

BLANCA AGULLEIRO DIAZ

Catedrática de Citología e Histología  
de la Facultad de Biología

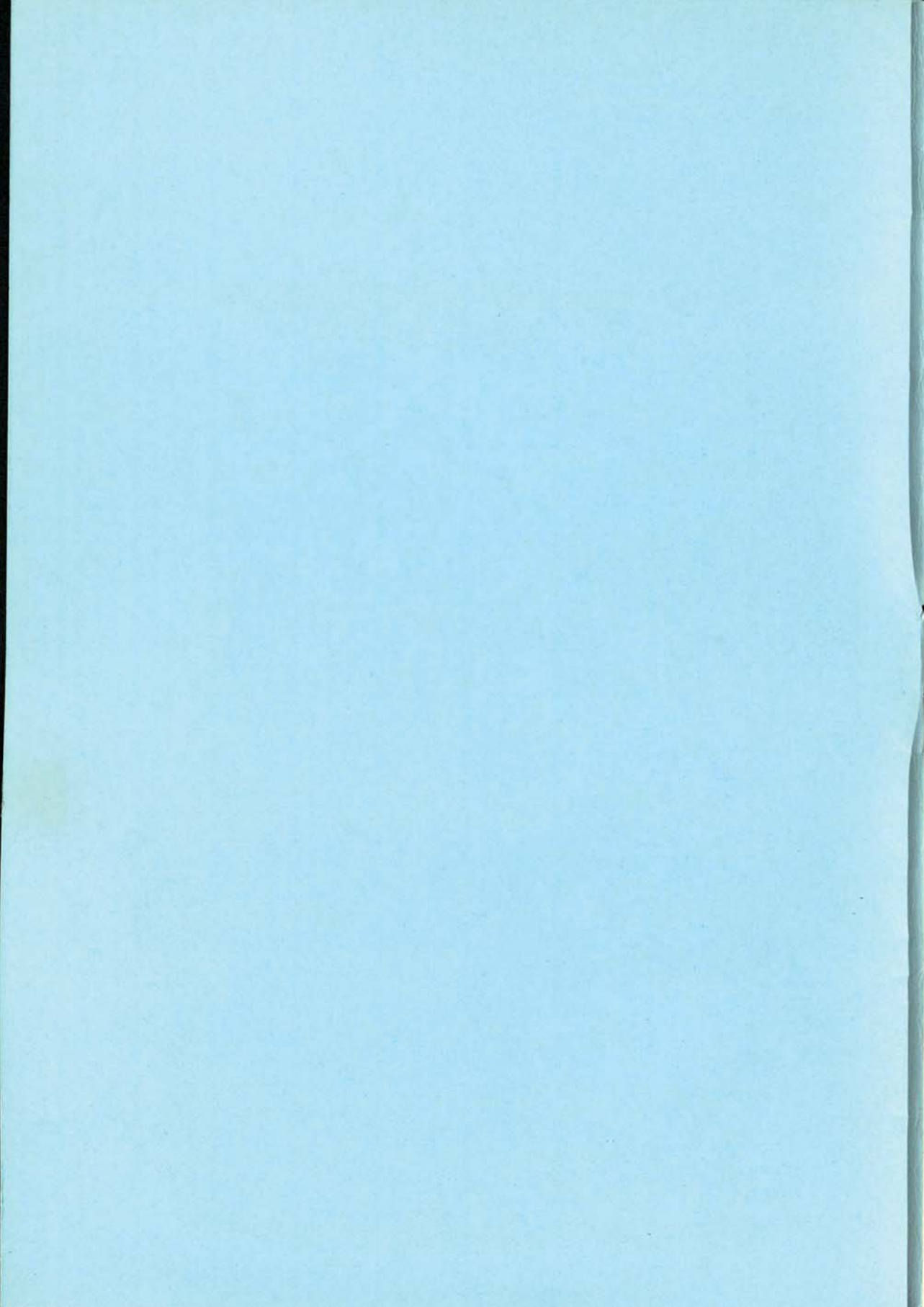
EL SISTEMA ENDOCRINO  
GASTRO-ENTERO-PANCREATICO (GEP)  
DE PECES TELEOSTEOS

LECCION INAUGURAL  
DEL CURSO ACADEMICO 1986-87

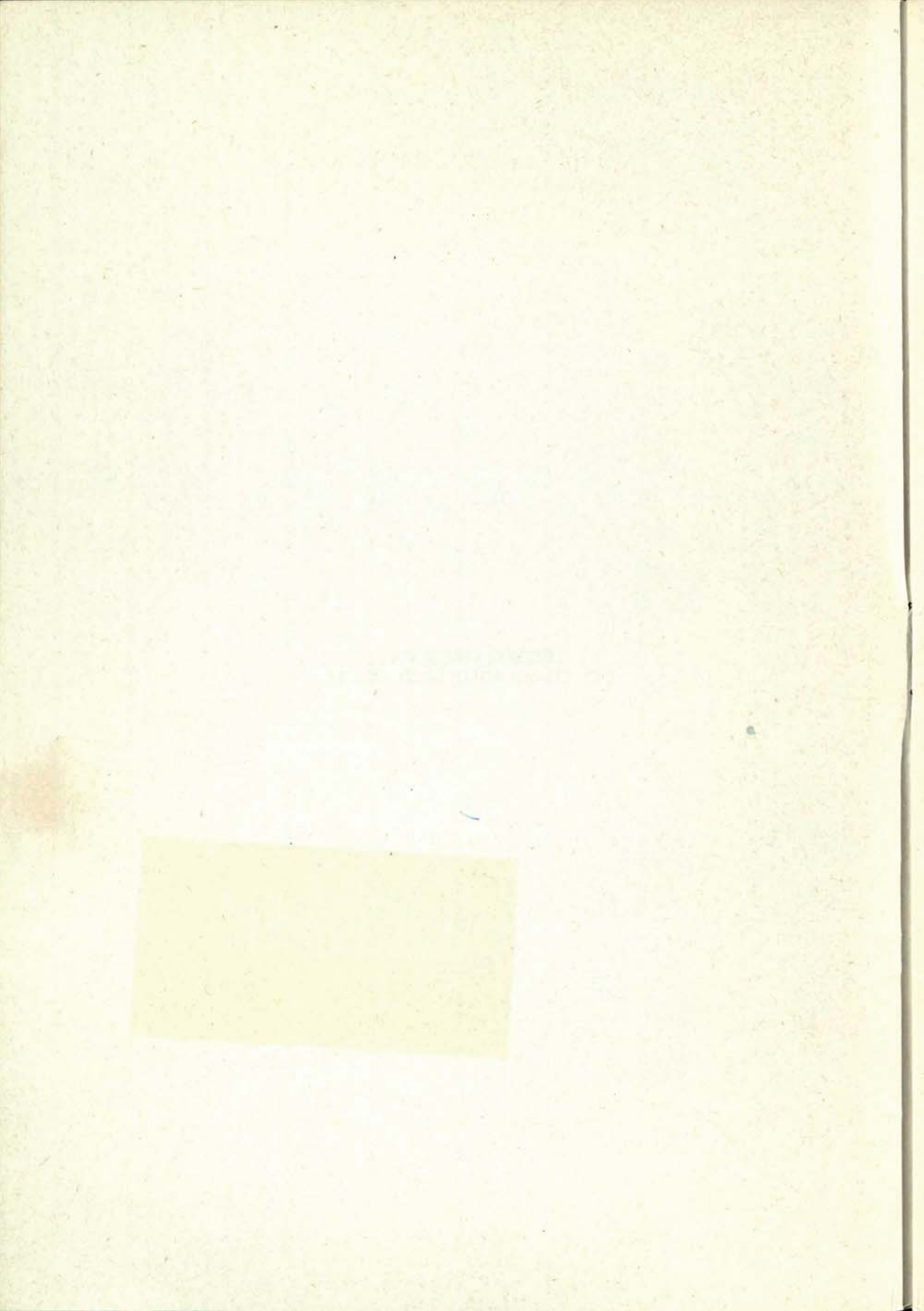
DE MURCIA  
General  
ardo

PT  
8  
23

SECRETARIADO DE  
PUBLICACIONES DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA  
1986



LECCION INAUGURAL  
DEL CURSO ACADEMICO 1986-87







HEALTH AND WELL-BEING

Department of Health and Social Security  
London

EL SISTEMA ENDOCRINO  
GASTRO-ENTERO-PANCREATICO (GEP)  
DE PRCS TEL ESTROS

LIBRO DE TEXTO  
DEL CURSO ALUMNOS 1968-69

El sistema endocrino  
del GEP  
y su papel en el control  
de la nutrición y el  
crecimiento

SECRETARÍA DE  
ESTADO DE SALUD Y SERVICIOS SOCIALES

## **El sistema endocrino gastro-entero-pancreático (GEP) de peces teleósteos**

*Magnífico y Excelentísimo Sr. Rector,  
Excelentísimos e Ilustrísimos Señores,  
Compañeros de Claustro,  
Alumnos,  
Señoras y Señores:*

La regulación hormonal de los procesos digestivos y metabólicos que se atribuye a las células endocrinas dispersas entre las células epiteliales de la mucosa del tracto digestivo o agrupadas en islotes pancreáticos, es uno de los temas a los que más atención se ha prestado desde que, en 1902, BAYLISS y STARLING descubrieran un principio activo, capaz de estimular la secreción pancreática alcalina, en los extractos ácidos de intestino de perro. Se denominó «secretina» y se la consideró una «hormona» (HARDY, 1905), del griego «hormaein», que excita o despierta. Las hormonas son mensajeros químicos transportados, desde el órgano en que se producen al órgano en que influyen, por medio de la circulación sanguínea. Este modo de acción endocrina no es el de todas las hormonas, ya que algunas sólo pueden identificarse en los tejidos debido a su corta vida media, no siendo posible su transporte sanguíneo a un «blanco» distante. Las células que sintetizan y segregan estas hormonas actúan sobre otras células próximas directamente, según un mecanismo de acción llamado «paracrino» por FEYRTER en 1953.



