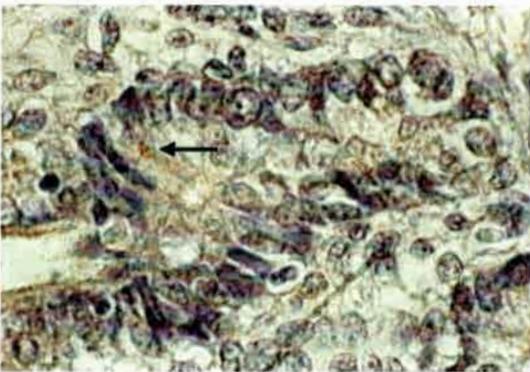


Fig. 29. Feto de 210 días de gestación. Yeyuno. Glándula intestinal. Corte longitudinal. En el tercio superior (→) se visualiza una célula positiva con escasa marcación (+). 100x.

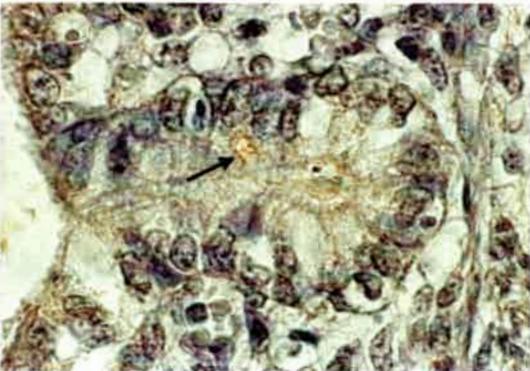


Fig. 30. Feto de 210 días de gestación. Yeyuno. Glándula intestinal. Corte longitudinal. En el tercio medio se visualiza una célula positiva (→) con moderada marcación (++). 100x.

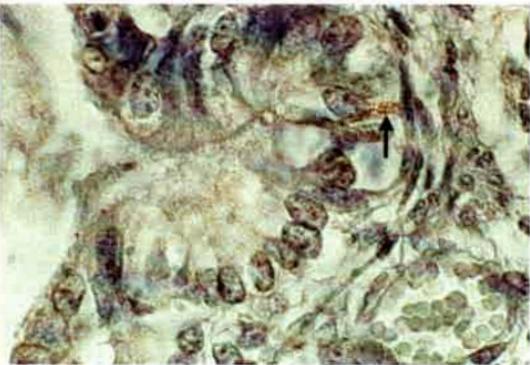


Fig. 31. Feto de 210 días de gestación. Yeyuno. Glándula intestinal. Corte longitudinal. En el tercio inferior (→) se visualiza una célula positiva, alargada con gránulos (++) distribuidos a lo largo de la misma 100x.

Ciego

En las observaciones de los cortes histológicos efectuados a los fetos de menor edad del período G 2, pudo determinarse la presencia de células positivas a secretina en el tejido epitelial de revestimiento (fig.32) y en glándulas intestinales (fig.33). En estas últimas, las células positivas se extendieron hasta el tercio inferior o fondo.

Aquellas que se localizaron entre las células epiteliales de revestimiento presentaron una forma que varió de aplanada lateralmente a piramidal (fig.32); mientras que las localizadas en el epitelio glandular acusaron una forma más bien redondeada (fig.33).



Fig. 32. Feto de 180 días de gestación. Intestino grueso. Célula positiva, de forma triangular (→), con gránulos (+++) ubicados preferentemente en la base celular. 100x.

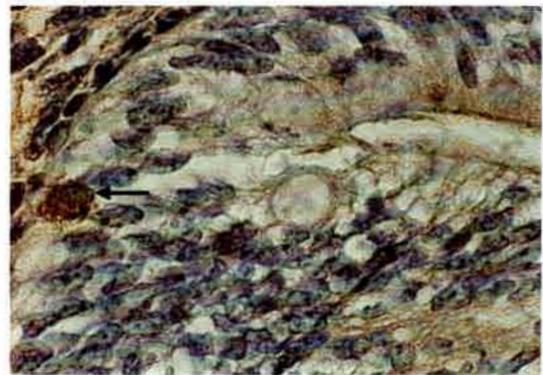


Fig. 33. Feto de 180 días de gestación. Intestino grueso. Glándula intestinal. Corte oblicuo. Obsérvese, en el fondo de la misma, una célula de tipo cerrado (→) con intensa reacción (+++) y núcleo apical e 100x.

Algunas de las células positivas a secretina mostraron una marcación que varió de débil a moderada (figs.34 y 35).



Fig. 34. Feto de 180 días de gestación. Intestino grueso. En la zona basal del revestimiento epitelial se visualiza una célula positiva (→), alargada, de tipo cerrado (+). 40x.

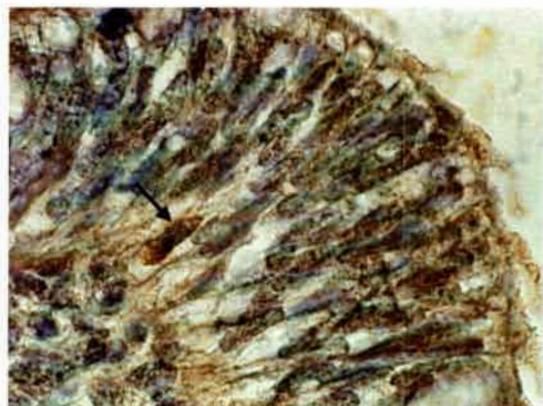


Fig. 35. Feto de 180 días de gestación. Intestino grueso. Célula positiva (++) localizada en la zona basal del revestimiento epitelial (→), de forma alargada y núcleo central. 100x.

Dentro de este período, en los fetos de mayor edad, las células con inmunomarcas también se observaron en el tercio inferior de las glándulas intestinales. Las mismas mostraron forma piramidal y se enmarcaron dentro de las de tipo cerrado (fig.36).

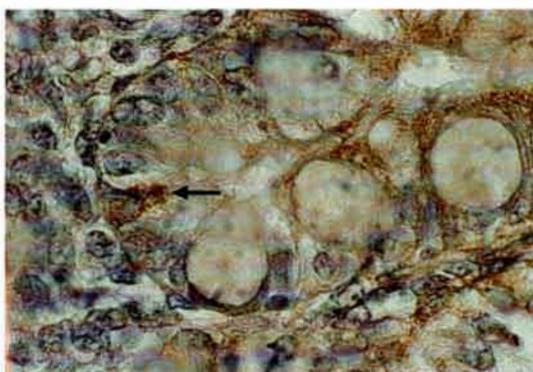


Fig. 36. Feto de 210 días de gestación. Intestino grueso. Glándula intestinal. Corte longitudinal. Célula positiva (→), localizada en el fondo de la misma, de forma piramidal, gránulos evidentes y núcleo redondo central (+++). Son notorias las células caliciformes. 100x.

El comportamiento de la gastrina y secretina en los dos primeros tercios de la gestación en fetos de distintas especies se detalla en la [tabla 2](#) a los efectos de brindar resultados comparativos entre ellas. Se observa, en el primer tercio de la gestación, la presencia de células positivas G y S que son coincidentes con las identificadas en las especies humana, porcina y bovina; mientras que en la especie ovina no se detectaron células reaccionantes para igual tercio de la gestación.

En cuanto al segundo tercio de la gestación, la presencia de células reaccionantes G y S coincidió con la especie ovina. Con respecto a la especie porcina, sólo la presencia de células S coincidió con la de los fetos de caballo; mientras que en las especies humana y bovina, para dicho tercio, las células G y S no fueron detectadas.

Tabla 2. Diversas especies animales en el primer tercio (etapa temprana) y segundo de la gestación.

Especie	Primer Tercio		Segundo Tercio	
	G	S	G	S
Humana	+	+		
Porcina	+	↓ +		+
Ovina			+	+
Bovina	+	+		
Esquina	+	+	+	+

Referencias: G: gastrina, S: Secretina, ↓ : Final del Tercio

Tercer Período - G 3 - (Tercer Tercio de la gestación)

El patrón de expresión positiva observado en los períodos anteriores tuvo su similar en el tercer período de gestación, si bien, en algunas de las células, pudo observarse una escasa reacción frente a la marcación con los anticuerpos correspondientes.

Se pudo determinar la presencia de células positivas entre aquellas del epitelio superficial (fig.37) y glandular (fig.38).

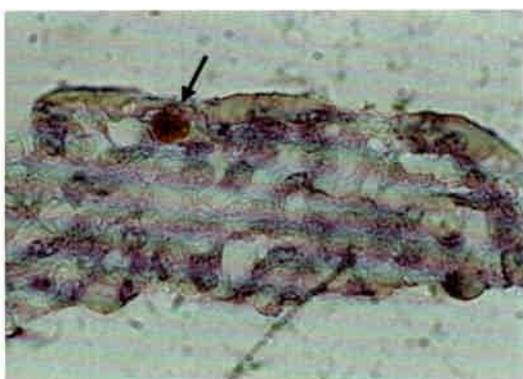


Fig. 37. Feto de 240 días de gestación. Duodeno. En el epitelio de revestimiento se observa una célula positiva (→) de forma redonda y evidente inmunomarca (+++). 100x.

