**Morfovirtual 2022**

**VI Congreso virtual de Ciencias Morfológicas.**

**Sexta Jornada Científica de la Cátedra Santiago Ramón y Cajal.**

**DETERMINACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE SOMATOSTATINA EN ESTÓMAGO DE TRUCHA ARCO IRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)**

Savino Cellucci Francisco1, De Benedetti Diratchette María Agustina2, Gimenez Jalil Sabrina Ramona3, Zufiaurre Beraudo Agustin4, Mac Loughlin Roy Virginia Hebe5.

1. Ayudante de primera con dedicación exclusiva. Cátedra de Histología. Departamento de anatomía animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Rio Cuarto.
2. Ayudante de primera con dedicación exclusiva. Cátedra de Histología. Departamento de anatomía animal. Facultad de agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Rio Cuarto.
3. Ayudante de primera con dedicación simple. Cátedra de Histología. Departamento de anatomía animal. Facultad de agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Rio Cuarto.
4. Ayudante de segunda rentado. Cátedra de Histología. Departamento de anatomía animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Rio Cuarto.
5. Dra. Profesora Asociada. Cátedra de Histología. Departamento de anatomía animal. Facultad de agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Rio Cuarto.

Correo electrónico del primer autor: fsavino@ayv.unrc.edu.ar

**RESUMEN**

La trucha arcoíris es un pez teleósteo perteneciente a la familia Salmonidae. Reviste gran importante en producción acuícola y su cría, en ciertas zonas de la Argentina, representa una actividad en crecimiento. El estómago de la trucha arcoíris es rectilíneo y se lo divide en una porción distal y una proximal, la última objeto de este estudio. Histológicamente se lo divide en las cuatro túnicas típicas del aparato digestivo. Las glándulas gástricas están compuestas por un solo tipo celular, las células oxíntico pépticas, aunque tambien se pueden encontrar las células enteroendocrinas. En este estudio se evaluó la presencia y distribución de células productoras de la hormona somatostatina en estómago de trucha arcoíris. Se utilizaron muestras de truchas provenientes de cuencas lacustres de la zona de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Las muestras fueron sometidas a la técnica convencional de hematoxilina eosina y a la técnica de inmunohistoquímica. En este estudio se determinó la presencia y distribución de estas células productoras de somatostatina en las glándulas gástricas, las mismas corresponden a células enteroendocrinas de tipo cerrado. Esto permitirá aportar conocimientos básicos para futuros estudios fisiológicos del rol que cumple la somatostatina en la especie en estudio.

Palabras claves: Trucha arcoiris, estómago, Células productoras de somatostatina

**INTRODUCCION**

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la acuicultura consiste en el cultivo de organismos acuáticos tanto en zonas costeras como en el interior, lo cual implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción. (8)

El incremento de la demanda mundial de productos pesqueros, junto con la sobreexplotación de la pesca de captura, llevó a una producción acuícola mundial de 114,5 millones de toneladas en 2018, 5,5 veces más que al comienzo de la década de 1990 (FAO, 2020). Así, la contribución de la acuicultura a la producción pesquera total aumentó de 27,2% a principios de los 2000 a 46% en 2018. (8)

Argentina cuenta actualmente con dos polos importantes de producción acuícola, aunque la actividad se lleva a cabo en diversas regiones. Cada polo se corresponde con una de las principales especies; es así que en la Patagonia norte se produce la trucha, mientras que la región NEA se especializa en el pacú. También se producen carpas, tilapias, surubíes, e incluso especies marinas como moluscos bivalvos en zonas muy diversas desde la cordillera del NOA hasta el canal de Beagle en el extremo sur del país. (8)

La actividad presenta un importante potencial productivo y exportador. Uno de los factores fundamentales es la diversidad climática del país, que permite la producción de una amplia gama de especies. Son de importancia tambien la gran cantidad de ambientes disponibles para la práctica de la acuicultura y la reconocida pureza de los recursos en algunas regiones. A esto se suma el conocimiento técnico de productores e instituciones en las distintas regiones, factor fundamental si se busca un rápido crecimiento de la actividad. (8)

La producción acuícola nacional se caracteriza por su alta concentración en términos tanto de localización como de especie de cultivo. La producción de pacú y de trucha arcoíris es la de mayor representación en el total cultivado a nivel nacional: estas especies llegaron a concentrar cerca del 87% del total en 2019. (8)

El cultivo de trucha se realiza mayormente en la cuenca templada fría y cordillerana. Para la producción de semillas (ovas y juveniles, actividad también conocida como hatchery o criadero) de trucha existen actualmente cinco productores distribuidos entre las provincias de Río Negro y Neuquén. Los proveedores se encuentran cerca de los establecimientos de engorde, donde las bajas temperaturas del agua son una condición necesaria para la reproducción de la especie.