La dispersión de las células endocrinas del tracto digestivo y el hecho de ser de naturaleza peptídica, fácilmente atacadas por los enzimas digestivos, ha dificultado enormemente la obtención de hormonas puras necesarias para realizar los estudios fisiológicos correspondientes, la determinación de su estructura molecular y su posible síntesis. Así que transcurrieron muchos años hasta que GREGORY (1964) y MUTT (1970) fueron capaces de aislar y determinar la estructura de la gastrina y secretina, gracias al descubrimiento de que muchas de las hormonas peptídicas digestivas eran termoestables y podían extraerse sin alteración después de someter el tracto intestinal a temperaturas suficientes para destruir los enzimas proteolíticos. A partir de entonces se inició una etapa de obtención y caracterización de nuevas hormonas que continúa hasta el momento actual.

Las dificultades que ha presentado la investigación fisiológica del sistema endocrino gastro-entero-pancreático (GEP) son similares a las que se han encontrado al abordar el problema desde el punto de vista cito-histológico, y el éxito en la identificación molecular de las distintas hormonas y la posibilidad de obtener antisueros que se pueden utilizar en las nuevas técnicas inmunocitoquímicas, ha significado también un espectacular incremento en los conocimientos que sobre este tema se ha adquirido en los últimos años.

## IDENTIFICACION DE LAS CELULAS DEL SISTEMA ENDOCRINO GEP

### Técnicas convencionales

Si revisamos el desarrollo de las técnicas de coloración que se han utilizado para identificar las células endocrinas del sistema GEP, desde que HEIDENHAIN las reconociera por primera vez en 1870 en estómago de perro y conejo hasta la introducción de las técnicas inmunocitoquímicas, se comprueba que, aunque se basan en reacciones que directa o indirectamente dependen de la composición química de su contenido hormonal, ninguna de ellas es específica para una hormona determinada. Así, algunas se tiñen de color pardo por acción de oxidantes como el dicromato potásico o el cloruro férrico, reacción cromafín (SCHMIDT, 1905) que depende de la presencia de aminas aromáticas, como dopamina, adrenalina, nor-adrenalina, hista-



mina o serotonina. Sobre estas células se deposita plata metálica, observándose en color negro, a partir de sales de plata, bien directamente (argenta afinidad) (MASSON, 1923) o después de la acción de un reductor (argirofilia) (DAVENPORT, 1960). Algunas son metacromáticas (MANOCCHIO, 1960), en algún caso después de hidrólisis ácida (SOLCIA y cols., 1968), y pueden teñirse con hematoxilina de plomo (SOLCIA y cols., 1969). También se caracterizan por ser fluorescentes después de actuar sobre ellas vapores de formol o ácido glioxílico (Fluorescencia Inducida por Formol, FIF) (FALK, 1962).

### **Microscopía electrónica**

A finales de los años 50, ya suficientemente conseguida la técnica de cortes finos y dotados la mayoría de los laboratorios de Histología con un microscopio electrónico, se comprueba que las características ultraestructurales de las células endocrinas del sistema GEP no son definitivas para poder relacionar cada tipo celular con su hormona correspondiente. Las organelas que intervienen en la síntesis de péptidos pueden estar representadas de manera diversa, dependiendo del momento funcional; la morfología nuclear y de las mismas células no son datos suficientes para aproximarse a una clasificación aproximada. Sólo los gránulos de secreción presentes en todas ellas pueden, por su forma, tamaño, electronodensidad y estructura de su contenido, establecer una pauta más aproximada para clasificar las células endocrinas en distintos tipos, y unido a datos experimentales o patológicos, relacionarlos con la producción de una determinada hormona. Sin embargo, existe una variabilidad muy importante en las características ultraestructurales y citoquímicas convencionales en los distintos grupos de vertebrados e incluso entre las especies de un mismo grupo. Así, que en principio, no es posible generalizar los conocimientos que se obtienen de los mamíferos de laboratorio y humanos, los más pronto y mejor estudiados, y suponer que el sistema endocrino GEP de cualquier otra especie ha de ajustarse al mismo patrón histofisiológico que los anteriores.

### **Inmunocitoquímica**

El desarrollo de las técnicas inmunocitoquímicas, que dependen de la obtención de las hormonas y de sus anticuerpos, ha



hecho posible demostrar el lugar de producción de una hormona, tanto con microscopía óptica como electrónica. La inmunocitoquímica tiene como objeto la identificación «in situ» de un constituyente de un tejido por medio de una reacción específica antígeno-anticuerpo, éste último unido a un marcador microscópicamente visible. Su punto de partida lo señalan los trabajos de COONS y cols. (1941) que tuvieron la idea de marcar los anticuerpos específicos de un suero de conejo antineumococo con un colorante fluorescente, el isocianato de fluoresceína. Este suero marcado aglutinaba los neumococos que mostraban fluorescencia, tanto macroscópica como microscópica. Estas técnicas dependen del hecho de que compuestos de bajo peso molecular como colorantes, pequeños péptidos y muchas clases de macromoléculas pueden unirse a proteínas sin deteriorar su función como anticuerpo (REINER, 1930). El método inicial de COONS, método directo, fue modificado reemplazando el isocianato de fluoresceína por isotiocianato que se une con más facilidad a los anticuerpos, y posteriormente con el método indirecto, más sensible y versátil (COONS y cols., 1955), en el que el primer anticuerpo no está marcado y se identifica por medio de un segundo anticuerpo marcado producido contra las inmunoglobulinas de las especies que suministran el primero. Debido a que por lo menos dos moléculas del anticuerpo segundo pueden unirse a cada molécula del anticuerpo primero, este método produce una coloración más intensa y es más específico.

Como marcadores se introdujeron posteriormente enzimas como peroxidasa (NAKANE y PIERCE, 1966), fosfatasa alcalina (ENGRALL y PERLMAN, 1971) y glucosa-oxidasa (MAS-SAYEFF y MAIOLINI, 1975). Una mayor sensibilidad y especificidad se logró utilizando segundos anticuerpos no conjugados como puente entre el anticuerpo primero y el reactivo marcado que es generalmente un complejo enzima-anti-enzima, como peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) (STERNBERGER, 1974), el más utilizado hasta ahora, fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (APAAP) (CORDELL y cols., 1984) o un complejo avidín-biotina-enzima (HEGGENESS y ASH, 1977). Los marcadores enzimáticos, actuando sobre un sustrato adecuado, dan lugar a un producto intensamente coloreado visible con microscopio óptico o muy electronodenso si se quiere estudiar la preparación con un microscopio electrónico.



Las técnicas inmunocitoquímicas utilizan también como marcadores, a nivel de microscopía electrónica, partículas densas como ferritina o el oro coloidal, este último capaz de estabilizar y adsorber rápidamente proteínas sin un cambio importante de sus actividades biológicas. Las proteínas utilizadas en inmunocitoquímica son anticuerpos, proteína A o antígenos. La técnica proteína A-oro (ROMANO y ROMANO, 1977) es una de las que ofrece mejores resultados. La proteína A obtenida de *Staphylococcus aureus* se une a la porción Fc de las inmunoglobulinas de varias especies de mamíferos; el complejo formado se aplica como segundo antisuero. Con esta técnica es posible localizar dos o más hormonas en una misma célula, incluso dentro de un único gránulo de secreción, si se utilizan partículas de oro de distinto diámetro que, conjugadas a la proteína A, han de unirse a distintos primeros anticuerpos. La puesta a punto de esta técnica se está iniciando en nuestro laboratorio. Sólo se ha publicado hasta este momento un trabajo sobre la determinación ultraestructural, con la proteína-A-oro, de las hormonas del sistema endocrino GEP de teleósteos.

### Anticuerpos monoclonales

Un importante desarrollo en la investigación en este campo citohistológico es de prever que se produzca en los próximos años cuando se obtengan anticuerpos monoclonales contra las hormonas del sistema GEP de vertebrados inferiores.

