

DETERMINACION INMUNOHISTOQUÍMICA DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE SECRETINA EN DUODENO DE IGUANA OVERA (*Salvator merianae*).

Sabrina Ramona Gimenez Jalil¹, Graciela Esther Sagripanti Centeno², Virginia Hebe Mac Loughlin Roy³, Pascual Guillermo Dauría Maglione⁴, Sergio Fernando Ponce Gallardo⁵

¹ Licenciada en Ciencias Biológicas, Adscripta Histología-FAV. UNRC. Río Cuarto. Argentina

² Histotecnóloga, Histología-FAV.UNRC-Río Cuarto-Argentina.

³ Doctora, Prof Adjunta exclusiva, categoría V, Histología-FAV.UNRC-Río Cuarto- Argentina.

⁴ MSC, Prof Asociado Exc, categoría III, UNRC- Río Cuarto- Argentina

⁵ Ayudante de Segunda, Histologia UNRC- Río Cuarto- Argentina

Correo electrónico del primer autor: sgimenezj@gmail.com

RESUMEN

El lagarto overo o iguana overa (*Salvator merianae*) es una especie de lagarto de la familia Teiidae. Uno de los aspectos ha considerar, a fin de aportar nuevos conocimientos respecto a esta especie, fue el sistema digestivo y específicamente las hormonas gastrointestinales (GI). Las mismas son secretadas por células endocrinas que se distribuyen a lo largo del tracto gastrointestinal ejerciendo un gran efecto en la regulación, movilidad y crecimiento del sistema digestivo como así también sobre las emociones y la conducta. Objetivos: describir la arquitectura histológica del duodeno, determinar a través de la técnica inmunohistoquímica la presencia de células productoras de secretina. Para ello se utilizaron dos crías de iguana overa del Criadero "El quebracho" de Agua de Oro (Cba). Se tomaron muestras de duodeno, las mismas fueron fijadas en formol bufferado al 10 %, incluida en parafina y procesada mediante la técnica

histológica convencional H/E. La detección de células S se realizó por técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos comerciales. Resultados: las tinciones de hematoxilina eosina permitieron describir la arquitectura histológica del órgano. La inmunoeexpresion de secretina se observa en el epitelio. Se concluye, que la morfología del duodeno de la iguana overa responde al patrón estructural básico observado en algunos reptiles. En esta especie animal se determino la presencia de células S en el tejido epitelial.

PALABRAS CLAVE:

IGUANA OVERA-DUODENO-INMUNOHISTOQUIMICA-HORMONA-CÉLULAS S

INTRODUCCIÓN

El género *Tupinambis* actualmente *Salvator* se distribuye ampliamente al este de los Andes, en gran parte de América del Sur. Actualmente se reconocen seis especies del género (*T. duseni*, *T. longilineus*, *T. merianae*, *T. quadrilineatus*, *T. rufescens* y *T. teguixin*). La especie *Salvator merianae*, es conocida vulgarmente como lagarto o iguana overa.

El aparato digestivo de los vertebrados superiores, especialmente el de los mamíferos, se encuentra ampliamente estudiado, sin embargo existen pocos estudios referidos a aquellos animales que les preceden en la escala evolutiva, como los peces, anfibios y reptiles (14). El sistema digestivo de los reptiles, contiene todas las estructuras presentes en otros vertebrados superiores, desde la cavidad oral hasta la cloaca (8).

En los reptiles el intestino es, en general, corto y en el tercio más cercano al estomago desembocan los conductos provenientes de las glándulas digestivas (hígado y páncreas). A la región proximal (duodeno) le sigue una región distal (ileon), con funciones de absorción. El intestino grueso tiene como principal función la absorción de agua y desemboca por el recto en el coprodeo, (porción ventral de la cloaca). Esta es una estructura común al aparato digestivo, urinario y reproductor. La abertura de la cloaca al exterior, en los escamados, es transversal mientras que en los cocodrilos es longitudinal (17; 4).

El intestino delgado del reptil puede ser muy plegado, como ocurre en las tortugas, o relativamente recto como lo es en las serpientes (19). La mucosa muestra vellosidades y las criptas intestinales poco desarrolladas en la mayoría de las especies que pueden llegar a estar ausentes (15). El epitelio de revestimiento del intestino delgado posee células de absorción columnares (cilíndricas) y células caliciformes. Por debajo del epitelio se encuentra la lámina propia, de tejido conectivo laxo, en algunas especies las glándulas o criptas intestinales están poco desarrolladas, en otras especies, suelen estar ausente (15). La capa muscular de la mucosa, se aprecia muy delgada y está constituida por una sola capa de células. La submucosa separa la túnica mucosa de la túnica muscular. Esta última, se constituye de fibras musculares lisas. Finalmente, la serosa, conforma la túnica más externa. Más allá del duodeno craneal, resulta dificultoso diferenciar las regiones del intestino delgado (8).