La trucha arcoiris (*oncorhynchus mykiss*), es un pez teleósteo perteneciente a la familia Salmonidae. Se caracteriza por tener el cuerpo cubierto con finas escamas y de forma fusiforme (forma de huso). La coloración varía de acuerdo al ambiente en que vive, edad, estado de maduración sexual y otros factores, como por ejemplo la influencia del ambiente en riachuelos.

La denominación de trucha arco iris se debe a la presencia de una franja de colores de diferentes tonalidades, con predominio de una franja rojiza sobre la línea lateral en ambos lados del cuerpo. Esta especie en su ambiente natural, es un pez que habita espacios acuáticos con aguas no contaminadas y cristalinas, con cauces que presentan marcados desniveles topográficos que originan rápidos, saltos y cascadas que son muy comunes en los ríos de alta montaña, son estos rápidos con una pronunciada velocidad de corriente y suelo pedregoso los más frecuentados por las truchas (6).

El estómago de la trucha arco iris es rectilíneo según la clasificación de bet-tin (1958). Trabajos realizados en esta especie dividen al estómago en dos regiones histológicamente diferentes: la parte proximal, denominada corpus, y la parte distal, denominada el píloro (3). A pesar de que se han realizado estudios morfológicos, histoquímicos y ultraestructurales de la mucosa gástrica de la Trucha arco iris, no se ha estudiado en esta especie la distribución de las células entero endocrinas que se ubican en la glándula gástrica.

Dichas células cumplen un rol importantísimo tanto en los procesos digestivos como así también en el crecimiento y desarrollo, ya que son células productoras de hormonas.

Las hormonas gastrointestinales segregadas por el tracto digestivo ejercen un gran efecto en la regulación, movilidad y crecimiento del proceso digestivo (17; 19; 26; 29). Esto refleja la importancia que las mismas revisten en diferentes etapas del individuo como el crecimiento y la reproducción (30), aunque su presencia ya se detecta en la vida fetal del humano (5), del cerdo (2), entre otras especies (9).

Se asocian en forma preferencial con determinados tejidos como epitelio, conectivo, nervioso, músculo (12) y su distribución varía a lo largo de las diferentes regiones del tracto digestivo como estómago, duodeno, yeyuno, íleon, colon o ciego (7; 11; 23; 27; 9)

Las principales hormonas gastrointestinales (gastrina, secretina, colecistoquinina, motilina, péptido intestinal vasoactivo, bombesina, colecistoquinina, somatostatina, sustancia P, entre otras) han sido demostradas en mamíferos (1) y en otras especies animales (15).

Las hormonas gastrointestinales son secretadas por células endocrinas especializadas que se distribuyen en el tracto gastrointestinal (12) determinadas inmunohistoquímica mente y cada una de ellas cumplen una función específica. Es así que la gastrina estimula la motilidad y secreción del jugo gástrico; la colecistoquinina inhibe la evacuación gástrica, favoreciendo la digestión y absorción de nutrientes en la circulación; la secretina estimula la secreción pancreática de bicarbonato; la motilina regula la motilidad gastrointestinal (20).

La somatostatina es una hormona péptida cuya principal función es modular la absorción intestinal de sustratos, ya que inhibe las funciones endocrinas, exocrinas y motoras del tracto gastrointestinal. Es posible que en forma indirecta regule la respuesta proporcional de insulina y glucagón en acuerdo a los requerimientos, oferta y disponibilidad de sustratos energéticos. Ello porque existe una compleja Inter regulación entre las tres hormonas, ejerciendo la somatostatina un efecto inhibidor sobre el glucagón e insulina, controla la liberación de las hormonas hipofisarias. Además, ejerce una acción inhibidora sobre la liberación de la hormona del crecimiento a partir de la hipófisis anterior y sobre otros péptidos funcionalmente activos, insulina, tirotropina, hormona paratiroidea y hormonas gastrointestinales. La somatostatina inhibe la secreción de distintas células, como en el caso de la inhibición de la secreción de saliva, la secreción de hormonas gastrointestinales como: gastrina, secretina, insulina, glucagón, enzimas pancreáticas (pepsina) y reduce el flujo sanguíneo esplénico. (24;25).