Los antisueros convencionales contienen diferentes moléculas de anticuerpos, específicas para los distintos determinantes del antígeno, cada una con afinidades y avides distintas. Además, los animales responden individualmente de forma diferente al mismo inmunógeno, por lo que no se pueden obtener los mismos sueros en gran escala. Estos problemas se han resuelto con la técnica de obtención de anticuerpos monoclonales (KOHLER y MILSTEIN, 1975). Un anticuerpo monoclonal es el producto de un único clon de células B y, por lo tanto, de estructura molecular, especificidad y afinidad uniformes, que además puede ser producido en grandes cantidades. La técnica para obtener anticuerpos monoclonales se basa en la fusión de linfocitos B procedentes de animales inmunizados con el antígeno deseado y células de mieloma, derivadas de tumores de células plasmáticas, que han perdido su capacidad de secretar inmunoglobulinas. Las



células resultantes de la fusión o hibridomas poseen la propiedad de las células del mieloma de multiplicarse indefinidamente «in vitro» y la de los linfocitos B de sintetizar y secretar anticuerpos específicos para el inmunógeno. Los hibridomas más adecuados pueden clonarse, y obtenerse en gran cantidad los anticuerpos en el medio de cultivo. Actualmente ya son comerciales anticuerpos monoclonales de diversos antígenos de mamíferos.

### EVOLUCION DEL SISTEMA ENDOCRINO GEP

La idea de integrar los elementos endocrinos intestinales y pancreáticos en el término común «sistema endocrino gastroentero-pancreático» tiene su fundamento en consideraciones tanto ontogenéticas, ya que ambos proceden del endodermo, como filogenéticas según las cuales se originan a partir de las células endocrinas del tracto digestivo de protocordados en las que se han demostrado, con técnicas inmunocitoquímicas, sustancias semejantes a insulina, glucagón y gastrina (VAN NOORDEN y PEARSE, 1976) y, posteriormente, neurotensina, penta-gastrina, polipéptido pancreático (PP), secretina, somatostatina y péptido vasointestinal (VIP) (REINECKE, 1981; VAN NOORDEN, 1984). Algunas de estas células abandonan, en el curso de la evolución, el tracto digestivo para formar los islotes endocrinos que, dispersos en el páncreas exocrino o separados del mismo, están presentes en vertebrados, mientras que otras permanecen en la glándula o tienen una localización dual, digestiva y pancreática. La primera etapa en este proceso evolutivo tiene lugar antes de la aparición del páncreas exocrino. En efecto, en los vertebrados menos evolucionados, los ciclóstomos, algunas células dejan la mucosa intestinal en la que existen células zimogénicas, para formar un órgano separado, el órgano del islote. En éste existen sólo células con insulina y con somatostatina. Las células con glucagón permanecen en la mucosa intestinal. La cuarta hormona, el polipéptido pancreático (PP), no ha sido aislada en estos peces primitivos ni tampoco se han identificado en ellos células PP. En la siguiente etapa evolutiva, que se sitúa en los peces cartilagosos de la subclase holocéfalos, los islotes endocrinos contienen células con glucagón, apareciendo al mismo tiempo una glándula pancreática. Ya se identifican en la mucosa intestinal las células con polipéptido pancreático que, por último, en la subclase elasmobranquios también se encuentran en los islotes. Por lo tanto, el orden de aparición de las hormonas



pancreáticas en los islotes durante la filogenie es: insulina, somatostatina, glucagón y polipéptido pancreático, orden que se conserva en el curso del desarrollo embrionario de vertebrados.

## **ESTRUCTURA GENERAL DE LAS CELULAS ENDOCRINAS DEL SISTEMA GEP**

Las células endocrinas del sistema GEP son fusiformes o piramidales cuando están situadas entre las células epiteliales de la mucosa gastrointestinal, o redondeadas, en algunos casos con prolongaciones, cuando constituyen los islotes pancreáticos. Pueden alcanzar la luz intestinal por medio de una estrecha prolongación citoplasmática que en la parte apical forma microvellosidades (células de tipo abierto) o bien estar completamente rodeadas por las células epiteliales adyacentes (células de tipo cerrado) con las que diferencian complejos de unión, como desmosomas. Se caracterizan principalmente por la presencia de gránulos de secreción que se acumulan en la zona celular más cercana a los capilares sanguíneos. La secreción peptídica de las células endocrinas se sintetiza, como es general, en el retículo endoplasmático rugoso y se transporta al aparato de Golgi, donde se rodea de membrana, constituyendo gránulos. El contenido de éstos es complejo, ya que además de la hormona o su precursor, se encuentran aminas biogénicas, ATP y otros adenin-nucleótidos y una gran molécula de una proteína compuesta, que es la responsable de la coloración de los gránulos con los diferentes colorantes. Los gránulos también contienen  $Ca^{++}$  y posiblemente algunos iones metálicos. La liberación del complejo contenido granular tiene lugar por procesos de exocitosis.

## **EL SISTEMA ENDOCRINO GEP DE PECES TELEOSTEOS**

Aunque el sistema endocrino GEP de peces teleósteos ha sido estudiado con técnicas citoquímicas convencionales y con microscopía electrónica, la mayor parte de los conocimientos que sobre el mismo tenemos actualmente han sido resultado de la investigación inmunocitoquímica. Hasta ahora no ha sido posible obtener la mayor parte de las hormonas peptídicas de peces y, por lo tanto, tampoco los antisueros correspondientes. Sin embargo, los anticuerpos contra hormonas peptídicas de mamíferos presentan reacción cruzada con sustancias producidas por peces. Esta reacción cruzada implica una estructura molecular



similar entre las hormonas de peces y mamíferos y, por lo tanto, una inmunotinción tanto más intensa cuanto mayor sea la coincidencia entre sus secuencias de aminoácidos. Sin embargo, esta semejanza molecular no siempre se corresponde con una identidad funcional ya que los determinantes antigénicos de una molécula peptídica hormonal pueden haber evolucionado independientemente de las zonas que la confieren actividad biológica.

Según estas consideraciones, en las células endocrinas del sistema GEP de teleósteos, puestas de manifiesto con técnicas inmunocitoquímicas y antisueros contra hormonas de mamíferos, existen «sustancias semejantes a» las hormonas utilizadas en la obtención de los antisueros, tanto en su estructura como en su acción biológica.

#### **Células endocrinas del tracto digestivo de teleósteos**

Las células endocrinas del tracto digestivo de teleósteos son difíciles de demostrar con la mayor parte de las técnicas válidas para mamíferos. Así, son sólo débilmente argirófilas y se tiñen ligeramente con hematoxilina de plomo y sólo en algún caso muestran cromafinidad. Su presencia, sin embargo, fue determinada en algunas especies con estas técnicas y posteriormente clasificadas según sus características ultraestructurales, principalmente tamaño, forma y electronodensidad de los gránulos de secreción. Se han descrito 4 ó 5 tipos celulares según estos criterios en algunas especies. En *Sparus auratus* y *Mugil sp*, hemos llegado a establecer 8 tipos diferentes que se correlacionan en parte con los resultados inmunocitoquímicos.

Con técnicas inmunocitoquímicas microscópico-ópticas se han identificado, hasta ahora, en el tracto digestivo de diversas especies de teleósteos, células con inmunoreactividad-semejante a somatostatina, gastrina, secretina, sustancia P, met-enkefalina y bombesina en el estómago, y gastrina/CCK, sustancia P, met-enkefalina, bombesina, polipéptido pancreático, glucagón, péptido vasointestinal (VIP) y neurotensina en el intestino. Los resultados son muy diversos, dependiendo de la especie estudiada y del antisuero utilizado.



### Características generales de las hormonas gastrointestinales y localización en el tracto digestivo de peces

La somatostatina es un tetradecapéptido cíclico aislado inicialmente en hipotálamo de oveja (BRAZEAU y cols., 1974). Su primera acción identificada fue la de inhibir la secreción de la hormona del crecimiento, por lo que se llamó SRIF (Somatotropin-Releasing-Inhibitor-Factor). Posteriormente se comprobó que esta acción se extendía a todas las hormonas estudiadas como TSH, calcitonina, renina, tiroideas, así como al resto de las pancreáticas y gastrointestinales. También disminuye la secreción pancreática exocrina, la de pepsina y la de ácido clorhídrico, y la motilidad gástrica y biliar.

Como ocurre con otras hormonas peptídicas, se han aislado en mamíferos diversas formas moleculares de somatostatina. La somatostatina-28 aislada de intestino porcino (PRADAYROL y cols., 1978) y en hipotálamo (BRAZEAU y cols., 1980) contiene la completa secuencia de aminoácidos de la somatostatina-14 en su fragmento C-terminal y 14 residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal. Ambas formas de somatostatina tienen los mismos órganos «blanco» y similares acciones fisiológicas, aunque «in vitro» la somatostatina-28 tiene una mayor vida media que la somatostatina-14 y aparentemente mayor potencia.