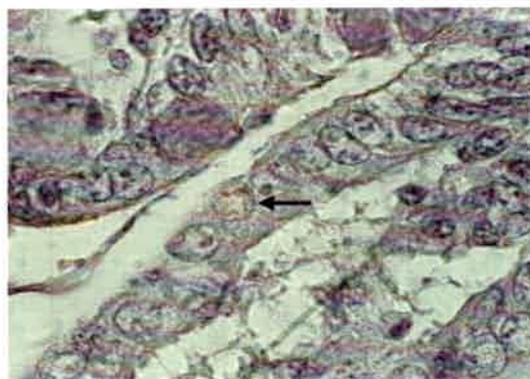


Fig.38. Feto de 240 días de gestación. Duodeno. Glándula intestinal. Corte longitudinal. En el tercio superior, en contraposición a una célula caliciforme, se observa una célula positiva (→) con débil reacción perinuclear (+). 100x.

Asimismo, a nivel del corion pudo determinarse la presencia de células con inmunomarca positiva (fig.39). Como aspecto particular se considera la marca positiva que mostraron las células localizadas a nivel de las glándulas submucosas o de Brunner (fig.40).



Fig. 39. Feto de 240 días de gestación. Duodeno. Célula positiva localizada en el corion interglandular (→). Los gránulos (++) se destacan sobre el fondo más amarillento del citoplasma. 100x.

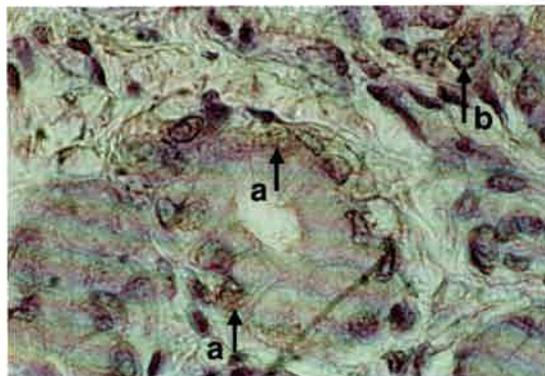


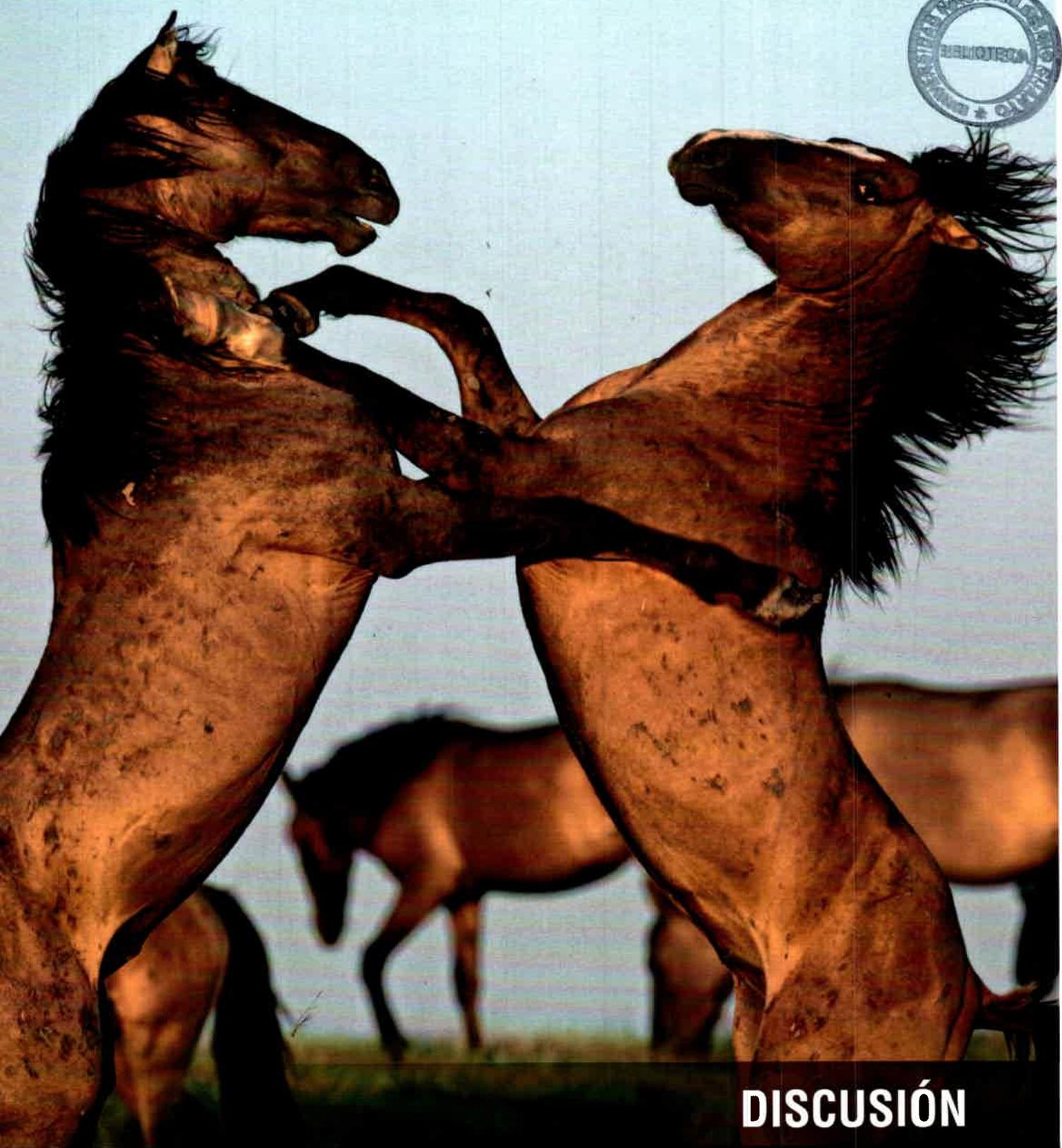
Fig. 40. Feto de 240 días de gestación. Duodeno. Glándula de Brunner. Corte transversal. Se diferencian tres células positivas (++) . Dos de ellas se localizan en el epitelio glandular (a→), mientras que la restante en el corion (b→) 100x.

En la **tabla 3** se puede observar la distribución de las hormonas gastrina y secretina en las porciones de tracto gastrointestinal de fetos de caballo correspondientes a los distintos periodos de la gestación, los cuales se expresan en tercios.

Tabla 3. Distribución de las hormonas gastrina y secretina en el tracto gastrointestinal de fetos de caballo en los distintos periodos de la gestación (tercios).

Tercios	Asas Intestinales		Estómago		Duodeno		Yeyuno-ileon		Intestino Grueso	
	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S
Primero	+	+	+	---						
Segundo			+	---	+	+	---	+	+	+
Tercero			+	---	+	+	---	+	+	+

Referencias: gastrina: G, secretina: S, marcación positiva: +, marcación negativa: -.



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En las diferentes muestras examinadas de fetos correspondientes a los Períodos G1, G2 y G3, a las que se les practicó la tinción de Hematoxilina/Eosina, la identificación de células enteroendocrinas **G** y **S** resultó difícil. Esto coincide con lo mencionado en algunas citas bibliográficas relacionadas con humanos (UCGS, 2003) y animales domésticos (Gázquez Ortiz, et al., 2004). Sobre el particular, Ross et al., 2005, atribuyen esta dificultad a la escasez de RNA y membranas, lo cual imprime a la célula una escasa basofilia y acidofilia respectivamente, que se traduce en la consecuencia mencionada precedentemente.

Las células enteroendocrinas **G** y **S** se estudiaron en distintas porciones del tubo digestivo (estómago, intestino delgado e intestino grueso) aplicando la técnica inmunohistoquímica.

Gastrina

En los fetos de caballo correspondientes a los Períodos G1, G2 y G3, las células **G** se distribuyeron entre las células epiteliales de revestimiento a partir de etapas tempranas del desarrollo (G1). Asimismo, su presencia también se detectó en las glándulas fúndicas, especialmente a partir del Período G2, debido a la posibilidad de diferenciar, con mayor precisión, la arquitectura histológica de las mismas. Esta distribución celular hallada en el estómago, coincidió con la mencionada por otros autores en diferentes especies animales en el período posnatal (Dellman, 1993; Ceccarelli et al., 1995; Rizzotti et al., 1980 b; Capella et al., 1969; Capella et al., 1972; Domeneghi et al., 1981; Furuse et al., 1999; Baltazar et al., 1998). En el trabajo de Galán et al., 1996 se señala la ausencia de células **G** en la región fúndica del estómago, intestino delgado y grueso entre otros órganos del perro, aunque la presencia de aquéllas fue observada principalmente en la mucosa del antro pilórico.

