

NEUROPEPTIDO Y (NPY): DETERMINACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA EN DUODENO DE FETOS DE CABALLO EN LA ETAPA INTERMEDIA DE LA GESTACIÓN

NEUROPEPTIDE Y (NPY): IMMUNOHISTOCHEMICAL DETERMINATION IN DUODENUM OF INTERMEDIATE STAGE OF HORSES FETUSES

Pascual Guillermo DAURIA; Virginia Hebe MAC LOUGHLIN; Emerson Valentín RINALDI; Graciela Esther SAGRIPANTI; Sabrina GIMÉNEZ; Liliana Ángela SONA; Facundo Ubaldo BONINO; Osvaldo Esteban NAVARRO; Ramiro Andrés MARTÍNEZ

Cátedra de Histología. Departamento de Anatomía Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto.

RESUMEN.

Las hormonas regulan diferentes funciones del organismo entre las que se incluyen aquellas vinculadas con el aparato digestivo, lo que resulta interesante por la asociación de éste con distintas etapas del desarrollo del individuo. Para poder aportar nuevos conocimientos, muchos son los aspectos a considerar como por ejemplo el estudio de las sustancias químicas involucradas en el proceso alimentario, como las hormonas gastrointestinales. El objetivo es determinar la presencia de Neuropeptido Y (NPY) en duodeno de fetos de caballo en etapas intermedias del desarrollo. Se utilizaron fetos correspondientes a etapas intermedias de la gestación (periodo G2) obtenidos del frigorífico Aimar-Río Cuarto. Se tomaron muestras de duodeno que fueron fijadas en formol bufferado incluidas en parafina y procesadas con la técnica histológica convencional. Para la determinación del NPY se utilizó la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpos comerciales. En las muestras de fetos de periodo G2 se observó la presencia de NPY tanto en epitelio de revestimiento intestinal como en el interior de las glándulas intestinales. El NPY está presente en duodeno, tanto en los enterocitos del epitelio de revestimiento como en las glándulas intestinales. Este hallazgo permitirá aportar conocimientos básicos para futuros estudios fisiológicos relacionados con el rol que cumple el NPY en la especie en estudio.

Palabras claves: NPY, inmunohistoquímica, duodeno, fetos, caballo.

ABSTRACT.

The hormones control different functions of the organism, including those linked with the digestive system. This is interesting because of its association with different stages of individual development. To generate new knowledge, there are many aspects to consider on the digestive system, especially the chemicals involved in the food intake, such as gastrointestinal hormones. The objective of this paper is to determine the presence of neuropeptide Y (NPY) in the duodenum of horse fetuses at intermediate stages of development. Fetuses corresponding to the period of gestation G2 obtained from the refrigerator Aimar -Río Cuarto were used. Duodenum samples were fixed in buffered formalin and embedded in paraffin and processed by conventional histological technique. Immunohistochemical technique with commercial antibodies were used for the determination of NPY. In samples from fetuses at intermediate stage of development (G2) the presence of NPY in intestinal epithelium and intestinal glands was observed. Neuropeptide Y is present in duodenal villous enterocytes and in the intestinal glands. This will provide basic knowledge for future studies of the physiological role that NPY has in the species under study.

Keywords: NPY, immunohistochemical, duodenum, fetuses, horses.

Recibido abril 10, 2015 - Aceptado mayo 28, 2015

* **Correspondencia de autor:** Pascual G. Dauria. Cátedra de Histología. Departamento de Anatomía Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC. Tomas Edison 246 (CP5800). Córdoba, Argentina. e-mail: pdauria@ayv.unrc.edu.ar

INTRODUCCIÓN

En la regulación, crecimiento y motilidad del proceso digestivo intervienen una serie de hormonas peptídicas secretadas por el aparato digestivo (1, 2) que también actúan sobre las emociones y la conducta (3). Esto refleja la relevancia que estas hormonas revisten en diferentes etapas del individuo como el crecimiento y la reproducción (4). La presencia de las mismas ya se detecta en la vida fetal del humano (5) y del cerdo (6).