En peces, se ha obtenido somatostatina de los islotes de *Lophius americanus* (NOE y cols., 1979), idéntica al tetradecapéptido obtenido de mamíferos, y de los islotes de *Ameiurus nebulosus* (OYAMA et al., 1980, 1981). La somatostatina de este último tiene ocho aminoácidos adicionales en la región N-terminal; sus acciones biológicas son semejantes, pero menos intensas, que la de la somatostatina-14.

En teleósteos, las células con somatostatina se han descrito exclusivamente en el estómago, en las zonas más profundas de los pliegues gástricos y en la parte superior de las glándulas gástricas, como hemos visto en *Sparus auratus*, y entre las células mucosas superficiales. En algunas especies no se han identificado con estas técnicas mientras que en otras la inmunotinción es positiva y, sin embargo, no es posible detectar la hormona con radioinmunoensayo. En relación con un posible significado filogenético, destaca que en peces inferiores, como elas-



mobranquios, las células con somatostatina se encuentran en el estómago, como en teleósteos, y en el intestino.

La gastrina y la colecistoquinina (CCK), junto con la ceruleína, forman un grupo de hormonas que tienen notables semejanzas estructurales y similares, aunque de distinta intensidad, actividades fisiológicas. La gastrina, una de las primeras hormonas descubiertas (EDKINS, 1905), estimula la secreción ácida gástrica. La colecistoquinina se reconoció primero como un factor que contraía la vesícula biliar (IVY y OLDBERG, 1928) y que se identificó posteriormente (JORPES y MUTT, 1973) con la pancreozimina contenida en los extractos intestinales, capaz de estimular la secreción enzimática del páncreas (HARPER y RAPER, 1943). La ceruleína se ha aislado de la piel de la rana *Hyla cerulea* (ERSPAMER y cols., 1973).

Estas tres hormonas tienen en común el pentapéptido C-terminal que es la parte biológicamente activa de la molécula. La ceruleína es un decapeptido que sólo difiere en un aminoácido del decapeptido C-terminal de la CCK.

Se han aislado en mamíferos diversas formas moleculares tanto de la gastrina como de la CCK. En el caso de la gastrina, se han identificado moléculas de 34 (gastrina-34 o big-gastrina), de 17 (gastrina-17 o little gastrina) y de 14 aminoácidos, siendo la gastrina-34 probablemente una forma precursora de la molécula gastrina-17.

La colecistoquinina, que se obtuvo en un principio a partir de duodeno porcino, es una molécula de 33 aminoácidos (CCK-33) cuyo precursor puede ser otra mayor, la CCK-39. Se ha aislado también otra molécula, CCK-8, octapéptido C-terminal de la CCK-33, en cerebro y neuronas periféricas, cuya actividad es de dos a diez veces mayor que la CCK-33. Respecto a peces, se ha identificado en el teleósteo *Cottus scorpius*, por radioinmunoensayo, un péptido semejante a CCK/ceruleína (FALKMER et al., 1981). Se ha sugerido que en estos vertebrados inferiores no existen gastrina y CCK como hormonas separadas, sino sólo un péptido semejante a la ceruleína que tendría la actividad de ambas (LARSSON y REHFELD, 1978). Otros autores, sin embargo, consideran que en los peces menos evolucionados, como ciclóstomos y elasmobranquios, existe un material hormonal



único del tipo de gastrina/CCK, mientras que en teleósteos se encuentran independientemente cada una de ellas (VIGNA, 1979), y suponen que la gastrina ha evolucionado a partir de un material semejante a la CCK, por procesos de duplicación de genes, cuando se produce la divergencia entre peces cartilaginosos y óseos (DOCKRAY, 1979).

La localización en teleósteos de células con un contenido semejante a gastrina/CCK se ha realizado con técnicas inmunocitoquímicas, encontrándose en el estómago e intestino de diversas especies y sólo en el intestino en otras. Estos resultados se obtuvieron utilizando antisueros contra gastrina-34 humana o contra un fragmento C-terminal de la misma. Sólo excepcionalmente se han obtenido resultados positivos con antisueros contra porciones N-terminal de la hormona en especies que no presentaban inmunorreacción con antisueros anti-gastrina C-terminal.

Los resultados que nosotros hemos obtenido en nuestros trabajos sobre el tracto digestivo de *Sparus auratus* (ELBAL y AGULLEIRO, 1986), son de notable interés, ya que hemos puesto de manifiesto células con gastrina en estómago e intestino, utilizando un antisuero contra gastrina-34 humana y células con CCK, sólo en intestino, por medio de un antisuero contra el octapéptido C-terminal de la colecistoquinina. Con otros antisueros contra un fragmento C-terminal de la gastrina (ABAD y cols., 1986), sólo se obtiene inmunotinción en las células endocrinas del intestino anterior. Estos resultados parecen confirmar la existencia de dos tipos distintos de células con péptidos de la familia de la gastrina, uno con gastrina y otro con CCK y también que la gastrina en esta especie difiere de la CCK intestinal en alguna zona de la región C-terminal.

El **glucagón** es una hormona polipeptídica de 29 aminoácidos secretada por las células A del páncreas. Tiene una acción hiperglucemiante relacionada con la glucogenolisis hepática y la gluconeogénesis. Se han encontrado péptidos semejantes al glucagón o enteroglucagón en la mucosa intestinal (SUTHERLAND y DE DUVE, 1948) que tienen reacción cruzada con el suero anti-glucagón específico para la zona N-terminal, denominándose inmunorreagentes-semejantes al glucagón o GLIs (HOLST, 1981). Uno de los mejor conocidos es la glicentina, péptido de 100 aminoácidos cuyo extremo C-terminal contiene el glucagón más



un octapéptido. En mamíferos se ha comprobado que en un mismo tipo celular puede almacenarse glucagón pancreático y glicentina, localizándose el glucagón en el centro denso del gránulo y la glicentina en el centro y en el halo claro periférico.

El glucagón pancreático aislado en algunos teleósteos tiene, como el de mamíferos, 29 aminoácidos, aunque algunos son diferentes. Su acción hiperglucemiante es muy específica, intensa sobre otros peces, pero sin efecto en mamíferos.

En el tracto digestivo de teleósteos sólo se han encontrado células con inmunorreactividad-semejante a glucagón o glucagón-glicentina en el intestino de algunas especies, como *Salmo* y *Barbus conchoniis*, y nunca en el estómago, en donde se identifican en otros peces menos evolucionados, como tiburones. En *Sparus auratus* son muy escasas las células que reaccionan con antisueros contra glucagón pancreático y glucagón/glicentina y están situadas en el intestino anterior.

La **secretina** se ha reconocido como un potente estimulante de la secreción de jugo pancreático rico en bicarbonato desde su descubrimiento por BAYLISS y STARLING en 1902. Es un polipéptido básico de 27 aminoácidos. Además de su efecto sobre la secreción pancreática exocrina, se demostró que tiene numerosas acciones biológicas, que incluyen la estimulación de las secreciones biliares y de la secreción de pepsina gástrica y la inhibición de la secreción ácida gástrica, de la liberación de gastrina y de la motilidad gastro-intestinal. Su liberación durante la digestión depende principalmente del ácido que llega al duodeno.

Aunque en algunas especies, como *Chimera monstrosa*, *Esox lucius* y *Lamprea*, se había demostrado la existencia de sustancias semejantes a secretina, no se habían obtenido resultados positivos con técnicas inmunocitoquímicas en el tracto digestivo de peces. Sin embargo, una de las personas de nuestro equipo ha puesto de manifiesto células con secretina en el estómago de *Sparus auratus* (ABAD y cols., 1986).

El **péptido vaso-intestinal (VIP)** descubierto y aislado en duodeno porcino (SAID y MUTT, 1970), consta de 28 aminoácidos y está estructural y biológicamente relacionado con la secretina, el glucagón y el péptido inhibidor gástrico (GIP). La similitud



entre estos péptidos ha sugerido su evolución a partir de una molécula ancestral común por procesos de duplicación de genes, análogos a los propuestos para la gastrina y la colecistoquinina (CCK). En peces se ha extraído una hormona semejante al VIP de mamíferos. Esta hormona está presente en mayor cantidad en el intestino anterior de teleósteos y en el posterior de elasmobranchios. Su actividad biológica es semejante a la del VIP de cerdo, lo que sugiere que, en vertebrados, no han ocurrido importantes modificaciones de la estructura biológicamente activa de la molécula. Como el glucagón, el VIP produce hiperglucemia por incremento de la glucogenolisis hepática. Tiene efectos vasodilatadores, inhibe la secreción gástrica y estimula la secreción de insulina y glucagón.

Células con inmunorreactividad-semejante a VIP se han encontrado, principalmente en la porción posterior del tracto digestivo en sólo algunos teleósteos. En alguna especie se considera que existen dos tipos diferentes de células VIP situados, respectivamente, en la zona anterior y en la posterior del intestino.