El tracto gastrointestinal contiene una amplia variedad de células endocrinas, denominadas colectivamente sistema "APUD" (Captación y Descarboxilación de los Precusores de grupos Amino), concepto introducido por Pearse en 1968. Actualmente denominadas células del sistema enteroendocrino difuso (DNES) (9). Las células endocrinas del tubo digestivo presentan forma triangular, ovalada o de pera, se caracterizan por numerosos gránulos secretores, comúnmente concentrado en la región infra nuclear (20).

La presencia de las principales hormonas gastrointestinales tales como gastrina, secretina, colecistoquinina, motilina entre otras, ha sido demostrada sobre todo en mamíferos y en algunas especies de peces. Estas hormonas están acompañadas, a lo largo del tracto digestivo, por otras no menos importantes cuya función no es del todo conocida, como ocurre con el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la sustancia P, somatostatina, cromogranina y el neuropéptido Y. Además, las mismas se distribuyen en diferentes porciones del tracto digestivo como el estómago, duodeno, yeyuno, íleon, colon y ciego (7).

La secretina fue la primera sustancia clasificada como hormona gastrointestinal. Es un péptido lineal de 27 aminoácidos, relacionada estructuralmente con el péptido intestinal vasoactivo, el péptido inhibidor gástrico, la gastrina y el factor hipotalámico liberador de la hormona del crecimiento. Esta sustancia es liberada por las células endocrinas de la mucosa del intestino delgado (células S) como respuesta a la acidificación de la mucosa antral. La secretina y el glucagón inhiben la liberación de gastrina, mientras que las catecolaminas estimulan su descarga (22).

Las células S se encuentran localizadas en el intestino delgado, en concreto en el duodeno. Son las encargadas de producir secretina la cual estimula a las células secretoras del sistema de conductos excretores del páncreas para la liberación de jugo pancreático (elevado contenido en bicarbonato y agua, pero escasas enzimas). Asimismo, estimula la secreción de bicarbonato por la bilis (18).

La técnica inmunohistoquímica permite identificar a las células productoras de dicha hormona. Esta técnica consiste en detectar y localizar antígenos (Ag) in situ (cortes de tejido, extensiones celulares e incluso pequeños organismos u órganos in toto) utilizando anticuerpos (Ac) que reconocen específicamente a ese Ag (2).

A fin de aportar nuevos conocimientos respecto a *Tupinambis merianae*, uno de los aspectos a tratar es el sistema digestivo y específicamente las hormonas gastrointestinales. Es por ello que es objetivo de este trabajo describir la arquitectura histológica del intestino y determinar la presencia y distribución de la hormona gastrointestinal secretina en el duodeno de *Tupinambis merianae* mediante inmunohistoquímica (IHQ).

Los datos obtenidos en el mismo colaboraran a llenar el vacío proporcionado por la falta de datos biológicos y morfológicos en *T. merianae*, consolidar la línea de investigación sobre la morfología, y contribuir a la preservación de las especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 2 (dos) crías de iguana overa (*Salvatore merianae*) las cuales fueron obtenidas del Criadero "El quebracho" de Agua de Oro (Provincia de Córdoba) a finales de marzo principio de abril; ya que el período de cortejo y cópula se extiende desde octubre hasta noviembre y las crías nacen en el mes de Febrero (3). Las mismas fueron procesadas y se les extrajo las correspondientes muestras de intestino, y se fijaron en formol bufferado al 10%, para su posterior procesamiento por la técnica histológica convencional, y otra parte de las muestras serán sometidas a la técnica de inmunohistoquímica.

Las muestras fueron fijadas con formol neutro tamponado, posteriormente las mismas se deshidrataron con baterías de alcoholes de graduación creciente (70%, 96%, 100% y Benceno) para luego ser incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 4 μm de espesor, los cuales se obtuvieron mediante el uso de un micrótomos de deslizamiento, se los estiró en baño histológico y se montaron en los portaobjetos.