Si bien en los distintos grupos de vertebrados (10) y principalmente en algunos mamíferos adultos (perros, ratas, gatos, hombre, etc.) ha sido demostrada la presencia de muchas de las hormonas gastrointestinales (18), su distribución a lo largo del tracto digestivo en algunas especies como la trucha arcoiris no ha sido estudiada. El empleo de la técnica inmunohistoquímica nos permite definir la presencia de sustancias de determinados tejidos y estructuras vinculadas con el desarrollo y comportamiento normal y patológico (13- 16- 4) en el tracto intestinal. Si bien se han realizado estudios respecto a células productoras de hormonas gastrointestinales su presencia, distribución y función a lo largo del tracto digestivo en la trucha arco iris aún no se conoce con certeza.

A fin de aportar nuevos conocimientos respecto a trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) sobre la morfología del sistema digestivo y específicamente sobre la distribución de las hormonas gastrointestinales (GI) y la importancia que ellas revisten en el crecimiento y desarrollo, es de nuestro interés determinar la presencia y distribución de células productoras de somatostatina en el estómago de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

**OBJETIVO**

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia y distribución de las células productoras de somatostatina en el estómago de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

**MATERIAL Y MÉTODOS**

Se utilizaron ejemplares de trucha arcoiris adultas de ambos sexos obtenidos de distintos criaderos y cuencas lacustres de la región de Rio Cuarto, Córdoba, Argentina.

Los mismos fueron procesados inmediatamente extrayéndoles la porción gástrica (estómago); se tomaron muestras de la misma, las que fueron fijadas en formol bufferado. Posteriormente se procesaron con los métodos tradicionales de inclusión en parafina, según la técnica histológica convencional.

En primera instancia se realizó sobre estas muestras la técnica histológica convencional de hematoxilina eosina a fines de determinar la arquitectura normal del estómago de esta especie.

Luego, otra parte de las muestras fueron sometidas a la técnica de inmunohistoquímica, utilizándose como marcador anticuerpo primario anti somatostatina, como reveladores el complejo universal avidina-biotina-peroxidasa (ABC) y el substrato peroxidasa di amino bencidina (DAB).

Como base metodológica se siguieron los siguientes pasos:

•Desparafinar con xilol: dos baños de 20 minutos cada uno.

•Rehidratar con alcoholes: un baño en alcohol 100°, 96°, 90° y 70° de 10 minutos cada uno

sucesivamente.

•Inactivación de la peroxidasa endógena: dos baños de agua oxigenada (30 volúmenes) en solución

buffer fosfato (PBS).

•Lavado con PBS durante 10 minutos.

•Incubación en con suero normal de caballo al 1% durante 30 minutos.

•Lavado con PBS, dos lavados de 10 minutos cada uno.

•Incubación con el anticuerpo primario (anti NPY) toda la noche a 4°C.

•Lavado con PBS, dos lavados de 10 minutos cada uno.

•Incubación con el anticuerpo secundario biotilinado (ABC) durante 15 minutos a temperatura ambiente.

•Lavado con PBS, dos lavados de 10 minutos cada uno.

•Incubación con el anticuerpo terciario (ABC) durante 15 minutos a temperatura ambiente.

•Lavados con PBS, dos lavados de 10 minutos cada uno.

•Revelado con DAB durante 30 segundos.

•Coloración de contraste con Hematoxilina y montaje definitivo.

•Observación al microscopio óptico.

•Análisis e interpretación de los datos obtenidos.

•Obtención de microfotografías.

**RESULTADOS**

En la Figura 1 se observa un corte de estómago de trucha arcoiris sometido a la técnica histológica convencional de hematoxilina eosina. En la misma se pueden observar las cuatro túnicas que conforman el tubo digestivo. Se puede apreciar la mucosa gástrica formada por un epitelio de tipo cilíndrico simple, la lámina propia de tejido conectivo laxo, la misma se caracteriza por la presencia de glándulas gástricas, la muscular de la mucosa; luego le sigue la túnica submucosa de tejido conectivo denso, la túnica muscular compuesta por tejido muscular de tipo liso y la túnica serosa formadas por un tejido conectivo laxo y un mesotelio.

El análisis e interpretación de las preparaciones histológicas obtenidas y sometidas a la técnica de inmunohistoquímica demostraron la presencia de células productoras de somatostatina.

En la Figura 2 se aprecia, con aumento de 100x, la presencia de una célula positiva a somatostatina en el epitelio glandular del estómago de la trucha arcoíris. La misma reveló una marcación intensa.

En la figura 3 se observa, con aumento de 100 x, la inmunoexpresión de una célula productora de somatostatina en el epitelio glandular del estómago.