Las células enteroendocrinas, encargadas de la secreción de las hormonas gastrointestinales, presentan un patrón de distribución particular en las diferentes tónicas y segmentos del tracto digestivo (7, 8) y cada una de ellas cumple una función específica. Es así que la gastrina estimula la 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, etc. (9, 10).

La presencia de gastrina, secretina, motilina, colecistoquinina, péptido instestinal vasoactivo (VIP) y sustancia P ha sido demostrada en mamíferos (11, 12). Estas hormonas están acompañadas, a lo largo del tracto digestivo, por otras de no menor importancia, entre las que podemos citar al neuropéptido Y (NPY) que actúa estimulando la liberación pulsátil de la GnRH y además potencia la respuesta hipofisaria (13, 14, 15).

Los péptidos de la familia Y ejercen sus funciones, incluyendo la de regulación del apetito y el ritmo circadiano, uniéndose a receptores de la proteína G. Existen subtipos, llamados Y1, Y2, Y4, Y5 y Y6, y recientemente ha sido descubierto en peces y anfibios el Y7. El ARNm de Y6 se expresa en el hipotálamo, el tracto gastrointestinal y el tejido adiposo. Estudios realizados en

diferentes mamíferos como así también en aves, referentes a péptidos de la familia Y, sugieren un probable rol en la regulación del comportamiento alimentario (16, 17).

Si bien en los distintos grupos de vertebrados (18) y principalmente en algunos mamíferos adultos (perros, ratas, gatos, hombre, etc.) ha sido demostrada la presencia de muchas de las hormonas gastrointestinales (13, 16), su distribución a lo largo del tracto digestivo, especialmente en las etapas prenatales, no se conoce con certeza. A tal efecto, Ousey y Bloom (9) demostraron que para los estados de enfermedad, en potrillos recién nacidos, la determinación de hormonas gastrointestinales tiene importancia en su posterior desarrollo.

El empleo de la técnica inmunohistoquímica permite reconocer específicamente la presencia de sustancias en determinados tejidos y estructuras vinculadas con el desarrollo y comportamiento normal y patológico (19, 20, 21, 22) del tracto intestinal.

El objetivo de este trabajo fue determinar, mediante inmunohistoquímica, la presencia del NPY en el duodeno de fetos de caballo en etapas intermedias del desarrollo prenatal (período gestacional G2).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron fetos de caballo correspondientes a la etapa intermedia de gestación (G2= 22 semanas aproximadamente), obtenidos del frigorífico Aimar de Río Cuarto. Los animales fueron procesados inmediatamente, se tomaron muestras de duodeno que fueron fijadas en formol bufferado al 10%. Posteriormente se procesaron con los métodos tradicionales según la técnica histológica convencional de H/E. Las preparaciones histológicas así obtenidas se sometieron a la técnica de inmunohistoquímica. Se empleó, como

marcador, el anticuerpo primario contra NPY, y como reveladores, el complejo universal avidina-biotina (ABC) y el substrato peroxidasa diaminobencidina (DAB).

Como base metodológica se estableció el siguiente protocolo:

-Desparafinado con xilol: dos baños de 20 minutos cada uno.

-Rehidratación con alcoholes: un baño en alcohol 100°, 96°, 90° y 70° de 10 minutos cada uno.

-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 suero normal de equino durante 30 minutos.

-Lavados con PBS. Dos lavados de 10 minutos cada uno.

-Incubación con el anticuerpo primario (anti-NPY-policlonal de conejo (H-95): sc-20727-Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), dilución 1:100, en cámara húmeda, durante toda la noche a 4°C.

-Lavados con PBS. Dos lavados de 10 minutos cada uno.

-Incubación con el anticuerpo secundario biotilado (del complejo ABC) durante 10 minutos a temperatura ambiente

-Lavados con PBS. Dos lavados de 10 minutos cada uno.