Parte de las muestras fueron teñidas con hematoxilina-eosina para la observación de las estructuras histológicas. Para la determinación de secretina el resto de las muestras fueron procesadas por la técnica de estreptoavidina-peroxidasa, esta última se realizó de la siguiente manera: las secciones del tejido se desparafinaron en xileno y alcohol-xileno durante 15 minutos en cada uno y se hidrató en soluciones de alcohol decreciente (alcohol 100%, 96%, 80% y 70% respectivamente), luego se sometieron a un baño en PBS (tampón fosfato salino pH 7,2). Más tarde, se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena añadiendo peróxido de hidrógeno al PBS (H_2O_2 de 30 volúmenes diluidas en PBS 1/10) durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se lavó con PBS durante 10 minutos. Luego los preparados fueron cubiertos con solución de bloqueo de los sitios de unión inespecífica (suero de caballo dilución 1/100: 50 μl de suero en 5000 μl de PBS) y se incubaron en una cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente. Poco después, se agregó el anticuerpo primario (Anti-secretina Rabbit Anti-secretin (chicken) ICH 7313, dilución de 1:800 en PBS), los preparados se incubaron durante 24 horas en una cámara húmeda a 4° C. Transcurrido el tiempo se los lavó con PBS durante 10 minutos y se les añadió el anticuerpo secundario anti-IgG biotinilado (link del kit cell marque) y se incubaron durante 10 minutos en una cámara

húmeda a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se lavo con PBS y se coloco el reactivo avidina-peroxidasa (Label del kit cell marque) seguido de incubación durante 30 minutos a cámara húmeda a temperatura ambiente. La reacción se desarrolló utilizando una solución de Diaminobencidina (DAB) en agua. Posteriormente se lavo los portaobjetos con agua corriente y contra-tinción con hematoxilina. Los portaobjetos se deshidrataron en alcoholes el aumento de (70%, 80%, 96%, y 100), se aclaró en alcohol-xileno y luego en xileno, luego se realizo el montaje.

Los resultados obtenidos por las técnicas descriptas serán evaluados bajo microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania). Se efectuó un registro fotográfico de los mismos mediante una cámara digital powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) incorporada al microscopio óptico.

Los resultados obtenidos por medio del estudio inmunohistoquímico se expresaron, en forma cualitativa, según la siguiente clasificación:

Reacción intensa: (+++) Reacción moderada: (++) Reacción débil: (+)

Reacción negativa: (-)

RESULTADOS

En la fig. 1 se destacan las cuatro túnicas básicas del aparato digestivo, la túnica mucosa se observa plegada, dichos pliegues constituyen las vellosidades; la túnica submucosa; la túnica muscular constituida por dos capas de fibras musculares y por último observamos la túnica serosa.

En la fig. 2, se visualizan, a mayor aumento, los componentes de las diferentes túnicas. La túnica mucosa destaca la presencia de vellosidades, las cuales se hallan revestidas por un epitelio cilíndrico simple, entre el que se intercalan abundante cantidad de células caliciformes. Las glándulas intestinales se encuentran ausentes. La lámina propia, rica en vasos sanguíneos, se proyecta en las vellosidades conjuntamente con haces musculares de la muscular de la mucosa. La túnica submucosa se presenta constituida por tejido conectivo denso. La túnica muscular, de músculo liso, se dispone en una capa circular interna y una longitudinal externa. La túnica serosa conserva las características descriptas en las otras porciones del tubo digestivo.

En la fig 3 se aprecia la túnica mucosa a mayor aumento, compuesta por un epitelio cilíndrico simple con presencia de células caliciformes. No se observan glándulas intestinales. La lamina propia de tejido conectivo se proyecta en las vellosidades, en las mismas se pueden observar vasos sanguíneos.

En la fig. 4 muestra la inmunoexpresión de una célula productora de secretina, la misma se hallan localizadas entre las células del revestimiento epitelial. Esta célula S presenta forma ovalada, núcleo desplazado hacia la región basal y gránulos distribuidos, preferentemente, en la zona apical. Teniendo en cuenta que su extensión se orienta hacia la luz del órgano, se la puede clasificar como de tipo abierto.

DISCUSIÓN

En este estudio la arquitectura del órgano de esta especie animal presenta patrones similares a los descritos tanto en humanos (19) y como así también en otras especies animales (10), el duodeno de *Salvatore merianae* presenta las cuatro tunicas básicas del aparato digestivo.