La localización de células **G** en fetos de caballo fue coincidente con la descrita en caballos adultos (Kitamura et al., 1984 y Ceccarelli et al., 1995).

En fetos de ovinos (Ceccarelli et al., 1991) y de bovinos (Guilloteau et al., 1998) se citan hallazgos similares a los observados en fetos de caballo.

Con relación a la morfología celular, las células **G** de fetos de caballo, en los diferentes Períodos, no mostraron mayores diferencias con las detalladas por distintos autores. Es así que, en individuos adultos de diferentes especies, se describen características morfológicas generales donde la forma varía de redonda a piramidal en humanos (UCGS, 2003); redonda, ovalada, de huso y triangular en caballos adultos (Ceccarelli et al., 1995); y piramidal en algunas otras especies domésticas y salvajes (Gázquez Ortiz et al., 2004; Dall'Aglio et al., 1998 y Ceccarelli et al., 1995; Polak y Priestley, 1992).

Respecto a la distribución de los gránulos en las células con inmunomarca positiva, en fetos de caballo mostró cierta variación ya que aquéllos no sólo se ubicaron en la parte basal de la célula, como habitualmente ocurre en distintas especies (UCGS; 2003; (Kaplan y Pesce; 1986; Gázquez Ortiz et al.; 2004; Galán et al.; 1996) sino que también se localizaron en otras áreas de la superficie celular tal como ocurre en el caballo adulto (Ceccarelli et al.; 1995).

Distintos tipos de gránulos se han descrito acorde a su forma tamaño y densidad. Es así que Peranzi et al.; 1984, menciona la presencia de gránulos de diferentes tamaños y densidad en perro, gato y mono; mientras que Galán et al., 1996, señala la presencia de tres tipos diferentes de gránulos en las células **G** del perro.

El hallazgo de células en fetos de caballo, que por sus características refieren a las de tipo abierto y cerrado, no mostraron mayores diferencias con aquellas que se describen en distintas especies de ejemplares adultos (Ceccarelli et al., 1990; 1995; Fuyita, 1976; Dall'Aglio et al., 1998).

En fetos de caballo, a partir del Período G1, se identificaron células de tipo abierto con forma piramidal. Estas dos características morfológicas encuentran sus similares en las de los caballos adultos acorde al trabajo realizado por Ceccarelli et al., 1995 sobre dicha especie. Desde esta óptica morfológica podría inferirse que los individuos prenatales y adultos de caballo muestran un comportamiento dual sobre el particular. No obstante, en fetos de caballo pertenecientes al Período G2 prevalecieron las células de tipo cerrado.

A nivel del *tubo intestinal*, la identificación de células **G** en fetos de caballo, coincidió mayormente con los hallazgos citados por diferentes autores. Las coincidencias, vinculadas con la localización de dichas células, se circunscribieron a nivel del epitelio

y glándulas intestinales de diversas especies domésticas como el perro y gato (Peranzi et al., 1984); cerdo y oveja (Ceccarelli et al., 1987; 1991); y buey (Rizzotti et al., 1979).

Los resultados obtenidos en fetos de caballo, referentes a la distribución de células **G** en el tubo intestinal, guardan una analogía con los resultados obtenidos por Kitamura et al., 1984; y Cecarrelli et al., 1990; 1995, realizados en caballos adultos.

Similares hallazgos se observaron en especies no domésticas como el corzo (Ceccarelli et al., 1995); jabalí (Dall'Aglío et al., 1998); barbirusa (Agungpriyono et al., 2000); marsupial (Krause et al., 1985) y mono (Peranzi et al., 1984).

En humanos (Facer et al., 1989; Sjolund et al., 1983) mencionan hallazgos con características similares a las descritas.

Por otro lado, es coincidente la determinación de la presencia de células con inmunomarca positiva a gastrina en las glándulas submucosas o de Brunner de fetos de caballo del Período G2, con la de humanos (Coutinho et al., 1996) y en el cerdo de guinea (Moore et al., 2000; Chu et al., 2006).

En *yeyuno-ileon*, los resultados negativos frente a la inmunomarca de células **G** guarda semejanza con los hallados en el caballo adulto (Kitamura et al., 1984 y Ceccarelli et al., 1995) y los descritos en humanos (Psicobiological Net, 2006). Sin embargo, en otras especies domésticas, se identificaron células **G** a lo largo de todo el tracto gastrointestinal (Peranzi et al., 1984; Ceccarelli et al., 1987, 1991; Krause et al., 1985; Rizzotti et al., 1979). El mismo comportamiento se menciona en trabajos realizados en especies no domésticas (Castaldo et al., 1994; Lucini et al, 1998; Dall'Aglío et al., 1998).

En el *intestino grueso*, a partir del Período G2, los fetos exhibieron células positivas a gastrina. Las mismas no sólo se localizaron en el epitelio sino que su presencia se extendió al corion subyacente de la túnica mucosa. Estos resultados, en parte, concuerdan con lo descrito por Gázquez Ortiz et al., 2004, ya que dicho autor no hace mención alguna respecto a la localización de células **G** en el corion. Por otro lado, Ceccarelli et al. 1995, en su investigación sobre el corzo, menciona hallazgos similares en el intestino grueso de esta especie animal; aunque hace notar la escasa presencia de aquéllas en este segmento del tubo intestinal. Las apreciaciones de Geneser, 2000,

no varían en este sentido cuando al referirse a la presencia de células **G** en el intestino grueso de humanos, señala la tendencia a la disminución que dichas células experimentan en esta porción del intestino. En el trabajo de Ferri et al., 1983, referente a la distribución de péptidos a nivel intestinal en humanos, señala una localización preferencial de éstos a nivel del tejido epitelial.

Contrariamente, Galán et al., 1996, en su trabajo vinculado con la distribución de células **G** en el perro, no detecta la presencia de las mismas en el intestino grueso como así tampoco en algunos otros órganos del aparato digestivo. Estos resultados negativos también se obtuvieron en otras especies como el buey filipino (Maala et al., 1997; Baltazar et al., 1998); jabalí (Dall' Aglio et al., 1998) y venado (Ceccarelli et al., 1995).

En caballos adultos, Kitamura et al., 1984 y Ceccarelli et al., 1990, no hallaron células **G** positivas en el intestino grueso, lo cual marca una diferencia con los resultados obtenidos en los fetos de esta especie animal.

Los hallazgos de células **G**, en etapas tempranas del desarrollo fetal del caballo, coincide con aquellos descritos, para la misma etapa, en fetos de otras especies como el cerdo (Alumets et al., 1983; Zabel et al., 1995); bovinos (Guilloteau et al., 1998) y humanos (Bryan et al., 1982 y Vincze et al., 2001). Esta manifestación de células con inmunomarca positiva e gastrina en el primer tercio de la gestación, coincide también con la observada en fetos de oveja, aunque en esta especie la mayor presencia de dichas células ocurre a partir del segundo tercio de la gestación (Ceccarelli et al., 1991; Shulkes et al., 1982; Redondo et al., 1997).

Secretina

A partir de fetos de caballo pertenecientes a etapas tempranas del desarrollo (Período G1), se identificaron células con inmunomarcas positivas a secretina, las cuales se localizaron en estructuras que, por su perfil histológico, guardan una cierta similitud con aquellas que se observan en los individuos adultos como lo son las vellosidades a nivel de la superficie del tubo intestinal.

No obstante, en otras estructuras del mismo campo histológico, pero carentes de este aspecto morfológico, igualmente se pudieron identificar aquellas células. Más aún, esta localización no se circunscribió sólo al epitelio de revestimiento y glandular, como

se determinó en distintas especies en períodos prenatal y neonatal, sino que también estas células positivas o células **S** pudieron observarse en el tejido conectivo subyacente al tejido epitelial aludido precedentemente, con lo cual, la localización de las células **S**, en fetos de caballo, tendría un carácter dual. No se mencionan hallazgos similares en fetos de cerdo (Alumets et al., 1983) y de oveja (Ceccarelli et al., 1991).

En cuanto a la ubicación de las células **S** a nivel del epitelio de revestimiento, se hallaron coincidencias entre fetos de caballo y fetos humanos (Vencze et al., 2001; Ferri et al., 1983).

Esta misma coincidencia se determinó a nivel de las glándulas intestinales o de Lieberkhûn entre fetos de caballo y fetos humanos (Leduque et al., 1981). Hallazgos similares son mencionados en los trabajos de Ito et al., 1985 en fetos de cerdo y Agungpriyono et al., 2000 en el cerdo salvaje indonesio.