-Incubación el complejo streptavidina-peroxidasa durante 10 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.

-Obtención de microfotografías.

RESULTADOS

A fin de brindar información complementaria, a continuación se describen algunos aspectos morfológicos del duodeno de fetos correspondientes al período intermedio o G2 de gestación.

Tinción con H/E

Túnica Mucosa

En el duodeno se observaron vellosidades de moderada longitud, revestidas por un epitelio cúbico alto, con núcleos redondeados, cromatina laxa y ubicación centro-apical. El citoplasma, fuertemente acidófilo con aspecto granular a nivel del ápice celular. En la lámina propia se observó la presencia de glándulas intestinales con escaso desarrollo; mientras que la muscular de la mucosa exhibió escasas células.

Túnica Submucosa

La misma presentó una gran cantidad de acinos mucosos y plexos nerviosos.

Túnica Muscular

Se identificaron dos capas de músculo liso: una interna, de disposición circular y otra externa, longitudinal.

Túnica Serosa

No mostró mayores variaciones con relación a la del individuo adulto.

Técnica Inmunohistoquímica

A través de la técnica de inmunohistoquímica se determinó la presencia de células productoras de NPY en el epitelio de revestimiento y glandular. Con respecto al epitelio de revestimiento, las células positivas se

localizaron entre los enterocitos y mostraron una forma triangular, que caracteriza a las células enteroendocrinas, con núcleo desplazado hacia la zona basal y forma redondeada u ovalada. En el citoplasma, los gránulos revelaron una marcación intensa y una distribución homogénea. A pesar de su morfología piramidal, las células positivas presentaron las características de aquellas que responden a las de tipo cerrado, es decir aquellas que secretan sus péptidos mediante procesos citoplasmáticos en la proximidad de células epiteliales, actuando de modo paracrino.

En la Fig. 1 se aprecia la presencia de una célula positiva localizada entre las células correspondientes al revestimiento epitelial. La misma presentó una marcación intensa.

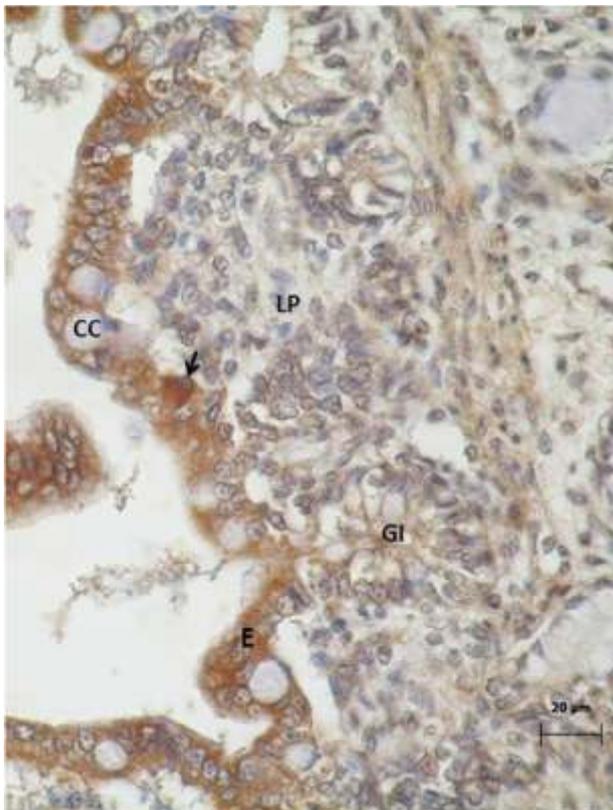


Figura 1. Inmunoexpresión de célula positiva a NPY. 40X. CC: célula caliciforme, E: epitelio de revestimiento, GI: glándulas epiteliales, LP: lámina propia, (flecha): célula NPY positiva.