En el duodeno, las estructuras se mostraron uniformes a lo largo de toda su longitud. La mucosa intestinal se observó revestida por un epitelio cilíndrico simple (enterocito) a diferencia del columnar estratificado descrito por Reese en 1913 en cocodrilos. A diferencia de los mamíferos, en iguana overa no se observaron las glándulas intestinales en la lámina propia coincidiendo ello con lo hallado por Patt y Patt, 1969 y Andrew, 1959. En el epitelio de revestimiento del intestino; además de las células columnares de absorción (enterocitos), se identificaron células caliciformes. La distribución topográfica y la estructura de dichas células fueron similares a lo descrito por Luppa (1977), a diferencia de Reese (1913), en el cual no se observaron células caliciformes. Los restantes componentes de la túnica mucosa (lámina propia, y muscular de la mucosa) como el resto de las

túnicas que conforman la pared intestinal (submucosa, muscular y serosa), coincidieron con lo descrito en cocodrilos (11; 8).

En cuanto a secretina, se identificaron células S en duodeno. Dichas células se encontraron intercaladas entre las células epiteliales y evidenciaron una marcación intensa, mostrando diferentes formas y tamaños. La mayoría reveló una forma alargada y núcleo desplazado, lo cual coincidió con lo descrito en individuos adultos de diferentes especies, ya que se mencionan formas que varían de redonda a piramidal en humanos (19; 23); redonda, ovalada, de huso y triangular en caballos adultos (5); y piramidal en otras especies domésticas y salvajes (12; 6 ; 5). 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 (5; 10; 7). Asimismo, en este estudio, se observaron células S con un citoplasma de apariencia homogénea, coincidiendo con lo citado en humanos (24).

CONCLUSIONES

En este estudio a través de la técnica histológica convencional de hematoxilina/eosina, se logró determinar la arquitectura del duodeno de de iguana overa (*Salvatore merianae*) el cual presenta las cuatro túnicas básicas del aparato digestivo. Histológicamente se señala con particularidad la ausencia de glándulas intestinales. Con la técnica de inmunohistoquímica se determinó la presencia de células S. Las mismas se encontraron entre las células epiteliales de revestimiento. Las formas halladas fueron principalmente alargada, similares a las descritas en mamíferos.

BIBLIOGRAFÍA

1- ANDREW, W., (1959). Textbook of comparative histology. 1st edition, New York: Oxford University Press.

2-BADIA, L. RUIZ, F. GONZALES, C. (2009). "Técnicas en Histología y Biología Celular". Elsevier España, S.L

3-BOLKOVIC, M.L y RAMADORI, D. (2006). "Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina. Programa de uso sustentable" Dirección de Fauna Silvestre, Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires. 168 pags + 8 ilust.

4- BARTEN S. (1996). Shell damage. In: Mader DR (ed). Reptile medicine and surgery. Toronto: WB Saunders. p 413- 417.

5-CECCARELLI, P. PEDINI, V. y GARGIULO, A. (1995). The endocrine cells in the gastro-enteric tract of adult fallow deer (Dama dama L.). Anat. Histol. Embryol. Blackwell WissenschaftsVerlag. Berlín. 24, 171-174.

6-DALL'AGLIO, C.; SCOCCO, P.; CECCARELLI, P. Y PEDINI, V., 1998. Neuroendocrine Cells in the Gastrointestinal Tract of Wild Boar. Anat. Histol. Embryol. 27, 381-385.

7-DAURIA, P. CASTAGNINO, R. MAC LOUGHLIN, V. SONA, BONINOS, F. (2012). "Identificación inmunohistoquímica de motilina en duodeno de fetos de caballo en diferentes etapas del desarrollo.

8-ELLIOT, J.R. (2007). "Overview of Reptile Biology, Anatomy, and Histology. Infectious Diseases and Pathology of Reptiles" Brooklyn, New York, Taylor y Francis Group: 1-25.

9- GARNET, L. y HIATT, J. (2011). "Atlas en color de Histología." 5ª edición. Editorial médica panamericana, cap 14, pp 292-293.

10-GAZQUEZ ORTIZ A y BLANCO RODRIGUEZ A. (2004). Tratado de Histología Veterinaria. Editorial Masson, S.A, 1° edición. cap.11:260-279.

11-HOLMGREN, S. y NILSSON, S. (1993) "Bombesin, gastrin/CCK, neurotensin, somastotatin and VIP immunoreactivity in the gut of elasmobranch, *Squalus acanthias*. Cell Tissue Res. 234(3): 595-618.

12- KITAMURA, N., YAMADA, J., YAMASHITA, T. y MISU, M. (1982b). Endocrine cells in the gastrointestinal tract of the cat as revealed by various staining methods."Nippon Juigaku Zasshi 44(3): 427-31.