En las muestras de fetos de caballo correspondientes a los Períodos G2 y G3, donde el perfil o arquitectura histológica pudo determinarse con mayor precisión, también se identificaron células con inmunomarca positiva a secretina. Estas células, en dichos Períodos, presentaron una distribución en el *intestino delgado* en consonancia con lo descrito por Lee, 2000 en la cabra coreana; Lucini et al., 1999 en el búfalo adulto; Baltazar et al., 1998 en el cerdo filipino.

Más precisamente, el hallazgo de células **S** en el duodeno de fetos de caballo, para iguales Períodos, encuentra su similar con el de otras especies como el búfalo (Castaldo et al., 1994) y cerdo indonesio (Agungpriyono et al., 2000). La identificación de células **S** en la zona de transición entre el epitelio de revestimiento y glandular en fetos de caballo marca una coincidencia “topográfica” con los hallazgos de igual características citados por Wheeler et al., 1992.

La presencia de células **S** en fetos de otras especies también se citan en algunos trabajos como el realizado por Vincze et al., 2001 y Leduque et al., 1981 en humanos; Van Ginneken et al., 2004 y Alumets et al., 1983 en cerdos.

En fetos del Período G3, se identificaron células **S** a nivel de las glándulas submucosas o de Brunner, hallazgo éste no citado en fetos de otras especies aunque sí se menciona en el trabajo de Moore et al., 2000; Chu et al., 2006, realizado en cerdos de Guinea.



El trabajo de Kitamura et al., 1984 realizado en caballos adultos, referente a la localización de células **S** en el duodeno, comparativamente permite señalar la analogía existente entre dichos hallazgos con los descritos en los fetos de caballo.

Con relación a la presencia de células **S** en el *yeyuno-ileon*, en fetos de caballo se correspondió con el primero de los segmentos intestinales mencionados, lo cual guarda correspondencia con los hallazgos en feto humanos (Leduque et al., 1981); mamíferos (Larson et al., 1977; Wheeler et al., 1992); fetos de cerdo (Van Ginneken et al., 2004) y búfalos de diferentes edades (Castaldo et al., 1994).

Por otro lado, la identificación de células **S** en el ileon como los demostrados por Van Ginneken et al., 2004, en el período neonatal; Castaldo et al., 1994 y Larson et al., 1977, no ocurrió en fetos de caballo lo cual coincide con observaciones efectuadas en fetos humanos (Leduque et al., 1981).

En yeyuno de fetos de caballo se identificaron células con inmunomarcas positivas a secretina en el tejido conectivo del corion subyacente al epitelio. Esta particularidad no es mencionada en fetos de otras especies.

A nivel del *intestino grueso*, los trabajos de Maala et al., 1997 en el cerdo filipino y Leduque et al., 1981 en fetos humanos hacen referencia a la ausencia de células **S** en dicha porción intestinal. Sin embargo Larson et al., 1977; Wheeler et al., 2006, menciona el hallazgo de células positivas en fetos humanos en dicho tramo intestinal. Esto último concuerda con lo observado en fetos de caballo ya que se pudo determinar la presencia de células **S** no sólo en el epitelio superficial sino también en las estructuras glandulares de la túnica mucosa.

Con relación a la morfología celular, las células **S** de fetos de caballo, en los diferentes Períodos, no mostraron mayores diferencias con respecto a las características observadas en las células **G**. En individuos adultos de diferentes especies, se describen formas que varían de redonda a piramidal en humanos (Ross, et al., 2005; UCGS, 2003); redonda, ovalada, de huso y triangular en caballos adultos (Ceccarelli et al., 1995 y en la cabra coreana (Maiso, 2000); y piramidal en otras especies domésticas y salvajes (Kitamura et al., 1990; Dall'Aglio et al., 1998 y Ceccarelli et al., 1995).

En el Período G1 se observó que la forma ovalada fue la que primó en las células **S**; lo cual no coincidió con la morfología celular observada en las células **G** en fetos del mismo Período, ya que en ellas las formas celulares fueron variadas.

Las células **S** localizadas en el corion acusaron un tamaño pequeño.

Las células **S** identificadas en duodeno de fetos del Período G2 mostraron que aquellas con forma ovalada fueron las que exhibieron menor tamaño.

Con relación a la distribución de los gránulos en las células **S**, para los diferentes Períodos, en fetos de caballo se observó un comportamiento similar a aquel que mostraron las células **G**. Es así que, en algunas células **S**, los gránulos se ubicaron en la parte basal de las mismas mientras que en otras lo hicieron en distintas áreas citoplasmáticas. Asimismo, en dichos fetos, se observaron células **S** con un citoplasma de apariencia homogénea, aspecto este citado en humanos (Usellini et al., 1990).

En fetos de caballo se observó la alternancia de gránulos de tinte oscuro y claro para una misma célula **S**, similar a lo observado en las células **G**. Estas apreciaciones podrían aproximarse con aquellas efectuadas en células **G** de humanos adultos, donde se alude a la variación de forma, tamaño y densidad que muestran los gránulos en dichas células. Si bien en un principio se determinó la presencia de un solo tipo de gránulos en las células **S** de humanos, trabajos posteriores demostraron la presencia de gránulos de secretina con diferentes características estructurales lo cual representaría una particularidad en las células **S** en dicha especie que conllevaría a inferir la existencia de más de un tipo de gránulos (Usellini et al., 1990; Bryan et al., 1980). Lo expresado precedentemente guardaría relación con lo descrito en otras especies como el perro, gato y mono (Peranzi et al., 1984).

Las células **S** de fetos de caballo localizadas en el corion a partir del Período G1, revelaron un tinte oscuro y escasa presencia de gránulos.

La variación en las formas observadas en fetos de caballo en los distintos Períodos, habla a favor de la presencia de células de tipo abierto y cerrado, prevaleciendo el segundo de los tipos. La forma ovalada fue la que predominantemente se observó en los fetos pertenecientes al Período G1. No obstante, la presencia de ambos tipos celulares en los fetos de caballo coinciden con las citas de algunos autores en diferentes especies que incluyen al caballo adulto (Ceccarelli et al., 1990; 1995; Fujita, 1976; Fujita et al., 1988 y Dall'Aglio et al., 1998).

La identificación de células **S** en fetos de caballo pudo determinarse a partir del Período G1, es decir durante el primer tercio de la gestación, el cual incluye la etapa temprana del desarrollo. Esto concuerda con lo hallado por Bryan et al., 1982 al mencionar la presencia de células **S** en fetos humanos pertenecientes al primer tercio de la gestación. Esta coincidencia también se manifiesta en fetos bovinos ya que la determinación de la concentración plasmática de secretina ocurre a partir del primer tercio de la gestación (Guilloteau et al., 1998).

Sin embargo, los hallazgos mencionados precedentemente, no coinciden, desde un punto de vista temporal, con aquellos encontrados en fetos de cerdo, ya que en éstos la detección de células **S** se logró hacia el final del primer tercio y durante el segundo tercio de gestación (Alumtes et al., 1983). En el trabajo de Ito et al., 1985, en fetos de cerdos, se menciona la identificación de células **S** a partir del segundo tercio de gestación.

Por otro lado, los resultados obtenidos en fetos de caballo disienten, en cuanto al momento del período gestacional, con los resultados mencionados por Vincze et al., 2001 en fetos humanos, cuando señala que la presencia de células **S** se produce a partir del segundo tercio de gestación.



CONCLUSIÓN

CONCLUSIÓN

La identificación de las células enteroendocrinas **G** y **S**, con las técnicas corrientes de coloración, como la Hematoxilina/Eosina, resulta dificultosa; lo cual coincide con lo citado por distintos autores en diferentes especies.

Con relación a la **Gastrina**:

La distribución de células **G** en el estómago de fetos de caballo es similar al que muestran otras especies en el período prenatal (ovinos, bovinos) y postnatal (caballo, corzo).

La morfología celular, en los distintos Períodos analizados, muestra variaciones que guardan similitud con aquellas que presentan los individuos adultos de diferentes especies (caballo, jabalí, corzo, rata).

La distribución de gránulos en el interior de las células mostró variaciones con relación a la de otras especies (perro, gato, mono), aunque coincide con la del caballo adulto.

La presencia de gránulos con distinto matiz o tinte presume la existencia de más de un tipo de ellos, lo cual se hallaría en consonancia con lo señalado en algunas especies domésticas como el perro y gato.

En los tres Períodos de la Gestación se identifican células positivas de tipo abierto y cerrado. Las mismas presentan características similares a las observadas en caballos adultos como también en otras especies (ovino, bovino, humano, perro, jabalí, corzo, zarigueya, buey, cerdos). En el Período G2, prevalecen las células de tipo cerrado.

En fetos correspondientes al período G1, se identificaron células positivas a gastrina en tejido epitelial y conectivo.

La localización de células **G**, a nivel del tubo intestinal de fetos de caballo, presenta similitud con las de las especies no domésticas (corzo, jabalí, mono, marsupial, barbirusa) y domésticas (perro, gato, cerdo, oveja, buey incluido el caballo adulto);

identificándose, en humanos, células con características similares a las mencionadas precedentemente (Facer et al.,1989; Sjolund et al.,1983),

En el duodeno de fetos, a partir del Período G2, se identifican células con inmunomarca positiva en las glándulas de Brunner, en consonancia con los hallazgos resultantes de estudios efectuados en humanos y cerdo de Guinea.