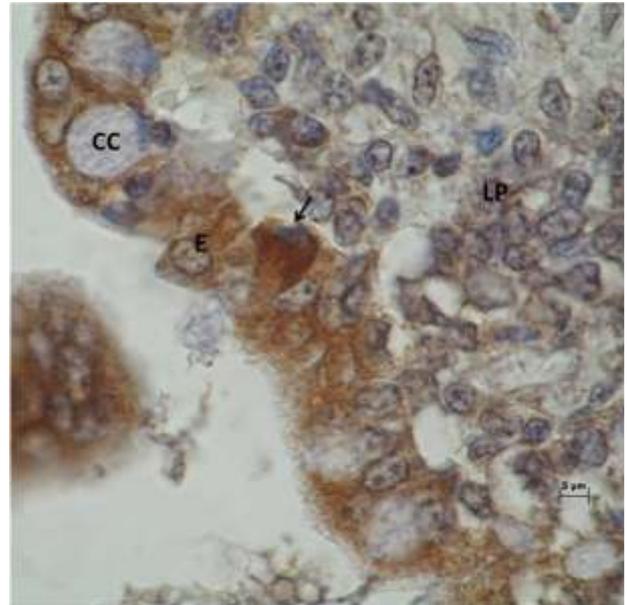


Figura 2. Inmunoexpresión de célula positiva a NPY. 100X. CC: célula caliciforme, E: epitelio de revestimiento, LP: lámina propia, (flecha): célula NPY positiva.

En la Fig. 2 se observa, la inmunoexpresión de una célula productora de NPY en el epitelio de revestimiento. Dicha célula se encuentra ubicada entre los enterocitos. Presenta forma triangular con núcleo basal, redondo u ovalado, y citoplasma con gránulos de distribución homogénea, que muestran una intensa marcación. Dicha célula posee las características de las células de tipo cerrado.

Con respecto a las células positivas localizadas en el epitelio glandular, las mismas evidenciaron marcación intensa y diferentes formas y tamaños (Fig. 3). Algunas presentaron una forma piramidal, con núcleo desplazado hacia la zona basal y gránulos de secreción localizados en la porción apical intensamente teñidos; mientras que otras se observaron redondas, con núcleo central también redondeado y gránulos distribuidos homogéneamente en el citoplasma celular.

No se detectaron células positivas a NPY a nivel de la túnica submucosa ni de la túnica muscular.

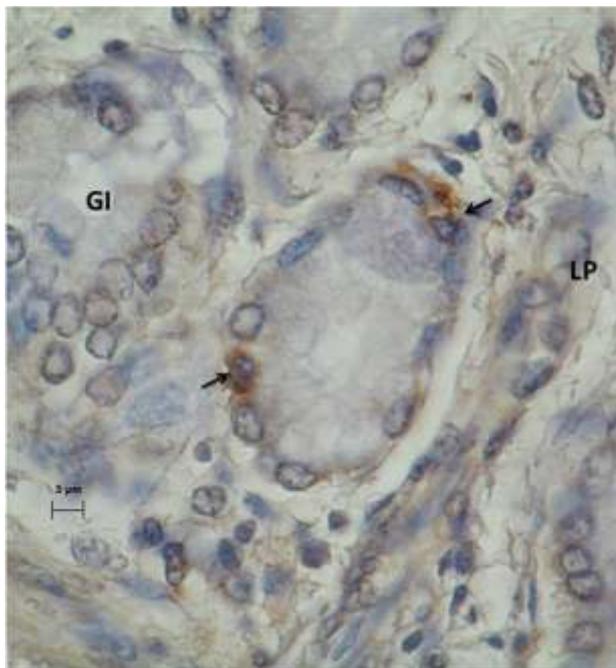


Figura 3. Inmunoexpresión de célula positiva a NPY. 40X. CC: célula caliciforme, GI: glándulas epiteliales, LP: lámina propia, (flecha): célula NPY positiva.