El **polipéptido pancreático (PP)** se descubrió al purificar insulina de páncreas de pollo (KIMMEL y cols., 1968), aislándose después en bóvidos (LIN y CHANCE, 1972). Se han encontrado numerosas diferencias en las secuencias de los 36 aminoácidos del polipéptido pancreático de las diferentes especies de vertebrados y sólo el antisuero contra la hormona bovina (BPP) presenta inmunorreactividad positiva en todas las especies estudiadas hasta ahora.

En peces, las células con inmunorreactividad-semejante a PP siempre se presentan en el intestino. Es de destacar la coexistencia de PP y glucagón en algunas células del intestino medio de *B. conchoni*, en el que también existen células endocrinas con sólo una de estas hormonas.

El papel funcional del polipéptido pancreático en peces no se conoce hasta ahora. En mamíferos, estimula la glicogenolisis hepática y tiene una acción antagonica respecto a la colecistoquinina.

La **substancia P** es un péptido descubierto por EULER y



GADDUM, en 1931, en intestino de caballo y posteriormente aislado a partir de extractos de hipotálamo bovino (CHANG y LEEMAN, 1970). Se ha localizado en células endocrinas del tracto digestivo de mamíferos que contienen serotonina e identificado en extractos de cerebro e intestino de peces óseos y cartilagosos. No se conoce su significado hormonal y no se ha establecido si la sustancia P inmunorreactiva circulante tiene actividad biológica. Las células con sustancia P sólo en algún caso se han puesto de manifiesto en teleósteos. En general, aparecen en la mucosa intestinal y excepcionalmente, como en *Salmo gairdneri* y *Sparus auratus*, también en el estómago. Los resultados son muy variables dependiendo tanto de la especie como del antisuero utilizado. En *Sparus auratus*, según nuestros trabajos, se pueden detectar células inmunorreactivas en estómago e intestino con algunos antisueros, mientras que con otros sólo se ponen de manifiesto en el epitelio superficial gástrico. La variabilidad de los resultados obtenidos posiblemente se deba a diferencias de las moléculas de la sustancia P de las distintas especies, a la distinta afinidad de los antisueros utilizados e incluso a la posibilidad de que éstos puedan reaccionar con otra hormona peptídica.

Aunque en vertebrados superiores es general la presencia de serotonina en las células EC, que contienen péptidos semejantes a sustancia P, en *Sparus auratus* ambas sustancias se identifican en células distintas del estómago. La sugerencia de que las células con serotonina sean, al menos en parte, células EC inmaduras parece confirmarse por el hecho de que se encuentren principalmente en la región del cuello de las glándulas gástricas de *Sparus auratus*, lugar de proliferación celular. Es de notar que en elasmobranchios, menos evolucionados que los teleósteos, las células con inmunorreactividad-semejante a serotonina se encuentran, en número considerable, en todo el tracto digestivo.

La **neurotensina** de mamíferos, aislada por primera vez en hipotálamo de buey (CARRAWAY y LEEMAN, 1973), es un tridecapéptido que tiene un amplio espectro de acciones biológicas sobre el SNC, músculo liso vascular y no vascular, órganos endocrinos y tracto digestivo. Se han encontrado sustancias semejantes a neurotensina, con una región N-terminal muy variable, desde protozoos a mamíferos, pudiendo existir múltiples formas en una misma especie.



La actividad biológica de la neurotensina deriva de la mitad C-terminal de la molécula que es la que se conserva de manera importante en la evolución.

Células con inmunorreactividad-semejante a neurotensina, utilizando un antisuero contra la porción C-terminal de la molécula, sólo se han encontrado en el intestino de dos especies de teleósteos, *B. conchoni* y *Carassius auratus* y en el estómago de *Sparus auratus*, siendo negativos los resultados en otras numerosas especies estudiadas, tanto con este tipo de suero como con otros contra el fragmento N-terminal de la hormona. Sin embargo, es de señalar que en un tiburón, *Squalus acanthias*, se han puesto de manifiesto células con neurotensina en estómago, utilizando un suero contra la parte C-terminal de la hormona, y en estómago e intestino con otro obtenido contra el fragmento N-terminal. El significado filogenético que esto puede implicar es un problema a resolver cuando se disponga de más datos.

**Met-enkefalina.** Es un pentapéptido opioide aislado originalmente en cerebro porcino (HUGHES y cols., 1975) y cuyas funciones pueden estar relacionadas con la reducción de la motilidad intestinal, siendo un antagonista de la colecistoquinina. En la mayor parte de las especies de teleósteos en las que existe inmunorreactividad-semejante a met-enkefalina, las células endocrinas se encuentran tanto en el estómago como en el intestino, o en el intestino anterior en el caso de especies que carecen de estómago. Sin embargo, en *Sparus auratus* este tipo celular no se identifica en el estómago sino en todo el intestino, hasta la zona terminal.

**Bombesina.** Este péptido de 14 aminoácidos, aislado a partir de piel de ranas europeas (ERSPAMER y cols., 1973), produce un incremento notable de la secreción ácida gástrica en peces acompañada de una disminución del péptido vasointestinal plasmático. Sólo se han encontrado células endocrinas con inmunorreactividad-semejante a bombesina en la mucosa gástrica y, escasas, en el intestino anterior de *Salmo gairdneri*, aunque con radioinmunoensayo los resultados han sido prácticamente negativos.



### Células endocrinas pancreáticas

Las células endocrinas pancreáticas de teleósteos se organizan de manera distinta en relación con la estructura del páncreas exocrino. Cuando éste es difuso, es decir, dispuesto a lo largo de los conductos biliares, vasos sanguíneos abdominales y superficie externa del tracto digestivo, vesícula e hígado e incluso en el interior de este último, las células endocrinas pancreáticas se agrupan formando los denominados corpúsculos de Brockmann, o islotes principales independientes. Si el páncreas es extraintestinal y compacto, las células endocrinas pueden estar aisladas o formar grupos o islotes dispersos en el seno del tejido exocrino. En el primer caso, el páncreas se denomina de «tipo Actinopteri-gio» y en el segundo de «tipo Tetrápodo», según la clasificación de EPPLE (1969).

Algunas especies tienen sólo un islote principal, mientras que en otras las células endocrinas pancreáticas se concentran en un gran islote principal y en varios más pequeños. Dos islotes principales, uno yuxtaesplénico y otro yuxtapiórico pueden encontrarse en *Cottus scorpius*. En las especies estudiadas por nosotros, *Sparus auratus* presenta dos o tres grandes islotes, uno de ellos de mayor tamaño y de composición celular particular, y numerosos islotes dispersos en el tejido exocrino, y *Mugil* sólo un gran islote principal, localizado cerca de la vesícula biliar, y numerosos islotes accesorios de menor tamaño.

Las técnicas histoquímicas utilizadas en teleósteos para identificar los distintos tipos celulares del páncreas endocrino son, principalmente, croton-aldehído (GOMORI, 1939) y aldehído fuch-sina (GOMORI, 1950) para las células B, impregnación argén-tica de GRIMELIUS (1968) para las células A y la impregnación argéntica de HELLMAN-HELLERSTROM (1960) para las cé-lulas D. Con microscopía electrónica se han descrito diversos tipos celulares que se distinguen fundamentalmente por las ca-racterísticas de sus gránulos de secreción. Además de las células A, B y D generalmente bien determinadas, se han encontrado en algunas especies otras diferentes que muestran poca afinidad con los colorantes de las técnicas histoquímicas convencionales o que tienen gránulos de secreción de estructura peculiar. Con técnicas inmunocitoquímicas se identifican células con immuno-reactividad-semejante a glucagón, insulina, somatostatina y po-



lipéptido pancreático. La frecuencia y localización de cada tipo celular varía considerablemente de unas especies a otras, lo mismo que sus características ultraestructurales.

**Las células con glucagón o células A** se localizan en las áreas más externas de los islotes, encontrándose también, en algunas especies, en la región central, formando grupos, aisladas o bordeando septos de tejido conjuntivo y nervios. También pueden encontrarse aisladas y dispersas en el tejido exocrino que rodea a los islotes. Las células con glucagón tienen, en general, un contorno poligonal, frecuentemente triangular, o fusiforme.

**Las células con insulina o células B** son aproximadamente ovoideas y pueden presentarse formando grupos redondeados o alargados en la región central de los islotes principales y accesorios, o bien en grupos o aisladas por todo el islote. La insulina, aislada por BANTING y BEST en 1921, está formada por dos cadenas peptídicas unidas por dos puentes disulfuro y con un tercero interno en la cadena A (SANGER, 1955). Estos puentes intervienen en la formación de la estructura terciaria de la molécula, y son básicos para su actividad biológica. La insulina de peces tiene una estructura semejante a la de vertebrados aunque puede variar en algunos aminoácidos, distintos según las especies, sin que se destruya su actividad hipoglucemiante.