No se encuentran células **G** en yeyuno-ileon de fetos de caballo, lo cual coincide con lo hallado en el caballo adulto y otras especies como humanos; aunque esto se contrapone con lo citado para otras especies animales como el gato, perro, mono, cerdo, oveja, marsupial, buey, búfalo y jabalí),

La presencia de células **G** en el intestino grueso de fetos concuerda con la observada en algunas especies (humanos, corzo), aunque en aquéllos dichas células también se localizan en el corion, hecho este prácticamente infrecuente en otras especies como por ejemplo en humanos.

La presencia de células **G**, en etapas tempranas del desarrollo, concuerda con lo observado en fetos de otras especies (humana. bovina. porcina, ovina), identificándose dichas células a nivel del tejido epitelial y conectivo.

Con relación a la **Secretina**:

La presencia de células **S** en fetos de caballo se detecta a partir del período G1 de la gestación en células ubicadas entre las células del epitelio de revestimiento y en el tejido conectivo.

La distribución de las células **S** en el intestino delgado de fetos pertenecientes a los Período G2 y G3, coincide con la de algunas especies de animales adultos incluidas especies salvajes (fetos de cerdo, cerdo salvaje indonesio, rata; humanos y búfalo).

La localización de las células **S**, en el epitelio de revestimiento y glandular en fetos de caballo, es similar a la que presentan los fetos de humanos, y de ciertas especies

domésticas y salvajes (cerdo, cerdo salvaje indonesio), como así también con la de individuos en el período postnatal.(caballo).

La ubicación de células **S** en el tejido conectivo se muestra como una particularidad con respecto a fetos de algunas otras especies domésticas, como sucede en cerdos y ovinos en las que no se mencionan hallazgos similares a los descritos en fetos de caballo.

La presencia de células positivas en el duodeno no muestra particularidad alguna entre fetos de caballo e individuos adultos de otras especies entre las que se incluyen al caballo, cerdo, cerdo indonesio, rata, humano y búfalo.

La presencia de células **S** a nivel de las glándulas de Brunner de fetos correspondientes al Período G3 indica una particularidad en éstos ya que no se observa igual conducta en fetos de otras especies, aunque si se encontró similitud en ciertos animales adultos como el cerdo de guinea y caballo.

La localización de células **S** en el yeyuno de fetos de caballo se correspondió con la de los fetos de ciertas especies (humano, y rata) y con la de animales adultos de especies domésticas y salvajes (cerdo, búfalo).

A diferencia de lo que sucede con algunas especies (cerdo, rata, búfalo y humano), en el ileon de fetos de caballo no se hallaron células **S**.

El hallazgo de células **S** en el tejido conectivo (corion) de fetos de caballo se muestra como una particularidad ya que no se han encontrado descripciones de hallazgos similares en fetos de otras especies.

La identificación de células **S** en el intestino grueso de los fetos de caballo significa un hallazgo singular ya que ello suele resultar poco frecuente en fetos de otras especies como ocurre en humanos.

La morfología de las células **S** se asemeja a aquella de las células **G**. En las primeras, en el Período G1, predomina la forma ovalada, mientras que para las segunda, en dicho Período, las formas se muestran variadas.

La distribución y tinte de los gránulos de las células **S** guarda un comportamiento similar al que presentan las células **G**.

Las células **S** localizadas en el corion resultan ser de pequeño tamaño y presentan escasos gránulos.

Si bien las células **S** se muestran de tipo abierto y cerrado, este último es el que predomina.

La presencia de células **S** en fetos de caballo en etapa temprana del desarrollo, concuerda con lo observado en fetos de humanos y bovinos.

IMPORTANCIA DEL PROYECTO

El caballo es un ser útil como instrumento de trabajo, pero no menospreciado como medio de esparcimiento, locomoción, atletismo y, en los últimos tiempos, como recurso terapéutico para el tratamiento de afecciones locomotoras en humanos. Para satisfacer estas cualidades es necesario que el animal cuente con un crecimiento y desarrollo sostenible desde el período prenatal, que por tratarse de un momento crítico, merece ser atendido particularmente por los distintos aspectos que el mismo involucra.

Con este trabajo se intenta aportar información parcial sobre uno de esos aspectos, cual es el referido a la determinación de dos hormonas gastrointestinales, dejando abierta la posibilidad de incursionar, en igual campo, con otras hormonas de las que, hasta el presente, no se cuentan con datos referenciales en fetos de caballo, y que, como se explicitó en la Introducción, guardan vital importancia como controladores morfofuncionales del tubo digestivo.





BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- CECCARELLI,P.,GARGIULO,A.M.,and PEDINI,V.,1985.Primi risultati sulla distribuzione delle cellule del SND nel tratto gastro-intestinale del maiale. *Atti Società Italiana Scienze Veterinarie*. XXXIX,24-25.
- CECCARELLI,P.,GARGIULO,A.M. and PEDINI,V.,1987.La cellule endocrine dell'intestino di feti di maiale. *Acta Med. Veter*. 33:297-306.
- CECCARELLI,P.,PEDINI,,V. and GARGIULO,A.M.,1990.La cellule endocrine del sistema GEP nell'intestino di cavallo. *Atti Società Italiana Scienze Veterinarie*.XLIV: 311-313.
- DELLMANN,H-Dieter.1993.Histología Veterinaria. Cap. 10:191-196.Es. Acribia, S:A:
- DUPRE,J.,ROSS,S.A.,WATSON,D. et al. 1973. Stimulation of insulin secretion by gastrin inhibitory polipeptide in man. *J. Clin. Endocrinology Metab*. 37: 826-828.
- GÁZQUEZ ORTIZ,A.,BLANCO RODRÍGUEZ,A. 2004.Tratado de Histología Veterinaria. Cap.11:260-279. 1º ed. Editorial Masson, S.A.
- GENESER,F.,2000.Histología .Cap. 18: 488-506 3rd. Editorial Médica Panamericana S.A.
- HOFFMAN,R.M. 2003. Carbohydrate Metabolism in horses.Recent Advances in Equine Nutrition, SL Ralston and H.F. Hintg (Eds.) Pág. 5
- KANEKO,J.J.,HARRAY,J.W.,BRUSS,M.L., eds.1997 *Clinical Biochemistry of domestic animals*, 5th ed. San Diego: Academic Press:45-81-
- KRAUSE,W.J.,YAMADA,N.Y. and CUTTS,J.H.,1985.Quantitative distribution of enteroendocrine cells in the gastrointestinal tract of the adult opossum, *Didelphis virginiana*. *J. Anat*.140:591-605.
- NARVAEZ-SANCHEZ,R.,CHUAIRE,L.,SANCHEZ,M.C.,BONILLA,J.,2004.Circulación intestinal: su organización, control y papel en el paciente crítico. *Colombia Médica* 35(4): 231-24.
- OBEN,J.,MORGAN,L.,FLETCHER,J.M.,MARKS,V.,1992.The control of porcine adipose tissue metabolism by gut hormones before weaning. .In: *Neonatal Survival and Growth*. Br. Soc. Anim. Prod.,Occasional publ. N°15:189-191
- TOULLEC,R.,CHYVIALLE,J.A.,GUILLOTEAU,P.,BERNARD,C.,1992.Early-life patterns of plasma gut regulatory peptide levels in calves.Effects of age, weaning and feeding. *Comp. Biochem. Physiol*. 102A:203-209.
- AGUNGPRIYONO,S.;MACDONALD,A.A.;LENS,K.Y.;KITAMURA,N.;ADNYANE,I.K.;G OODALL,G.P.;HONDO,E.;YAMADA,J.,2000.Imunohistochemycal studie on the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the babirusae(*Babyrosa babyrusa* (suidae). *Anat. Histol. Embryol*. 29 (3):173-8.

ALUMETS,J.,SUNDLER,F. and HAKANSON,R.,1977.Distribution ontogeny and ultraestructure of somatostatin immunoreactive cells in the pancreas and gut.Cell Tis. Res. 185:465-479.

ALUMETS,J.,HAKANSON,R. and SUNDLER,F.,1983.Ontogeny of endocrine cells in porcine gut and pancreas. Gastroenterology 85:1372-1395.

AVRAMEAS,S.,1969.Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. Inmunochemistry 6:43.

BALTAZAR,E.T.,KITAMURA,N.,HONDO,E.,YAMADA,J.,MAALA,C.P. and SIMBORIO,L.T.,1998.Inmunohistochemical study of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the Philippine carobao (Bubalis bubalis L.). Anatomía-Histología-Embryología. 27:6, 407-411.