DISCUSIÓN

Con relación a la tinción de H/E, los resultados obtenidos respecto a la arquitectura histológica del duodeno de fetos en etapas intermedias de la gestación fueron similares a los descritos en otros estudios (23).

En las diferentes muestras examinadas de fetos de caballo en período G2, a las que se les practicó la tinción de H/E, resultó dificultosa la identificación de células enteroendocrinas. Esto coincide con lo mencionado en algunas citas bibliográficas relacionadas con humanos (1) y animales domésticos (15). Ross *et al.* (24) atribuyen esta dificultad a la escasez de ARN y membranas, lo cual imprime a la célula una débil basofilia y acidofilia que se traduce en la escasa afinidad tintorial mencionada precedentemente. Desde el punto de vista morfológico, en individuos adultos de diferentes especies, se describen formas celulares que varían de

redonda a piramidal en humanos (25, 26); redonda, ovalada, de huso y triangular en caballos adultos (12); piramidal en otras especies domésticas y salvajes (12, 27); y redondeada y piramidal en fetos de caballo (18).

A partir de fetos de caballo pertenecientes a etapas intermedias del desarrollo (Período G2), se identificaron células con inmunomarcación positivas a NPY, las cuales se localizaron en estructuras que, por su perfil histológico, responden a las características estructurales de una vellosidad intestinal (27).

En este estudio las células positivas a NPY observadas, presentaron las características típicas de las células de secreción endocrina. Se encontraron células NPY positivas tanto en el epitelio glandular como en el epitelio de revestimiento. Estas células se encontraron en distintas localizaciones tanto en mamíferos como en peces. En los preestómagos de fetos de cabra se identificaron células NPY, con inmunoreacción variable, en la lámina propia-submucosa, túnica muscular y plexo mientérico (28) resultados no coincidentes con los del presente trabajo. En el lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858), en diversas regiones del cerebro (29). En el dorado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier 1816) la mayor concentración de células positivas NPY se encontró en el intestino medio (30). En cuanto a las formas de las células, estas variaron entre piramidales y redondas; mientras que 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, lo cual concuerda con lo observado por otros investigadores en otras especies como el caballo y pejerrey (12, 18, 27).

En cuanto a la ubicación de las células NPY positivas a nivel del epitelio de revestimiento, se hallaron coincidencias con fetos de caballo de otros períodos de la

gestación y con los datos obtenidos en estudios realizados en el caballo adulto (27) y en otras especies como ñandú (17), conejo (11) y gato (31). En duodeno de ñandú se observaron marcaciones débiles en el tejido epitelial de las vellosidades intestinales; mientras que en las glándulas, la reacción fue intensa con granulaciones bien manifiestas. Sin embargo, en nuestro estudio las células halladas en el epitelio de revestimiento mostraron una marcación intensa y granulaciones bien evidentes y de distribución homogénea.

Por otro lado, la distribución de los gránulos en las células con inmunomarcación positiva, en las muestras estudiadas, mostró cierta variación ya que aquéllos no sólo se ubicaron en la parte basal de la célula, como habitualmente se describen en el caballo adulto (27) y en otros mamíferos como la vaca y oveja (14); sino también se localizaron en otras áreas de la superficie celular coincidiendo con estudios realizados por Dauria (23) en fetos de caballo, correspondientes a otros períodos de la gestación y en caballos adultos (12). Distintos tipos de gránulos se han descrito acorde a su tamaño y densi-

dad, como lo informa Peranzi (31) en perro, gato y mono, mientras que Galán *et al.* (32), señalan la presencia de tres tipos diferentes de gránulos en las células G del perro.