**Las células con somatostatina o células B** se han encontrado, en numerosas especies, en la región central de los islotes. Destaca en *Cottus scorpius* la situación central de estas células en el islote yuxtapilórico y periférica en el yuxtaesplénico. En otros casos, las células con somatostatina están distribuidas por todo el islote, aunque son más numerosas en la periferia. Estas células pueden presentar un claro dimorfismo, como ocurre en *Sparus auratus* en la que son ovales o fusiformes en la periferia y poligonales con largas prolongaciones en la región central de los islotes. En *Mugil* también existen dos tipos distintos de células con somatostatina, de morfología e inmunorreactividad diferente, localizadas tanto en la región central como en la periferia de los islotes.

La distribución de células con **polipéptido pancreático o células PP** es muy variable, tanto entre las distintas especies de teleósteos como, dentro de una especie, en cada tipo de islote. Son cé-



lulas poligonales con largas prolongaciones que no se han identificado en algunas especies, lo que puede ser debido a la carencia de esta hormona o bien a que, debido a su específica estructura molecular, no se produce reacción cruzada con antisueros contra hormonas de mamíferos. Cuando se presentan, las células con polipéptido pancreático se localizan en las áreas más externas de los islotes, siendo frecuentemente escasas en los islotes principales y más numerosas en los islotes más pequeños. En otras especies, no se han encontrado en el islote principal y sí en los accesorios, como tampoco en el islote yuxtaesplénico de *Cottus scorpius*, siendo muy numerosas en el yuxtapiórico. En el islote principal de mayor tamaño de *Sparus auratus*, las células con polipéptido pancreático se agrupan en una pequeña zona superficial mientras que en el resto de los islotes se disponen en la periferia. En estos últimos existen células con sustancias semejantes a glucagón y a polipéptido pancreático al mismo tiempo, aunque también están presentes otras con sólo inmunorreactividad-semejante a glucagón o a polipéptido-pancreático, que no aparecen en los islotes más pequeños y en algunos de los intermedios. La coexistencia de péptidos semejantes a glucagón y a polipéptido pancreático en las células endocrinas pancreáticas se ha demostrado en fetos humanos, ratón adulto y anfibios, pero no, hasta ahora, en peces. El significado exacto de este hecho no se conoce aunque se ha sugerido que puede deberse a la presencia de un común precursor para péptidos semejantes a glucagón y a polipéptido pancreático o a la presencia de precursores separados para ambos péptidos, codificados por diferentes genes.

La distribución celular y las asociaciones anatómicas entre los distintos tipos celulares de los islotes endocrinos pancreáticos pueden tener un significado fisiológico. Diversos resultados señalan que la somatostatina y el polipéptido pancreático regulan la secreción de las células adyacentes en mamíferos, aves y teleósteos por medio de una acción directa o paracrina, control que las células con somatostatina y polipéptido pancreático pueden ejercer a cierta distancia por medio de sus largas prolongaciones. El dimorfismo de las células con somatostatina de algunos teleósteos puede deberse a una adaptación morfofuncional en relación con las células de insulina y glucagón, cuya secreción es inhibida por la somatostatina.

La correlación entre los resultados inmunocitoquímicos, que



informan de la distribución de los distintos tipos celulares del páncreas endocrino de teleósteos, y los ultraestructurales ha hecho posible la caracterización celular, principalmente por la morfología de los gránulos de secreción. Los de las células B tienen un centro denso redondeado, fibrilar o paracrystalino. Los gránulos de las células A son redondeados con un centro denso poliédrico dentro de una matriz finamente granular, siempre separada de la membrana limitante por un halo claro. También pueden encontrarse otros con centros densos redondeados, que son los que predominan en algunas especies de teleósteos, o con varios centros densos.

Las células D de teleósteos o células con somatostatina se caracterizan por presentar gránulos con contenido homogéneo de baja electrono-densidad o con centros densos separados de la membrana limitante por un estrecho halo claro. Las células con somatostatina se han identificado en alguna especie con la técnica PAP adaptada para microscopía electrónica, destacando por la escasez y el pequeño tamaño de sus gránulos de secreción que se disponen preferentemente en la periferia celular.

Las células PP no se identificaron como un cuarto tipo celular del páncreas de teleósteos hasta que se obtuvo el antisuero correspondiente y se realizaron las técnicas inmunocitoquímicas. Con microscopía electrónica se consideraron células B o se incluían en algún otro tipo celular diferente de los bien determinados A, B y D. En la mayoría de las especies las células PP se caracterizan por el pequeño tamaño de sus gránulos aunque, como se ha demostrado con inmuno-electronmicroscopía en algunos casos, pueden ser mayores que los de los otros tipos celulares.

## CONCLUSION

La revisión que acabamos de realizar pone de manifiesto, en primer lugar, la complejidad y variabilidad del sistema endocrino gastro-entero-pancreático de los peces teleósteos. Es evidente que los resultados obtenidos hasta ahora no son definitivos puesto que no se han podido utilizar antisueros específicos en los estudios inmunocitoquímicos, por lo que sólo podemos considerar la existencia de sustancias similares, no idénticas, a las hormonas de mamíferos. También se deduce que la aparición de



ciertas hormonas y su diferente localización en el tracto digestivo o en los islotes pancreáticos pueden tener un significado filogenético. La investigación actual en este campo centra su interés en dos aspectos importantes, uno relacionado con el desarrollo de los conocimientos básicos y otro con su posible aplicación en acuicultura, en relación con problemas de nutrición y metabólicos. Será necesario comprobar la presencia de las nuevas hormonas que, con un ritmo continuado, se están aislando en mamíferos, así como conseguir las hormonas de peces y sus anticuerpos. Es importante establecer el momento de aparición de cada tipo celular en el curso del desarrollo así como las modificaciones que puedan causar los distintos agentes ambientales. Las líneas futuras de actuación para un conocimiento en profundidad del sistema GEP de teleósteos han de ser contempladas en un contexto de interdisciplinaridad, ya que abarcan aspectos tan diversos como los fisiológicos, bioquímicos e inmunológicos, todos ellos dentro de un marco citohistológico.

## BIBLIOGRAFIA

- ABAD, M. E., AGULLEIRO, B. and ROMBOUT, J. H. W. M. (1986). An immunocytochemical and ultrastructural study of the endocrine pancreas of *Sparus auratus* L. (Teleostei). Gen. Comp. Endocrinol. (En prensa.)
- ABAD, M. E., PEEZE BINKHORST, F. M., ELBAL, M. T., ROMBOUT, J. H. W. M. (1986). A comparative immunocytochemical study of the gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system in a stomachless and stomach-containing Teleost. Gen. Comp. Endocrinol. (En prensa.)
- ALUMETS, J., SUNDLER, F. and HAKANSON, R. (1977). Distribution, ontogeny and ultrastructure of somatostatin immunoreactive cells in the pancreas and gut. Cell Tissue Res., 185, 465-479.
- BENCOSME, S., MEYER, J., BERGMAN, B. J. and MARTINEZ-PALOMO, A (1965). The principal islet of the bullhead fish (*Ictalurus nebulosus*). Rev. Can. Biol., 24, 141-154.
- BOQUIST, L. and PATENT, G. (1971). The pancreatic islets of the teleost *Scorpaena scropha*. Z. Zellforsch., 115, 416-425.
- BRINN, J. (1975). Pancreatic islets cytology of Ictaluridae (Teleostei). Cell Tissue Res., 162, 357-365.
- BRINN, J. and EPPLÉ, A. (1972). Structure and ultrastructure of the specialized islet organ of the american eel, *Anguilla rostrata*. Anat. Rec., 172: 277.
- CARRILLO, M., ZANUY, S., DUVE, H., and THORPE, A. (1986). Identification of hormone-producing cells of the endocrine pancreas of the sea bass, *Dicentrarchus labrax*, by ultrastructural immunocytochemistry. Gen. Comp. Endocrinol., 61, 287-301.
- DOCKRAY, G. J. (1974). Extraction of a secretin-like factor from the intestine of pike *Esox lucius*. Gen. Comp. Endocrinol., 23, 340-347.
- DUBOIS, M. P., BILLARD, R., and BRETON, B. (1978). Use of immunofluorescence for localization of somatostatin-like antigen in the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). Comparative distribution of LH-RF and neurophysin. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 18, 843-851.
- DUBOIS, M. P., BILLARD, R., BRETON, R., and PETER, R. E. (1979). Comparative distribution of somatostatin, LH-RH, neurophysin and  $\alpha$ -endorphin in the rainbow trout: and immunocytological study. Gen. Comp. Endocrinol. 37, 220-232.
- ELBAL, M. T., and AGULLEIRO, B. (1986). A histochemical and ultrastructural study of the gut of *Sparus auratus* (Teleostei). J. Submicrosc. Cytol., 18, 335-348.
- ELBAL, M. T., and AGULLEIRO, B. (1986). An immunocytochemical and ultrastructural study of endocrine cells in the gut of teleost fish, *Sparus auratus* L. Gen. Comp. Endocrinol. (En prensa.)
- ELBAL, M. T., and AGULLEIRO, B. (1986). Estudio histoquímico y ultraestructural del tracto digestivo de *Mugil saliens* (Teleosteo). Acta microscópica. (En prensa.)
- ELBAL, M. T., LOZANO, M. T., AGULLEIRO, B. (1986). The endocrine cells of the gut of *Mugil auratus*. An immunocytochemical and ultrastructural study. Gen. Comp. Endocrinol. (En prensa.)
- EPPLÉ, A. (1969). The endocrine pancreas. In: «Fish physiology». Hoar W. S. and Randall D. J. eds., Academic Press, New York.
- EPPLÉ, A., and BRINN, J. E. (1975). Islet histophysiology: evolutionary correlations. Gen. Comp. Endocrinol., 27, 320-349.
- FOUCHEREAU-PERON, M., LABURTHE, M., BESSON, J. R., ROSSELIN, G., and LEE