BERGIN,W.C.,GIER,H.T.,FREY,R.A. and MARION,G.B.,1967.Developmental Horizons and Measurements Useful for Age Determination of Equine Embryos and Fetuses, Proc. Amer. Assoc. Equine Pract., New Orleans,La.,179.

BASSAN,N.,PEREZ,F.,VINUESA,M.,ROMA,S.,FODOR,M.,ARAUJO,A.2000.Células enteroendócrinas em ciego y apêndice de conejo. Analecta Veterinaa. 20, 1:1-4.

BRYANT,M.G.;DAWSON,J.;BLOOM,S.R.;PETERS,T.J.,1980.Separation of the gut hormones endocrine-cell storage granules of human jejunum using analytical subcellular fractionation. Gut.21 (3):177-180.

BRYANT,M.G.,BUCHAN,A.M.J.,GREGOR,M.,GATHEI,M.A.,POLAK,J.M.Boom,S.R.,1982.Development of intestinal regulatory peptides in the human fetus. Gastroenterology 83:47-54.

BOENISCH,T.2002.Controles. Pág. 32-33. 3ed Manual Métodos Inmunohistoquímicos de Control. DAKO Corporation., Carpintería, California.

BUNN,C.M.,TITCHEN,D.A.,1984.Plasma gastrin in the pig from birth to weaning. Res.Vet. Sei. 37:362-363.

CAPELLA,C.,SOLCIA,E. and VASALLO,G,1969. Identification of six types of endocrine cells in gastrointestinal mucosa of the rabbit. Arch. Histol.. Jap. 30:479-495.

CAPELLA,C. and SOLCIA,E.,1972.The endocrine cells of the pig gastrointestinal mucosa and pancreas .Arch. Histol. Jap. 35:1-29.

CASTALDO,L.;LUCINI,C.;GIROLAMO,P. DE;DE GIROLAMO,P.1994. Distribution and frequency of some endocrine cells in the gastrointestinal tract of differently aged buffaloes. Acta Medico Veterinaria 40:4, 269-278.

CECCARELLI,P.,PEDINI,V. and GARGIULO,A.M.,1991.Enteroendocrine cells in sheep fetuses. Small Ruminant Res. 6:85-93.

CECCARELLI,P.,PEDINI,V. and GARGIULO,A.M.,1995.The Endocrine Cells in the Gastro-enteric Tract of Adult Fallow Deer (Dama dama L.). Anat. Histol. Embryol. 24, 171-174.Blackwell Wissenschafts-Verlag,Berlin.

- CECCARELLI,P.,PEDINI,V.,GARGIULO,A.M.,1995.Serotoning-Containing Cells in the Horse Gastrointestinal Tract. *Anat. Histol. Embryol.* 24,97-99.Blackwell. Wissenschafts-Verlag,Berlín.
- COUTINHO,HB.,TI,R.,COUTINHO,VB.,AMA,A.,ALMEIDA,JR.,FILHO,JTO.,WALKER,E.,KING,G.,SEWELL,HF.,WAKELIN,D., 1996.Immunocytochemical demonstration that human duodenal Brunner's glands may participate in intestinal defence. *J Anat.* 189:193-197.
- CRANWELL,P.D.,HANSKY,J.,1980.Serum gastrin in newborn,sucking and weaned pigs. *Res. Vet. Sci.* 29:85-88.
- CHIBA,A. and HONMAJ,J.,1995.Occurrence of neuropeptide Y(NPYO)-like immunoreactive cells in the velointestinal duct and yolk sac of two species of elasmobranchs. *Zoological Science* 12:611-614.
- CHU,J.Y.S.;YUNG,W.H.;CHON,B.C.K.,2006.Secretin: A Pleiotrophic Hormone. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1070:27-50.
- DALL'AGLIO,C.;SCOCCO,P.;CECCARELLI,P.;PEDINI,V.,1998. Neuroendocrine Cells in the Gastrointestinal Tract of Wild Boar. *Anat. Histol. Embryol.* 27,381-385.
- DIAZ de RADA,O.,1992.Endocrine cells and nerves in the stomach of the lizard *Podarcis hispanica* detected by immunocytochemistry. *Tissue and Cell* 24:705-713.
- DOMENEGHINI,C and CASTALDO,L.,1981.The endocrine cells of the bovine cardiac glands. *Basic Appl.Histochem.*25:51-66.
- FACER,P.,BISHOP,AE.,CLE,GA.,AITCHISON,M.,KENDALL,CH.,van ASWEGEN,G.,PENKETH,RJ.,RODEK,CH.,McKEEVER,P,POLAK,JM.,1989.Developmental profile of chromogranin, hormonal peptides and 5-hidroxytryptamine in gastrointestinal endocrine cells. *Gastroenterology*.Jul. 97(1), 48-57.
- FERRI,G.L.,ADRIAN,T.E.,GATHEL,M.A.,O'SHAUGHNESSY,D.J.,PROBERT,L.,LEE,Y. C.,BU-CHAM,A.M.J.,POLAK,m., and BLOOM,S.R.,1983.Tissue localization and relative distribution of regulatory peptides in separated layers from the human bowel. *Gastroenterology* 84:777-786.
- FOX,C.H.,JOHNSON,F.B.WHITING,J. and ROLLER,P.P.,1985.Formaldehyde Fixation. *J. Histochem.- Cytochem.* 33:845-853.
- FUJITA,T.,KANNO,T., and KOBAYASHI,S.,1988.The paraneuron. (Pp. Xi + 367; many illustration; DM. 348. Tokyo, London: Springer Verlag. In Book Reviews. *Journal Anatomy* (1989), 162: pp 275-279. Printed in Great Britain.
- FUJITA,T.,1976.The gastro-enteric endocrine cell and its paraneuronic nature.In(eds) Chromaffin, Enterochromaffin and Related Cells.R.E. Coupland and T.Fujita,eds Amsterdam:Elsevier Scientific Publishing Co.
- FURNESS,J.B. and COSTA,M.,1982.In:Handbook of Experimental Pharmacology. G.Bertaccini ed.Berlín: Springer 59/1,pp.383-462.

FURUSE, M., AO, R., BUNGO, T., ANDO, R., SHIMOJO, M., MASUDA, Y. and SAITO, N. 1999. Central gastrin inhibits feeding behavior and food passage in neonatal chicks. *Life Sciences* 65:3, 305-311.

GALAN, J.; ALONSO, F.J.M.; MORATINOS, P.; GAZAPO, D., 1996. The G-cells in the dog: a Light and electron microscope immunocytochemical study. *Histochemical Journal*. 28:12, 883-893.

GALÁN TORRES, J.A., 1995. Estudio inmunocitoquímico de la gastrina en el perro. Determinación de sus variaciones fisiológicas en suero mediante radioinmunoensayo. Tesis doctoral; 8-9. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Departamento de Patología animal II. Unidad Docente de Histología y Anatomía Patológica.

GRAHAM, R.C. and KARNOVSKY, M.J., 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 14:291-302.

GRIMELIUS L, WILANDER E., 1980. Silver stains in the study of endocrine cells of gut and pancreas. *Invest Cell Pathol* 3:3-12.

GUESDON, J.L., TERNYCH, T. and AVRAMEAS, S., 1979. The use of avidin biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 27:1131-1139.

GUILLOTEAU, P., HUEROU-LURON, I., DREAN, G., GESTIN, M., PHILOUZE-ROME, V., ARTIAGA, A., BERNARD, C. and CHAYVIALLE, J.A., 1998. Gut regulatory peptide levels in bovine fetuses and their dams between the 3rd and 9th months of gestation. *Biology of the Neonate* 74: 6, 430-438.

HARRISON, J., 1991. *Principios de medicina Interna*. 12^o ed. Interamericana-McGraw Hill; 1422-1429.

HSU, S.M., RAINE, L. and FAUGER, H., 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 29:577-580.

ITO, H., YAMADA, J., KITAMURA, N., YAMASHITA, T., YANAHARA, N. 1985. Histological and immunohistochemical studies of the pig Segi's cap, a large aggregation of endocrine cells on the intestinal villi of porcine fetuses and neonates. *Arch Histol Jpn.* 48(4): 399-409.

KAPLAN, L.A. PESCE, A.J. 1986. *Química Clínica*. Ed. Panamericana. 920-923.

KILIAAN, A.J., SCOLTEN, G. and GROOT, J.A., 1996. Ultrastructural study of the presence of vasoactive intestinal polypeptide and serotonin in mucosa nerve fibres and endocrine cells of the intestine Goldfish (*Carassius auratus*) and Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Cell & Tissue Research* 283(1): 143-150.

KIM-JM., LEE-JH., KU-SK., LEE-HS., 1998. Immunohistochemical study on the endocrine cells of the thymus of the duck (*Anas platyrhynchos platyrhynchos*). *Korean Journal of Veterinary Research* 38:2, 246-257.