Morfológicamente estas células presentaron forma triangular, un solo núcleo ubicado hacia la región basal, en el citoplasma celular se observaron gránulos citoplasmáticos de distribución homogénea y de intensa marcación. Las células entero endocrinas encontradas en este estudio pertenecen al tipo celular “cerrado” ya que la cara apical de la célula no contacta con la superficie mucosa.

**DISCUSION**

La somatostatina es una hormona que reviste una gran importancia en los procesos digestivos, tanto en la trucha como en otras especies animales.

Con relación a la tinción de H/E, los resultados obtenidos respecto a la arquitectura histológica del estómago de trucha arco iris, fueron similares a los descritos en otros estudios en peces (22).

Investigaciones realizadas en esta misma especie por *Ostos Garrido et al.* (22) establecen que las células entero endocrinas se encuentran ubicadas en el tejido conectivo de la lámina propia, entre las glándulas gástricas, sin embargo, en nuestro estudio se pudo comprobar la presencia y distribución de las células productoras de somatostatina en el epitelio glandular no así en el tejido conectivo.

Se han encontrado células productoras de somatostatina en estómago de mojarras (*Astyanax Bimaculatus)* las cuales fueron observadas tanto en la parte glandular como en la zona no glandular. Además, pudieron determinar la presencia de dos tipos de células entero endocrinas: las “tipo abierta” con los ápices en la superficie mucosa, y las “tipo cerrada”, en donde los ápices no contactan con la mucosa, según lo expuesto por *Nathalia Das Neves Cardozo et al. (21).* Nuestras investigaciones en trucha arcoiris, revelan la presencia de células de forma triangular, con un solo núcleo ubicado hacia la región basal, en el citoplasma celular se observaron gránulos citoplasmáticos de distribución homogénea y de intensa marcación que corresponden a células de “tipo cerrado” cuya ubicación es en la zona glandular del estómago.

Según lo expuesto por *Tagliaferro et al*. (28) a nivel glandular estas células productoras de somatostatina aparecen en menor número y poseen una forma triangular u oval, lo cual concuerda con nuestros hallazgos.

**CONCLUSIÓN**

En este estudio se pudo comprobar con la técnica de inmunohistoquímica la presencia y la distribución de células productoras de somatostatina dentro de las glándulas gástricas en estómagos de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss).*