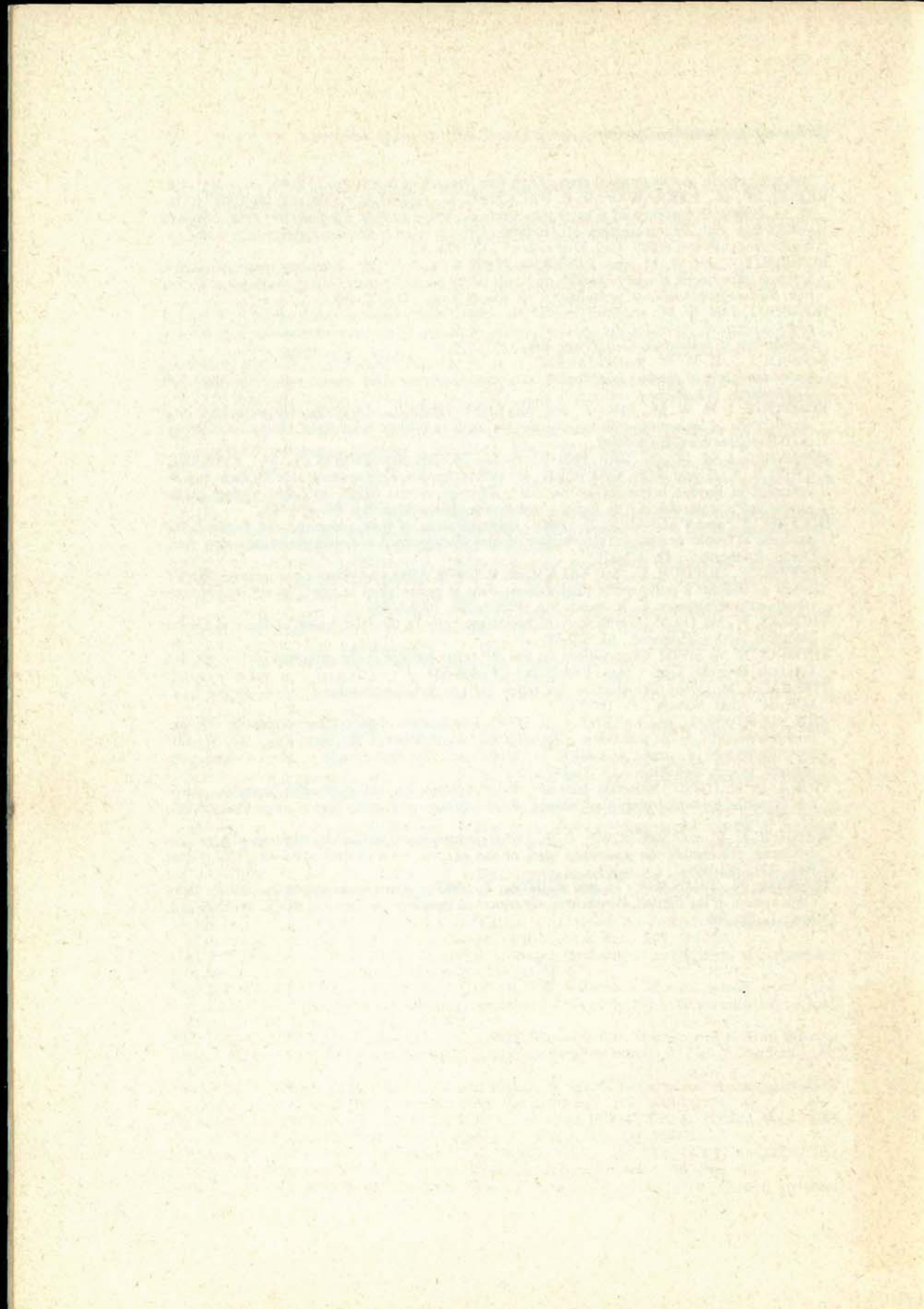


- GAL, Y. (1980). Characterization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the gut of fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 65, 489-492.
- GABE, M. and MARTOJA, M. (1971). Données histologiques sur les cellules endocrines, gastriques et pancréatiques de *Mugil auratus* (Téléostéen, Mugiliforme). *Arch. Anat. Microsc.*, 60, 15-32.
- HOLMGREN, S., VAILLANT, C., and DIMALINE, R. (1982). VIP-, substance P-, gastrin/CCK-, bombesin-, somatostatin- and glucagon-like immuno-reactivities in the gut of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.*, 223, 141-153.
- JOHNSON, D. E., TORRENCE, J. L., ELDE, R. P., BAUER, G. E., NOE, B. D. and FLETCHER, D. J. (1976). Immunohistochemical localization of somatostatin, insulin and glucagon in the principal islets of the anglerfish (*Lophius americanus*) and the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Am. J. Anat.*, 147, 119-124.
- JOHNSON, D. E., NOE, B. D. and BAUER, G. E., (1982). Pancreatic polypeptide (PP)-like immunoreactivity in the pancreatic islets of the anglerfish (*Lophius americanus*) and the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Anat. Rec.*, 204, 61-67.
- KLEIN, C. (1977). Ultrastructural and cytochemical bases for the identification of cell types in the endocrine pancreas of teleosts. *Int. Rev. Cytol., Suppl.*, 6, 289-346.
- KLEIN, C., and LANGE, R. H. (1977). Principal cell types in the pancreatic islet of a teleost fish, *Xiphophorus helleri* H. A correlative light and electron microscopical investigation. *Cell Tissue Res.*, 176, 529-552.
- KLEIN, C. and VAN NOORDEN, S. (1980). Use of immunocytochemical staining of somatostatin for correlative light and electron microscopic investigation of D cells in the pancreatic islet of *Xiphophorus helleri* H. (Teleostei). *Cell Tissue Res.*, 194, 399-404.
- KLEIN, C. and VAN NOORDEN, S. (1980). Pancreatic polypeptide (PP) and glucagon cells in the pancreatic islet of *Xiphophorus helleri* H. (Teleostei). Correlative immunohistochemistry and electron microscopy. *Cell Tissue Res.*, 205, 187-198.
- KOBAYASHI, K. and TAKAHASHI, Y. (1970). Light and electron microscope observations on the islets of Langerhans in *Carassius carassius longsdorffii*. *Arch. Histol. Jpn.*, 31, 433-454.
- KOBAYASHI, K. and TAKAHASHI, Y. (1974). Fine structure of Langerhans islet cells in a marine teleost *Conger japonicus* Bleeker. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 23, 1-18.
- KOBAYASHI, K., SHIBASAKI, S. and TAKAHASHI, Y. (1976). Light and electron microscopic study on the endocrine cells of the pancreas in a marine teleost *Fugu rubripes rubripes*. *Cell Tissue Res.*, 174, 161-182.
- KUDO, S., and TAKAHASHI, Y. (1973). New cell types of the pancreatic islets in the crucian carp, *Carassius carassius*. *Z. Zellforsch.* 146, 425-438.
- LANGER, M., VAN NOORDEN, S., POLAK, J. M. and PEARSE, A. G. E. (1970). Peptide hormone-like immunoreactivity in the gastro-intestinal tract and endocrine pancreas of eleven teleost species. *Cell Tissue Res.*, 199, 493-508.
- L'HERMITE, A., FERRAND, R., DUBOIS, M. P. and ANDERSEN, A. C. (1985). Detection of endocrine cells by immunofluorescence method in the gastroenteropancreatic system of the adult eel, glass-eel, and leptocephalic larva (*Anguilla anguilla* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 58, 347-359.
- LOZANO, M. T., and AGULLEIRO, B. (1986). Immunocytochemical and ultrastructural study of the endocrine pancreas of *Mugil auratus* and *Mugil saliens* L. (Teleostei). *J. Submicrosc. Cytol.*, 18, 85-98.
- MCNEILL, D. L., BRINN, J. E., and FLETCHER, D. J. (1984). An immunocytochemical study of the pancreatic islet system of the channel catfish. *Anat. Rec.*, 209, 381-384.
- NAKAMURA, M., and YOKOTE, M. (1971). Ultrastructural studies on the islets of Langerhans of the carp. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.*, 134, 61-72.
- NOAILLAC-DEPEYRE, J., and HOLLANDE, E. (1981). Evidence of somatostatin, gastrin and pancreatic polypeptide-like substances in the mucosa cells of the gut in fishes with and without stomach. *Cell Tissue Res.*, 216, 193-203.
- NOAILLAC-DEPEYRE, J., and GAS, N. (1982). Ultrastructure of endocrine cells in the stomach of two teleost fish, *Perca fluviatilis* L. and *Ameiurus nebulosus* L. *Cell Tissue Res.*, 221, 657-678.
- NOE, B. D., SPIESS, J., RIVIER, J. E., and VALE, W. (1979). Isolation and characterization of somatostatin from anglerfish pancreatic islets. *Endocrinology*, 105, 1410-1415.
- OYAMA, H., BRADSHAW, R. A. BATES, O. W., and PERMUTT, A. (1980). Amino acid sequence of catfish pancreatic somatostatin I. *J. Biol. Chem.*, 225, 2251-2254.
- OYAMA, H., MARTIN, J., SUSSMAN, K., WEIR, G. C., and PERMUTT, A. (1981). The biological activity of catfish pancreatic somatostatin. *Regul. Pept.* 1, 387-396.
- REIFEL, C. W., MARIN-SORENSEN, M., and SAMLOF, I. M. (1983). Gastrin immuno-