KITAMURA,N.J.,YAMADA,N.Y.,CALINGASAN and YAMASHITA,T.,1984.Immunocytochemical distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the horse. *Equine Vet. J.*16:103-107.

KITAMURA,N.J.,YAMADA,N.Y.,WATANABE,T,YAMASHITA,T.,1990.An immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the musk shrew (*Suncus murinus*). *Histol. Histopath.* 5; 83-88.

KOKO,V.,TODOROVIC,V.,VARAGIC,J.,MICEV,M.,KORAC.A.,BAJCETIC,M.,CAKI MILOSEVIC,M.,NEDELJKOVIC,M. and DRNDAREVIC,N.,1998. Gastrin producing G-cells after chronic ethanol and low protein nutrition. *Indian Journal of Experimental Biology* 36:11, 1093-1101.

LARSON,L.I.,1988.Immunocytochemistry: Theory and Practice. CRC Press, Inc.,Boca Raton, Florida.

LARSON,L.I.;SUNDLER,J.;ALUMETS,R.;HAKANSON,O.B.;SCHAFFIALITZKY de MUCKADELL;FOHRENKRIG,L.,1977.Distribution, ontogeny and ultrastructure of the mammalian secretin cell. *Cell Tissue Res* 181:361-368.

LEDUQUE,P.;PAULIN,C.;CHAYVIALLE,J.A.;DUBOIS,P.M.,1981. Immunocytological evidence of motilin- and secretin-containing cells in the human fetalgastro-enteropancreatic system. *Cell and Tissue Research* vol. 218 N° 3: 519-527.

LEE,M.S.,2000. Immunohistochemical study of the secretin-immunoreactive cells in the Gastrointestinal Tract of the Korean native goat. *Korean Medical database.* 16: 1: 69-76.

LLOYD,J.W.,2000.Autism and Secretin. [On Line]. Disponible en: <http://www-special.edschool.virginia.edu/.../secretin.html>.

LUCAS,A.,ADRIAN,T.E.,CHRISTOFIDES,N.,BLOOM,S.R.,AYNSLEYGREEN,A.,1980c .Plasma motilin,gastrin and enteroglucagon and feeding in the human newborn. *Arch. Dis. Child* 55:673-677.

LUCAS,A.,BLOOM,S.R.,AYNSLEY-GREEN,A.,1980d.Development of gut hormones responses to feeding in neonatos. *Arch. Dis. Child* 55:678-682.

LUCINI,C.,GIROLAMO,P.de,COPPOLA,L.,PAINO,G.,CASTALDO,L. and de GIROMANO,P.,1999. Postnatal development of intestinal endocrine cell populations in the water búfalo. *Journal of Anatomy* 195:3, 439-446.

MAALA,C.P.,LANDICHO,E.F. and DYCHEEPUAT,D.L.,1997. Immunocytochemical demonstration of endocrine cells in the large intestine of Philippine carabao (*Bubalis bubalis* L.). *Philippine Journal of Veterinary Medicine* 34:1-2, 45-52.

MARCONDES MACÉA,M.J.,MACÉA,J.R.,TAVARES GUERREIRO FREGNANI, J.H. 2006.Estudio comparativo de las glándulas de Brunner en la submucosa duodenal humana. *Int J. Morphol* [on line] vol 24,N° 1:07-12.

MOORE, B.A.; MORRIS, G.P.; VANNER, S., 2000. A novel in vitro model of Brunner's gland secretion in the Guinea pig duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278: G477-G485.

MURRAY, M.J., LUBA, N.K. 1993. Plasma gastrin, somatostatin, peptide vasoactive and serum T3, rT3, T4 and cortisol in foals from birth to 28 days of age. *Equine Vet. J.*, 1993

NAKANE, P.K. and PIERCE, G.B., 1966. Enzyme-labeled antibodies: preparations and applications for the localization of antigens. *J. Histochemistry and Cytochemistry*. 14:929-931.

ORTEGA LOPEZ, D. 1995. Estudio del comportamiento secretor de las hormonas gastrointestinales implicadas en la motilidad vesicular de la coledocistitis. Tesis Doctoral: 34 Universidad Complutense de Madrid.

OUSEY, J., M., GATHEI, C.M., ROSSDALE, P.D., BLOOM, S.R., 1995. Gut Hormone Response to Feeding in Healthy Pony Foals Aged 0 to 7 days. *Biol. Reprod. Mono.* 1:87-96.

PERANZI, G. and LEHY, T., 1984. Endocrine cells populations in the colon and rectum of cat, dog and monkey: fine structure, immunocytochemistry and distribution. *Anat. Rec.* 240:87-100.

PLATT, H., 1973. Etiological aspects of perinatal mortality in the Thoroughbred. *Equine Vet. J.* 5:116-120.

POLAK, J.M. and VAN NOORDE, S., 1986. Immunocytochemistry. Modern Methods and Applications. 2nd Ed., J. Wright & Sons, Bristol.

POLAK, J.M., PRIESTLEY, J.V., 1992. Electron Microscopic Immunocytochemistry. Principles and Practice. Oxford Science Publications. Oxford University Press; 146-161.

PSICOBIOLOGIA.NET. 2006. Participación Plástica y Funcional-Nivel 3: Neuropeptidos: Otros péptidos: 2.3.12.1/4 Gastrina-Secretina.

REDONDO, E., REGODON, S., MASOT, A.J., FRANCO, A., LIGNEREUX, Y. 1997. The gastrin and CCK cells in the gastrointestinal tract of the sheep during development. *Revue Medicine Veterinaire*. 148: 6,511-518.

REICHLIN, S., 1983. Somatostatin I. *New England J. Med.* 309:1495-1501.

RIZZOTTI, M., DOMENEGHINI, C. and CASTALDO, L., 1979. The endocrine cells of the rectum of adult ox. *Basic. Appl. Histochem.* 23:235-249.

RIZZOTTI, M., DOMENEGHINI, C., and CASTALDO, L., 1980^a. The endocrine cells of the pyloric glands of adult ox. *Basic. Appl. Histochem.* 24:33-52.

RIZZOTTI, M., DOMENEGHINI, C. and CASTALDO, L., 1980^b. The endocrine cells of the proper gastric glands of adult ox. *Basic. Appl. Histochem.* 24:79-93.

ROBERTS, S.J., 1971. *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases (Theriogenology)*. Cap. II: 27. 2^o ed. USA.

ROSS, M.H.; KAYE, G.I.; PAWLINA, W. 2005. Histología. Texto y Atlas color con biología celular y molecular. Cap. 16:176-511. 4ed. Editorial Panamericana S.A.

SANDINI, A., GIRMA, K. 1998. Effects of differently composed feeds and physical stress on plasma gastrin concentration in horses. *Acta Vet. Scand* 1998; 39(2):265-72.

SAKAMOTO T.; FUJIMURA M.; NEWMAN J.; ZHU X.G.; GREELEY, G.H. JR; THOMPSON J.C.: Comparison of hepatic elimination of different forms of Cholecystokinin in dogs. Bioassay and radioimmunoassay comparisons of cholecystokinin-8-sulfate and -33-sulfate. *J. Clin. Invest.*, 1985, 75 (1): 280-285 .

SHULKES, A., CHICK, P., HARDY, K., 1982. Fetal and maternal production and metabolism of gastrin sheep. *J. Endocrinology* 94(2): 183-9.

SJÖLUND, K., SANDEN, C., HAKANSON, R., and SUNDLER, F., 1983. Endocrine cells in humane intestine: and immunocytochemical study. *Gastroenterology* 85:1120-1130.

SMYTH, G.B., YOUNG, D.W., SCHUMACHER, J., 1989. Postprandial serum gastrin concentrations in normal foals. *Equine Vet. J.* 21:285-287.

SOEHARTONO, R.H., KITAMURA, N., YAMAGHISI, N., TAGUCHI, K., YAMADA, J., YAMADA, H. 2002. An immunohistochemical study of endocrine cells in the abomasum of vagotomized calf. *Vet Med Sci* 64(1): 11-5.

TIETZ, N.W., RINKER, A.D., HENDERSON, A.R. 1986. Gastric, pancreatic and intestinal Function. In: Tietz NW (ed). *Textbook of Clinical Chemistry* Philadelphia: WB. Saunders: 1434-1493.

UCSG (UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL). [on line], 2007. Sistema Endocrino: Célula endocrina y especialización tisular. Disponible en: <http://www.Bibli/2007/inernet/Histolog/C3/Ada/Estructura/Celu.htm>.

USELLINI, L.; FINZI, G.; RIVA, C.; CAPELLA, C.; MOCHUZUKI, T.; YANAIHARA, N. SOLCIA, E. 1990. Ultrastructural identification of human secretin cells by the immunogold technique. Their costorage of chromogranin A and serotonin. *Histochemistry and Cell Biology*, Vol 94 (2):113-120.

VAN GINNEKEN, C.; WEYNS, A. 2004. A stereological evaluation of secretin and gastric inhibitory peptide-containing. *J. Anat.* 2005 (4):267-275.