14- LACAVE MARTIN, I, (1978). "Estudio Histológico Comparado del Intestino delgado en la familia Lacertidae (clase reptilia)".Universidad de Sevilla.Tesis doctorales.Disponible en <http://fondosdigitales.us.es/tesis/tesis/1384/estudio-histologico-comparado-del-intestino-delgado-en-la-familia-lacertidae-clase-reptilia/>

15- LUPPA, H. (1977). Histology of the digestive tract,Biology of the Reptilia. Gans, C. and Parsons, T.New York, Academic Press. Vol 6: 225-313.

17- MENEGHEL, M. (2006) "Curso: biología animal. Reptilia" Disponible en <http://zvert.fcien.edu.uy/reptiles.pdf>

18-ORTEGA LOPEZ, D. (1995). "Estudio del comportamiento secretor de las hormonas gastrointestinales implicadas en la motilidad vesicular de la coledoclitiasis." Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

19-PARSONS, T. y CAMERON, J. (1977). "Internal relief of the digestive tract". Biology of the reptilian. Parsons, T y Gans, C. New York, Academic Press Vol 6: 159-223

20-PATT, D. I. y PATT, G. R. , 1969. Comparative Vertebrate Histology.,1st edition,New York: Harper & Row.

19- REESE, A. (1913). The histology of the enteron of the Florida alligator.*Anatomical Record*, 7, 105-129.

19-ROSS M y PAWLINA W. (2012). Histología "Texto y Atlas color con Biología celular". 5º edición.Editorial Panamericana, Cap. 16: 518-661.

20-SANTOS G y ZUCOLOTO S. 1996. Células endócrinas gastrointestinais: breve histórico e principais métodos de identificação à microscopia óptica. *Arq Gastroenterol* 33: 36-44.

22-TORRES GALAN, J.(1995) "Estudio inmunocitoquímico de la gastrina en el perro. Determinación de sus variaciones fisiológicas en suero mediante radioinmunoensayo". Universidad complutense de Madrid. Facultad de veterinaria.

23- UCSG -Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. (2007). Sistema endocrino: célula endocrina y especialización tisular disponible en:<http://www.bibli/2007/inernet/histolog/c3/ada/estructura/celu.htm>. [on line].

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

ANEXOS



Figura 1- Microfotografía de duodeno de iguana overa.. E: epitelio. Mucosa. SM: túnica submucosa. M: túnica muscular. S: serosa. Tinción H/E. 2,5x.

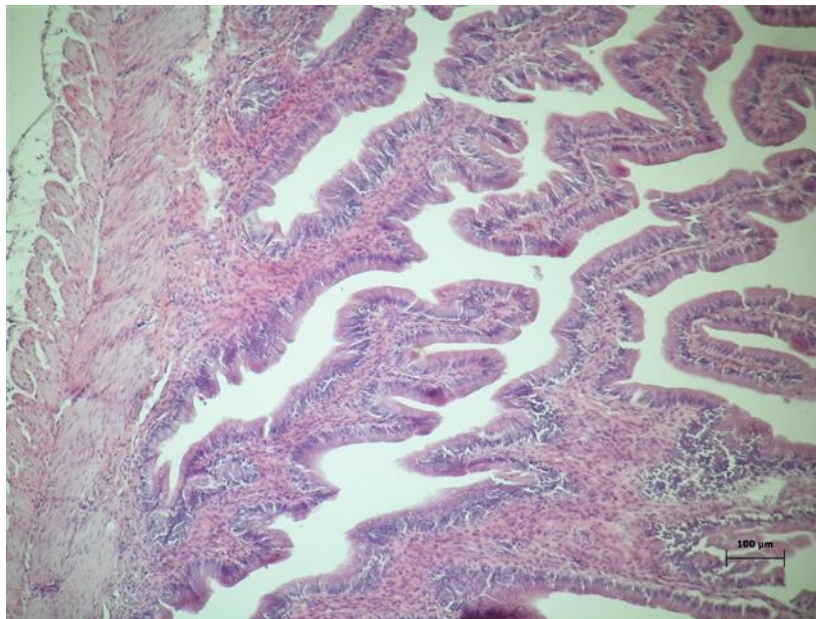


Figura 2- Microfotografía de duodeno de iguana overa. E: epitelio. V: vellosidades. MM: muscular de la mucosa. SM: túnica submucosa. M: túnica muscular. S: túnica serosa. Tinción H/E. 10x