En humanos, durante el ayuno, se observó un incremento en la expresión de neuronas AGRP/NPY en el núcleo arcuato (33) y en los individuos de un día de nacidos, la concentración de NPY en la sangre del cordón umbilical también se incrementó (34), en coincidencia con los resultados hallados para otras hormonas (polipéptido pancreático, motilina y enteroglucagón) en el cordón umbilical de fetos humanos con un estado de estrés al igual que con niños afectados de gastroenteritis (35). Además, en el cáncer de colon sigmoideo y recto del hombre, se determinó una disminución del número de células NPY y densidad de fibras nerviosas. Tomando como base estas observaciones en humanos la determinación de hormonas gastrointestinales para estados de enfermedad en potrillos recién nacidos puede tener gran importancia (9).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sjölund K, Sandén G, Håkanson R, Sundler F (1983) Endocrine cells in human intestine: an immunocytochemical study. *Gastroenterology* 85:1120-1130.
2. Toullec R, Chayvialle JA, Guillooteau 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.
3. Usellini L, Finzi G, Riva C, Mochizuki T, Yanaihara C, Yanaihara N, Solcia E (1990). Ultrastructural identification of human secretin cells by the immunogold technique. Their costorage of cromogranin A and serotonin. *Histochemistry* 94:113-120.
4. Uvnäs-Moberg K (1989) El tracto gastrointestinal durante el crecimiento y la reproducción. *Investigación y Ciencia* 3: 48-54.
5. Bryan M G, Buchan AM, Gregor M, Ghatei MA, Polak JM, Bloom SR (1982) Development of intestinal regulatory peptides in the human fetus. *Gastroenterology* 83: 47-54.
6. Alumets J, Håkanson R, Sundler F (1983) Ontogeny of endocrine cells in porcine gut and pancreas. An immunocytochemical study. *Gastroenterology* 85:1359-1372.
7. Pearce AG (1969) The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem* 17: 303-313.
8. Marcondes Macea ML, Macea JR, Tavares Guerreiro Fregnani JH (2006) Estudio comparativo de las glándulas de Brunner en la submucosa duodenal humana. *Int J Morphol* 24: 7-12. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022006000100002>.
9. Ousey JC, Ghatei MA, Rossdale PD, Bloom S (1995) Gut hormone responses to feeding in healthy pony foals aged 0 to 7 days. *Equine Reproduction* 1: 87-96.
10. Chu JY, Yung WH, Chow BK (2006) Secretin: A pleiotrophic hormone. *Ann NY Acad Sci* 1070: 27-50.
11. Capella C, Solcia E, Vasallo G (1969) Identification of six types of endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the rabbit. *Arch Histol Jpn* 30: 479-495.