VARRO, A., NEMETH, J., JACQUIBRIDSON, J., LONOVICS, J., DOCKRAY, 1990. Modulation of posttranslational processing of gastrin precursor in dogs. *Am. Physiol. Society*; 904-909.

VINCZE, E., KANTOR, O., KAUSZ, M., NEMETH, J., ARIMURA, A., GONDE, P., KOVES, K. 2001. Comparative study on the appearance of various bioactive peptides in foregut derivatives during the ontogenesis. *J. Physiol Paris.* 95(1-6): 99-103

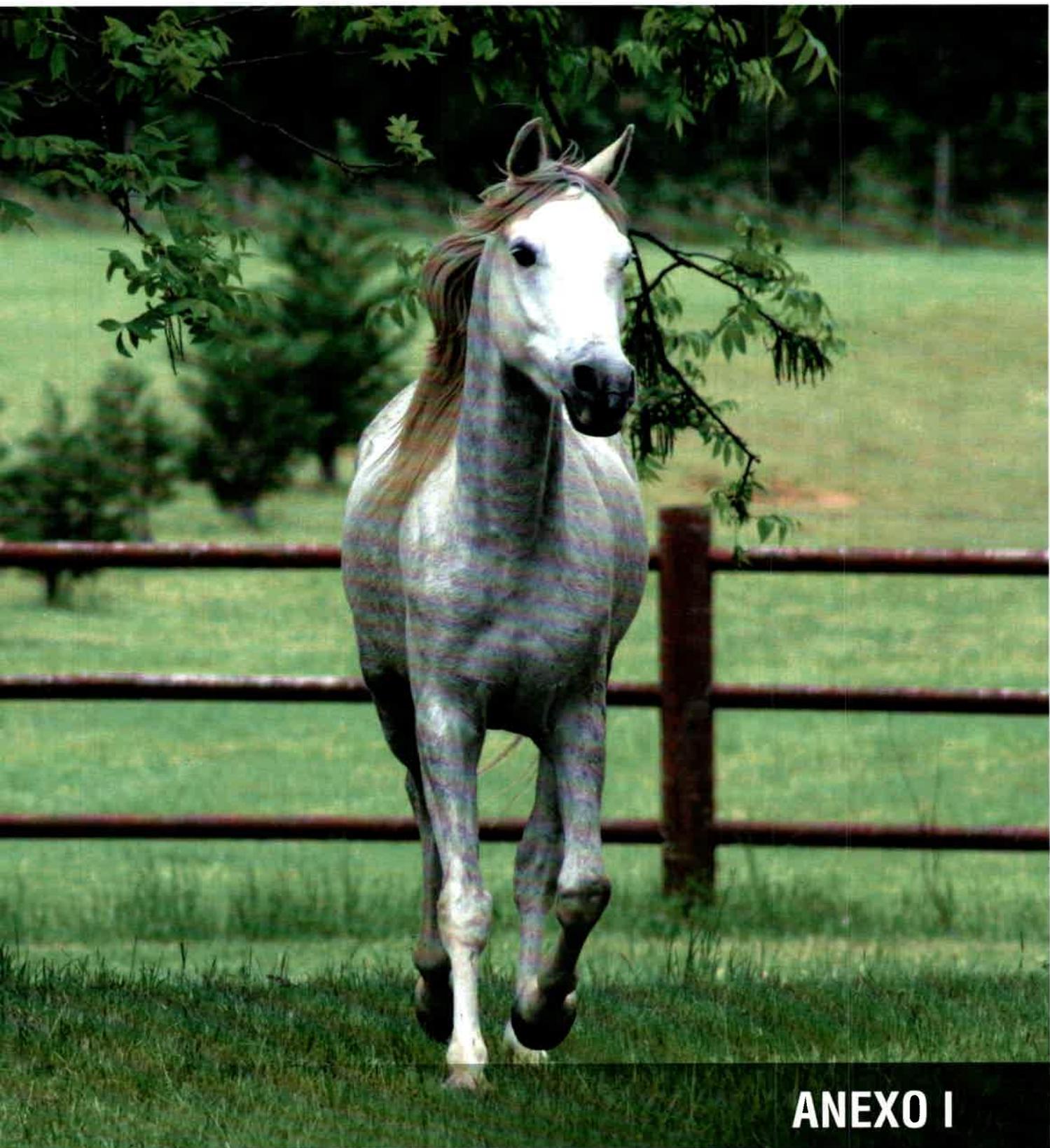
WHELLER, M.B.; NESHUTANI, J.; BUCHAM, A.M.J.; KOPIN, A.; CHEY, W.Y.; CHANG, T. LEITER, A. 1992. Identification of a transcriptional enhancer important for

enteroendocrine and pancreatic islet cell-specific expression of the secretin gene. *Molecular and Cellular Biology*. Vol 12:8:3531-3539.

WEYRAUCH,K.D.;SCHNORR,B.,GLASER,H.S.1989. Development of gastric and somastostatin containing cells in the pyloric gland region of the bovine abomasum *Acta Anat. (Basel)*. 135(3): 255-60.

XU,R.J.,CRANWELL,P.D.1991.Gastrin and fetal and neonatal pigs.*Comp. Biochem. Physiolog. B*. 98(4): 615-21.

ZABEL,M.,SURDYKZASADA,J.,LESISZ,I.,JAGODA,E.,WYSOCKA,T.,SEIDEL,J.,ZABEL-OLEJNIK,J.,GRZESZKOWEAK,J.1995.Immunocytochemical studies on endocrine cells of alimentary tract of the pig in the embryonic and fetal período of life. *Folia Morphol (Warsz)*; 54(2): 69-80.



ANEXO I

ANEXO I

Antes de hacer referencia a los pasos desarrollados en la técnica inmunohistoquímica, se considera oportuno efectuar algunas consideraciones sobre la misma. Dicha técnica se basa en una reacción antígeno-anticuerpo lo cual permite que, determinados componentes tisulares, se manifiesten o pongan en evidencia mediante el empleo de anticuerpos específicos y de moléculas marcadoras. En consecuencia, con esta técnica se pueden localizar determinantes antigénicos en las células y tejidos fijados y procesados por los métodos histológicos convencionales. Los trabajos de Avrameas (1969) y de Nakane et al. (1966) marcan un auge en la aplicación de la inmunohistoquímica. Los métodos inmunohistoquímico son considerados como uno de los más relevantes o importantes para la investigación en el campo de la histología y biología celular (Geneser,2000). Cuando un anticuerpo primario marcado reacciona en un corte histológico que posee los antígenos correspondientes, se produce una reacción entre ambos que se manifiesta a través de la revelación de la sustancia marcadora. Esto constituye el *método directo*. Cuando el anticuerpo primario que se emplea no está marcado, y reacciona en un corte histológico, al que se somete luego a la acción de un anticuerpo secundario marcado, se produce una reacción de éste contra el anticuerpo primario, y el método se denomina *indirecto*.

PROTOCOLO DE TRABAJO:

COMPLEJO AVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASA

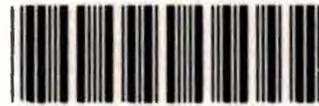
A continuación se detallan los pasos seguidos en el laboratorio para la realización de la técnica mencionada.

- 1- Colocar en portaobjetos limpios los cortes incluidos en parafina y dejar en estufa de 37 °C durante 24-48 horas.
- 2- Desparafinar e hidratar:
 - a) Dos baños en xilol de 20 minutos cada uno.
 - b) Un baño en alcohol 100°, 96°, 90° y 70° de 10 minutos cada uno sucesivamente.
- 3- Lavar con solución buffer fosfato (PBS) durante 10 minutos.

- 4- Bloquear la peroxidasa endógena de los tejidos:
 - Dos baños de agua oxigenada de 30 volúmenes al 10% en PBS de 10 minutos cada uno.
- 5- Lavar con PBS durante 10 minutos.
- 6- Bloquear adherencias inespecíficas a los tejidos:
 - Incubar con Blotto al 1% durante 30 minutos.
- 7- Lavar con PBS:
 - Dos lavados de 10 minutos cada uno.
- 8- Incubar con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C.
- 9- Dejar reposar 1 hora a temperatura ambiente.
- 10- Lavar con PBS:
 - Dos lavados de 10 minutos cada uno.
- 11- Incubar con el anticuerpo secundario durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- 12- Lavar con PBS:
 - Dos lavados de 10 minutos cada uno.
- 13- Incubar con el anticuerpo terciario durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- 14- Lavar con PBS:
 - Dos lavados de 10 minutos cada uno.
- 15- Revelar con DAB durante 30 segundos.
- 16- Lavar con agua corriente o destilada o con PBS.
- 17- Efectuar coloración de contraste o de fondo con Hematoxilina.
- 18- Montar.



U.N.R.C.
Biblioteca Central



69522

69522