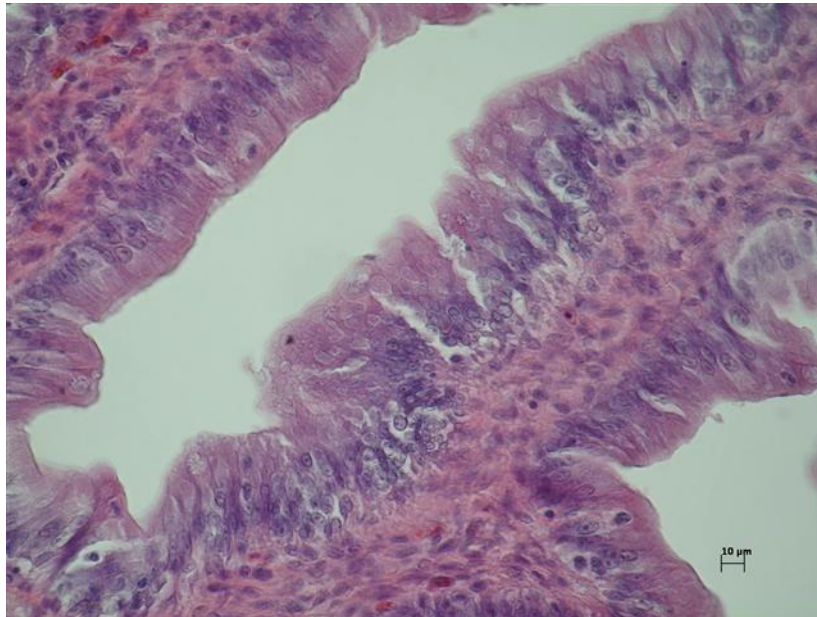


Figura 3- Microfotografía de duodeno de iguana overa. E: epitelio. V: vellosidades. CC: célula caliciforme. LP: lámina propia. Tinción H/E. 40x.

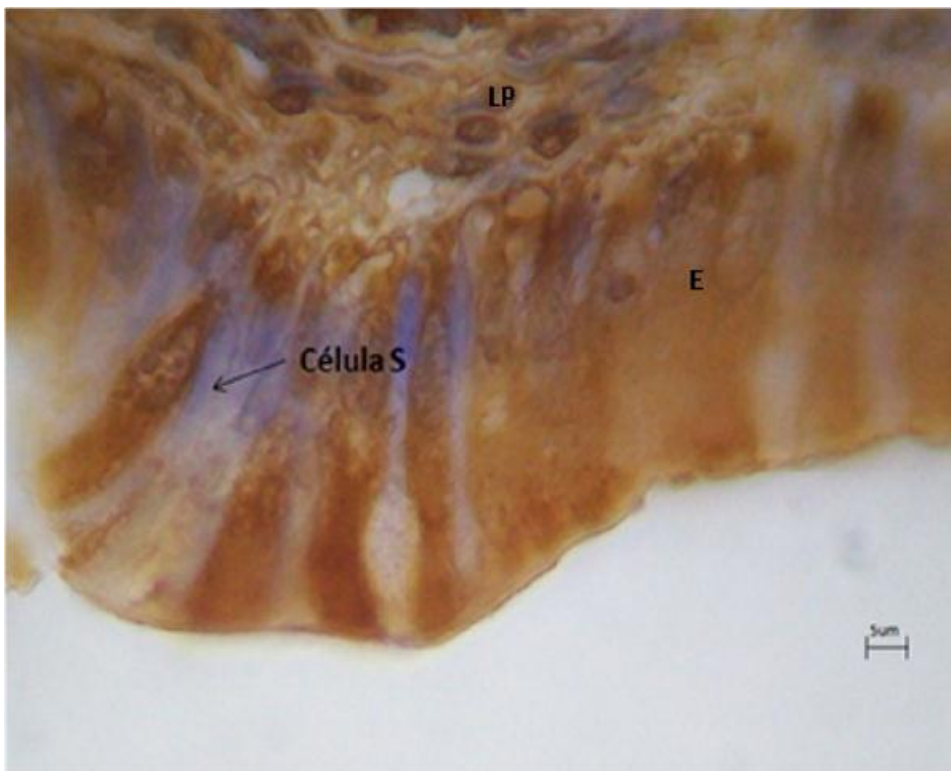


Figura 4- Microfotografía de duodeno de iguana overa. Inmunoexpresión de célula positiva a secretina (+++) Células S (flecha), E: epitelio. LP: lamina propia. 100x.