

16

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Patología Animal II

Unidad Docente de Histología y Anatomía Patológica

**ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO DE LA
GASTRINA EN EL PERRO. DETERMINACIÓN DE
SUS VARIACIONES FISIOLÓGICAS EN SUERO
MEDIANTE RADIOINMUNOENSAYO**

JUAN ALBERTO GALÁN TORRES

**Memoria presentada para optar al
grado de Doctor en Veterinaria.**

Madrid, 1995

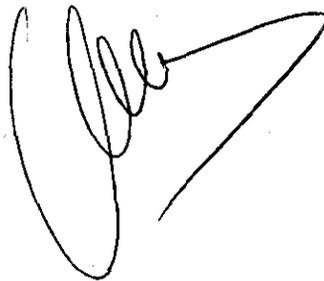
D. José Luis González Arribas, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid y

D. Patrocinio Moratinos Palomero, Jefe de la Unidad de Anatomía Patológica Experimental del Hospital Militar Central "Gómez Ulla" de Madrid

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **Estudio inmunocitoquímico de la gastrina en el perro. Determinación de sus variaciones fisiológicas en suero mediante radioinmunoensayo**, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria D. JUAN ALBERTO GALAN TORRES, se ha realizado en el Servicio de Microbiología y Análisis Clínicos (Sección de Anatomía Patológica) del Centro Militar de Veterinaria, en el Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Militar "Gómez Ulla" y en la Cátedra de Histología de la Facultad de Medicina de Alcalá de Henares (Madrid), bajo nuestra dirección.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, firmamos la presente en Madrid a 25 de Mayo de 1995.



"...que bien sé lo que son tentaciones del demonio y que una de las mayores es ponerle a un hombre en el entendimiento que puede componer y imprimir un libro..."

Miguel de Cervantes. (Pról. 2ª parte del Quijote).

" La voluntad es fundamental, pues la acción, el trabajo, sigue siempre a la voluntad, y casi siempre el trabajo lleva al éxito como compañero de viaje."

Louis Pasteur.

A Eli,

por su estímulo constante, amor y comprensión.

Con cariño y profunda admiración.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento al Prof.Dr.D. José Luis González Arribas, profesor del Departamento de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de Madrid y al Prof.Dr.D. Patrocinio Moratinos Palomero, Jefe de la Unidad de Anatomía Patológica Experimental del Hospital Militar Central "Gómez Ulla" (Madrid), por la dirección de este trabajo. El interés que han demostrado y sus buenos consejos han supuesto un gran estímulo en mi formación profesional.

Mi especial reconocimiento al Cte. de Sanidad D. Ángel Aguilera Martínez por su decisiva ayuda en el tratamiento informático para la presentación de este trabajo.

A los compañeros veterinarios y auxiliares especialistas de veterinaria del Servicio de Medicina y Cirujía Experimental (H.M.C. "Gómez-Ulla"), por su apoyo y en particular a D. Carlos Gutiérrez Ortega, biólogo, por su valiosa colaboración en el manejo y recogida de las muestras y su buena disposición en todo momento demostrada. Igualmente, a los auxiliares de veterinaria Brigs.D. José Luis Gómez Rivero y D. Félix Mellado Robledo.

A D. Fernando Rosales Matías, químico, del Servicio de Medicina Nuclear (H.M."Gómez Ulla"), por su trabajo en el procesado de los sueros por radioinmunoensayo.

También y muy especialmente al Prof. Dr. González Santander, Catedrático de Histología (Departamento de Ciencias Morfológicas y Cirugía) de la Facultad de Medicina de Alcalá de Henares (Madrid), a la Dra. Toledo Lobo y a D. Javier Martínez Alonso del laboratorio de dicha cátedra, por su asesoramiento y eficaz puesta a punto de la técnica de

marcaje ultraestructural.

A mi familia, en especial a mi mujer Eli y mis hijos César y Laura, cuyo apoyo ha sido decisivo para superar las dificultades de este trabajo, por haber sabido entregar parte del tiempo que les correspondía. Y a mis padres, por su dedicación en mi formación humana y profesional.

A la Unidad Docente de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de Madrid. a la Dirección del Centro Militar de Veterinaria, por su favorable acogida, y a todos mis compañeros del Servicio de Microbiología y Análisis Clínicos, en particular a mi amiga y colaboradora Alicia Serrano.

A D. Pedro Roiz Viaño, del departamento técnico de Imico, cuya puntual información y disponibilidad han quedado bien patentes a lo largo de este trabajo.

Asimismo, al Dr.D. Miguel Rubio Herrera por la elaboración de las gráficas y al Cap. de Sanidad D. Fernando Pérez-Íñigo por su valiosa colaboración.

También a los veterinarios militares destinados en las Unidades donde se han realizado la toma de las muestras para este estudio, y muy especialmente a los compañeros Pérez Romero, Merino Díaz y Navarro de Hago.