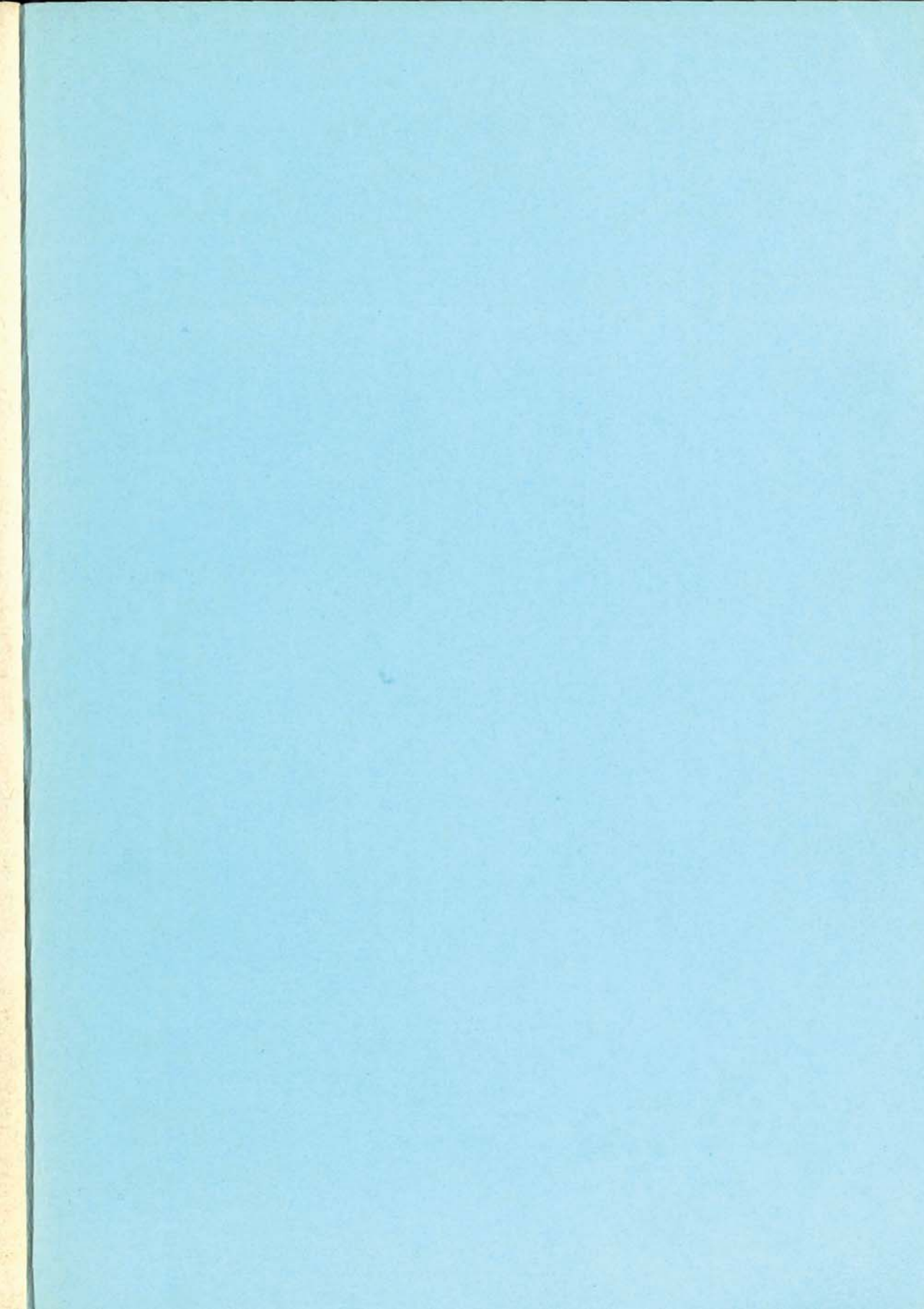


- reactive cells in gastrointestinal tracts from four species of fish. *Can. J. Zool.*, 61, 1461/1468.
- REINECKE, M., CARRAWAY, R. E., FALKMER, S., FEURLE, G. E., and FORSSMANN, W. G. (1980). Occurrence of neurotensin-immunoreactive cells in the digestive tract of lower vertebrates and deuterostomian invertebrates. A correlated immunohistochemical and radioimmunochemical study. *Cell Tissue Res.*, 212, 173-183.
- ROMBOUT, J. H. W. M. and TAVERNE-THIELE, J. J. (1982). Immunocytochemical and electron microscopical study of endocrine cells in the gut and pancreas of a stomachless teleost fish, *Barbus conchonioides* (Cyprinidae). *Cell Tissue Res.*, 227, 577-593.
- ROMBOUT, J. H. W. M., RADEMAKERS, L. H. P. M., and VAN HESS, J. P. (1984). Immunohistochemical localization of (neuro) peptide hormones in endocrine cells and nerves of the gut of a stomachless teleost fish, *Barbus conchonioides* (Cyprinidae). *Cell Tissue Res.*, 237, 57-65.
- ROMBOUT, J. H. W. M., RADEMAKERS, L. H. P. M., and VAN HESS, J. P. (1979). Pancreatic endocrine cells of *Barbus conchonioides* and their relation to the enteroendocrine cells. *Cell Tissue Res.*, 203, 9-23.
- ROMBOUT, J. H. W. M., BOL, J., and TAVERNE-THIELE, J. J. (1986). Ultrastructural characterization of immunoreactive enteroendocrine cells in *Barbus conchonioides* (Teleostei, Cyprinidae). *Histochemistry* (En prensa).
- ROMBOUT, J. H. W. M., GRINTEN, C. P. M., PEEZE BINKHORST, F. M., TAVERNE-THIELE, J. J., and SCHOONEVELD, H. (1986). Immunocytochemical identification and localization of peptide hormones in the gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system of the mouse and a stomachless fish, *Barbus conchonioides*. *Histochemistry*, 84: 471-483.
- STEFAN, Y., and FALKMER, S. (1980). Identification of four endocrine cell types in the pancreas of *Cottus scorpius* (Teleostei) by immunofluorescence and electron microscopy. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 42, 171-178.
- STEFAN, Y., DUFOUR, C., and FALKMER, S. (1978). Mise en évidence par immuno-fluorescence de cellules à polypeptide pancréatique dans le pancréas et le tube digestif de poissons osseux et cartilagineux. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 286, 1073-1075.
- THOMAS, N. W. (1970). Morphology of endocrine cells in the islet tissue of the cod *Gadus callarias*. *Acta Endocrinol.*, 63, 679-695.
- THOMAS, N. W. (1975). Observations on the cell types present in the principal islet of the dab *Limanda limanda*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 26, 496-503.
- TITLBACH, M. (1966). Feinstruktur des zellen der Langerhansschen bei *Cyprinus carpio* L. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, 75, 184-197.
- VAN NOORDEN, S., and PATENT, G. J. (1978). Localization of pancreatic polypeptide (PP)-like immunoreactivity in the pancreatic islets of some teleost fishes. *Cell Tissue Res.*, 188, 521-525.
- VAN NOORDEN, S., and FALKMER, S. (1980). Gut-islets endocrinology. Some evolutionary aspects. *Invest. Cell Pathol.*, 3, 21-35.
- VIGNA, S. R. (1979). Distinction between cholecystokinin-like and gastrin-like biological activities extracted from gastrointestinal tissues of some lower vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 39, 512-520.
- WAGNER, G. F., and McKEOWN, B. A. (1981). Immunocytochemical localization of hormone-producing cells within the pancreatic islets of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Cell Tissue Res.*, 221, 181-192.
- YOSHIDA, K., IWANAGA, T., and FUJITA, T. (1983). Gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system of the flatfish, *Paralichthys olivaceus*: an immunocytochemical study. *Arch. Histol. Jpn.*, 2, 259-266.













UNIVERSIDA  
Bibliotec  
Esp

D

8

8