La inmunomarcacion de las mismas revelaron células de forma triangular, con un solo núcleo ubicado hacia la región basal, en el citoplasma celular se observaron gránulos citoplasmáticos de distribución homogénea y de intensa marcación que corresponden a células de “tipo cerrado” cuya ubicación es en la zona glandular del estómago.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Alumets, J. and Hakanson,R. (1977) Distribution ontogenic and ultrastructure of somastotanininmunoreactive cells in the pancreas and gut. Cell Tis. Res. 185: 465-479.
2. Alumets,J. and Sundler,F. (1983) Ontogenic of endocrine cells in porcine gut and pancreas. Gastroenterology. 85: 1372-1395.
3. Barrington, E.J.W.. (1957). The alimentary canal and digestion. In: M.E. Brown (Editor), The Physiology of Fishes, Vol. I. Academic Press, Inc., New York, pp. 109-I 6 1.
4. Boenisch, T.2002.Controles. 3ed Manual Métodos Inmunohistoquímicos de Control. DAKO Corporation.,Carpintería, California.Gastroenterology, 85: 1372-1395. 32-33.
5. Bryant, M.G. and Boom, S.R. (1982) Development of intestinal regulatory peptides in the human fetus. Gastroenterology 83: 47-54.
6. Camacho B., E., M. Moreno R., M. Rodríguez G., C.Luna Romo y M. Vásquez. (2000). Guía para el cultivo de trucha. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México D.F. 135 p.
7. Capella, C.; Solcia, E. and Vasallo, M. (1996) Identification of six types of endocrines cells in gastrointestinal mucosa of the rabbit. Arch. Histol. Jap. 30: 479-495.
8. Carciofi I; Rossi L. Acuicultura en Argentina: Red de actores, procesos de producción, y espacios para el agregado del valor. En búsqueda del impulso exportador para los productos acuícolas. 2021. Series de documentos para el cambio estructural. ISNN 2718-8124.
9. Dauria P; Castagnino R, Mac Loughlin V, Sona L, Bonino F. (2012). Identificacioninmunohistoquimica de motilina en duodeno de fetos de caballo en diferentes etapas del desarrollo. Primer Congreso Virtual de Ciencias Morfológicas.. Primera Jornada Científica de la Cátedra Santiago Ramón y Cajal. Morfovirtual 2012. Cuba disponible online.
10. Dauria,P.; Castagnino,R.; de la Cruz, J-; Sona,L.; Ibáñez,N. and Paz, A. (1999). Presence of gastrointestinalhormones (gastrin) in theatherine. Biocell, 23 (1): 57-58.
11. Díaz de Rada, O.(1992) Endocrine cells and nerves in the stomach of the lizard Podarcishispanica detected by inmunocytochemistry Tissue and Cell 24: 705-713.
12. Ferri, G.L.; Adrian,T.E. and Ghatel, M.A. (1983) Tissue localization and relative distribution of regulatory peptide in separated layers from the human bowel. Gastroenterology 84: 777-786.
13. Field, A. (1984). Technical aspects of inmunocytochemistry and its application in routine histopthalogyc.Histologic: 3: 211-213.
14. Gázquez Ortiz y Blanco Rodríguez, (2004). Tratado de Histología Veterinaria. Cap.11:260-279. 1° ed. Editorial Masson, S.A.).
15. Gimenez Jalil S, SagripantiCenteno G, Mac Loughlin Roy V, DauríaMaglione P, Ponce Gallardo S. (2016). Determinacion inmunohistoquímica de células productoras de secretina en duodeno de iguana overa (Salvatormerianae). Morfovirtual 2016.
16. Gimeno, E. and Massone, A. (1989). Técnicas inmunohistoquímicas en patología veterinaria: aspectos teóricos y prácticos. Veterinaria Argentina, 6:332-339.
17. Grube, D. and Forsmann, W. (1979) Morphology and function of the enteroendocrine cells. Hormone Metab. Res. 11: 589-606.
18. Hoyle Charles H.V. (1999). Neuropeptide families and their receptors: evolutionary perspectives1. ElsevierScience. 848: 1-25.
19. Kitamura, N.J. and Yamashita, T. (1984) Inmunocitochemical distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the horse. EquineVet. 1. 16: 103-107.
20. León, A. S. (1991) New Technologies for the surgical pathologist. J.Med. Lab. Sci. 4: 45-48.
21. Nathalia Das Neves Cardozo. (2015). Histochemical and inmunohistochemical study on endocrine cells (5HT, GAS, and SST) of the gastrointestinal tracto of a teleost, the characin *Astyanax bimaculatus*. Acta Histochemica.
22. Ostos Garrido, MI; Nuñes Torres and Abaurrea Equisoain. 1993. Histological, Histochemical and ultraestructural análysis of the gastric mucosa in Oncorhynchus mykiss. Aquaculture, 115 (1993). 121-132. Elsevier Science Publishers BV. Amesterdam.
23. Peranzi, G. and Lehy,T. (1984) Endocrine cells populations in the colon and rectum of cat, dog and monkey fine structure, inmunocytochemistry and distribution. Anat. Rec. 240: 87-100.
24. Reichlin S. 1983. Somatostatin. N Engl J Med 309: 1495-1563.
25. Reichlin Seymour. 1986. Somatostatin. Plenum Publishing Corporation 30: 405-425
26. Rizzotti, M. and Castaldo, L. (1981) The endocrine cells of the piloric gland of adult Ox. Basic Appl. Histochem. 24: 33-52.
27. Scopinaro,F.; De Vincentis, D. and Varvarigou, A. (2005) Use of bombesin in humans. Journal Clinical Oncoloy 23: 3170-3171.
28. Tagliaferro G. (1989). Distribution of somatostatin and glucagón inmunoreactive cells in the gastric mucosa of some cartilaginous fishses. General and comparative endocrinology. 75, 1-9.
29. Toullec, R. and Bernard, C. (1992) Early-life patterns of plasma gut regulatory peptide levels in calves. Effects of age, weaning and feeding. Comp. Biochem. Physiol. 102 A: 203-209.
30. Uvnas-Moberg, K. (1999) El tracto gastrointestinal durante el crecimiento y la reproducción. Investigación y Ciencia. 48-54.

**ANEXOS**

Figura 1- Microfotografía de la región proximal del estómago. E: epitelio. LP: lámina propia. MM: muscular de la mucosa. SM: túnica submucosa. M: túnica muscular. S: túnica serosa. Tinción hematoxilina /eosina.10x.

Figura 2- Inmunoexpresión de célula positiva a somatostatina *(flecha*). GG: Glándula gástrica. LP: Lamina propia. Estomago de trucha arco iris.100x.

Figura 3- Inmunoexpresión de célula positiva a somatostatina (*flecha*). GG: Glándula gástrica. LP: Lamina propia. Estómago de truca arco iris. 100x.