12. Ceccarelli P, Pedini V, Gargiulo AM (1995) Serotoning-containing cells in the horse gastrointestinal tract. *Anat Histol Embryol* 24: 97-99.
13. Alumets J, Håkanson R (1997) Distribution, ontogeny and ultrastructure of somatostatin immunoreactive cells in the pancreas and gut. *Cell Tissues Res* 185: 465-479.
14. Calingasan NY, Kitamura NJ, Yamada J, Oomori Y, Yamashita T (1984) Immunocytochemical study of the gastroenteropancreatic endocrine cells of the sheep. *Acta Anat (Basel)* 118: 171-180.
15. Buendía Marín AJ, Durán Flórez E, Gázquez Ortiz A, Gómez Cabrera S, Méndez Sánchez A, Navarro Cámara JA (2004) Cap. 11: Aparato digestivo. En: *Tratado de Histología Veterinaria*. Ed. Masson, Editores: Gázquez Ortiz Ay A. Blanco Rodríguez. Pp. 239-280.
16. Hoyle CHV (1999) Neuropeptide families and their receptors: evolutionary perspectives. *Brain Res* 848: 1-25.
17. Castagnino R, Navarro O, de la Cruz J, Dauria P, Tissera J, Madriaga L, Corteggiano F, Martínez R, Zubeldía D, Sona L, Mac Loughlin V, Grosso C, Sagripanti G, Ledesma C (2011) Identificación del Neuropeptido Y en el tracto intestinal del ñandú (*Rhea americana*). *Rev Adaco Sup* 1: 19.
18. Dauria P, Castagnino R, de la Cruz J, Sona L, Ibáñez N, Paz A (1999) Presence of gastrointestinal hormones (gastrin) in the atherine. *Biocell* 23: 57-58.
19. Boenisch T 2002 Controles. En: *Métodos inmunohistoquímicos de coloración (Manual)*. 3ra. Ed. Dako Corporation. California, US. Pp. 68.
20. Field A (1984) Technical aspects of immunocytochemistry and its application in routine histopathology. *Histology* 3: 211-213.
21. Gimeno E, Massone A (1989) Técnicas inmunohistoquímicas en patología veterinaria: aspectos teóricos y prácticos. *Vet Arg* 6: 332-339.
22. Leon AS (1991) New Technologies for the surgical pathologist. *J Med Lab Sci*, 4: 45-48.
23. Dauria P (2011) Expresión de gastrina y secretina en el tracto digestivo del caballo. Tesis Maestría en Anatomía y Fisiología Veterinaria. Biblioteca Universidad Nacional de Río Cuarto.
24. Ross M, Pawlina W (2013) Cap. 16. Aparato digestivo II: esófago, estómago e intestino. En: *Histología. Texto y Atlas color con Biología celular*. Editorial Médica Panamericana. 5ª ed., México. Pp. 518-661.
25. Van Niekerk CC, Jap PHK, Ramaekers FCS, Molengraaf F, Poels LG (1991) Immunohistochemical demonstration of keratin 7 in routinely fixed paraffin-embedded human tissues. *J Pathol* 165: 145-152.
26. Kitamura N, Yamada J, Yamashita T, Misu M (1982) Endocrine cells in the gastrointestinal tract of the cat as revealed by various staining methods. *Nihon Juigaku Zasshi* 44: 427-431.
27. Kitamura N, Yamada J, Calingasan NY, Yamashita T (1984) Immunocytochemical distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the horse. *Equine Vet J* 16: 103-107.
28. García A, Masot J, Franco A, Gázquez A, Redondo E (2014) Immunohistochemical evaluation of the goat forestomach during prenatal development. *J Vet Sci* 15: 35-43.
29. Rodríguez-Gomez FJ, Rendón MC, Sarasquete C, Muñoz-Cueto JA, (1999) Estudio morfofuncional del cerebro y la hipófisis del lenguado *Solea senegalensis*: aspectos neuroendocrinos. En: *Patología, fisiología y biotoxicología en especies acuáticas*. Carmen Sarasquete, M. Luisa González de Canales y J. Antonio Muñoz-Cueto Eds. Madrid. Pp. 225-233.
30. Pereira RT, Costa LS, Oliveira IRC, Araújo JC, Aerts M, Vigliano FA, Rosa PV (2015) Realtive distribution of gastrin-, CCK-8-, NPY- and CGRP- immunoreactive cells in the digestive tract of dorado (*Salminus brasiliensis*). *Tissue & Cell* 47: 123-131.
31. Peranzi G, Lehy T (1984) Endocrine cell populations in the colon and rectum of cat, dog, and monkey: Fine structure, immunocytochemistry, and distribution. *Anat Rec* 210: 87-100.
32. Galán JA, Alonso FJM, Moratinos P, González JL, Fraile B, Lobo MVT 1996 The G-cells in the dog: a light and electron microscope immunocytochemical study. *Histochem J* 28: 883-893.
33. Santos JL 2009 Sistema leptina-melanocortinas en la regulación de la ingesta y el peso corporal. *Rev Méd Chile* 137: 1225-1234.
34. Mami C, Manganaro R, Marseglia L, Saitta G, Gemelli M, Martino F (2006) Plasma leptin insulin, and neuropeptide Y response to feeding in newborn infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 91: F389.
35. Lucas A, Adrian TE, Christofides N, Bloom SR Aynsley-Green A (1980) Plasma motilin, gastrin, and enteroglucagon and feeding in the human newborn. *Arch. Dis Child* 55: 673-677.