Finalmente, agradecer la labor de muchas personas que, permaneciendo en el anonimato, han colaborado de un modo u otro en la realización de este trabajo.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. JUSTIFICACIÓN DE ESTE TRABAJO.	2
1.2. OBJETIVOS.	6
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. LA GASTRINA	8
2.1.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS PRODUCTORAS DE GASTRINA.	13
2.1.2. MECANISMO DE LIBERACIÓN.	17
2.1.3. ACCIONES DE LA GASTRINA.	27
2.1.4. ELIMINACIÓN.	30
2.1.5. VALORES NORMALES DE GASTRINA EN SUERO.	30
2.1.6. VALORES PATOLÓGICOS.	33
2.1.7. BASES ANATOMOTOPOGRÁFICAS Y FUNCIONALES.	35
3. MATERIAL Y MÉTODOS	40
3.1. TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS	41
3.1.1. ANIMALES EMPLEADOS EN EL ESTUDIO.	41
3.1.2. METODOLOGÍA DEL SACRIFICIO	41
3.1.3. METODOLOGÍA DE LA NECROPSIA	41
3.1.4. MATERIAL PARA EL ESTUDIO HISTOLÓGICO.	42
3.1.5. MATERIAL PARA INMUNOCITOQUÍMICA ÓPTICA.	43
3.1.6. MATERIAL PARA INMUNOCITOQUÍMICA ELECTRÓNICA.	45
3.1.6.a Material para la técnica de inmuno-oro coloidal	45
3.1.7. MATERIAL DIVERSO DE LABORATORIO.	46
3.2. TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS PARA MICROSCOPIA	

ÓPTICA	48
3.2.1. INTRODUCCIÓN	48
3.2.2. MÉTODO DE ESTREPTAVIDINA-BIOTINA- PEROXIDASA (SBP)	51
3.2.2.a. Preparación	51
3.2.2.b. Descripción de la técnica	51
3.2.3. MÉTODO DE INMUNO-ORO COLOIDAL-PLATA (IgGGS).	54
3.2.3.a. Técnica de marcaje con oro coloidal	54
3.2.3.b. Realzado con plata	55
3.3. TÉCNICA INMUNOCITOQUÍMICA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.	57
3.3.1. MÉTODO DE ORO COLOIDAL CONJUGADO	57
3.4. TÉCNICA DE RADIOINMUNOENSAYO (RIA)	67
3.4.1. INTRODUCCIÓN	67
3.4.2. MATERIAL EMPLEADO	68
3.4.2.a. Animales empleados en el estudio	68
3.4.2.b. Material de extracción de sangre	69
3.4.2.c. Material para radioinmunoensayo	70
3.4.3. MÉTODO DE RADIOINMUNOENSAYO	71
3.4.4. MÉTODO ESTADÍSTICO	76
3.4.5. TABLAS DE COMPOSICIÓN DE DIETAS	77
4. RESULTADOS	81
4.1. INMUNOCITOQUÍMICA EN MICROSCOPIA ÓPTICA	82
4.1.1. LOCALIZACIÓN DE LAS CÉLULAS G EN EL PERRO	82
4.1.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS CÉLULAS G	82
4.1.3. DENSIDAD CELULAR EN LA MUCOSA PILÓRICA	88

4.2. INMUNOCITOQUÍMICA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA . . .	90
4.2.1. ULTRAESTRUCTURA DE LA CÉLULA G.	90
4.2.2. INMUNOMARCADO ULTRAESTRUCTURAL	93
4.2.3. GRÁNULOS DE SECRECIÓN DE GASTRINA.	93
4.3. RADIOINMUNOANÁLISIS DE GASTRINA	99
4.3.1. CONCENTRACIONES BASALES DE GASTRINA	
SÉRICA.	99
4.3.2. CONCENTRACIONES BASALES DE GASTRINA	
SEGÚN EDAD Y SEXO.	102
4.3.3. VALORES DE GASTRINA A LOS 30' DE LA INGESTA .	106
4.3.4. CURVAS DE GASTRINA SEGÚN TIPO DE	
ALIMENTACIÓN.	109
5. DISCUSIÓN	113
5.1. VALORACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE TRABAJO.	114
5.1.1. TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS	114
5.1.2. TÉCNICA DE RADIOINMUNOENSAYO	125
5.2. VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS	128
5.2.1. INMUNOHISTOQUÍMICA ÓPTICA.	128
5.2.2. INMUNOCITOQUÍMICA ELECTRÓNICA.	130
5.2.3. RADIOINMUNOENSAYO.	133
6. CONCLUSIONES.	137
7. RESUMEN.	140
8. SUMMARY	144
9. BIBLIOGRAFÍA	149

1. INTRODUCCIÓN

1.1. JUSTIFICACIÓN DE ESTE TRABAJO.

La gastrina es una hormona polipeptídica gastrointestinal que desempeña un importante papel en la fisiología digestiva. Es el principal agente regulador de la secreción ácida del estómago (Bauer, 1986; De Groot, 1989; Fernández-Tresguerres, 1989; Harrison, 1991; Smith y Price, 1991).

Se han realizado diversos estudios inmunocitoquímicos sobre la distribución de células endocrinas en mamíferos: en el cerdo (Ito y cols. 1987), gato (Kitamura y cols. 1982), caballo (Kitamura y cols. 1984), oveja (Franco y cols. 1993), musaraña (Kitamura y cols. 1990), en aves (Alison, 1989), en roedores (Kapur, 1982a) y en el perro (Tobe y cols. 1976; Galán y cols. 1993). No obstante, la ubicación de las células productoras de gastrina (células G), o de formas precursoras de la hormona, en el tubo digestivo y sus glándulas anejas, ha sido objeto de controversia tanto en el hombre como en el perro (Accary y Bonfils, 1973; Nilsson y cols. 1973; Stanley y cols. 1976; Tobe y cols. 1976; Hawkins y cols. 1987; Bardram y cols. 1990).

La presencia de tumores secretores de gastrina generalmente de localización pancreática, aunque en muy raras ocasiones puede tener otras localizaciones (Smith y cols. 1991; Larriva-Sahd y cols. 1992; Polak y Priestley, 1992; Hirai y cols. 1993), provoca el denominado síndrome de Zollinger-Ellison, que ha sido reconocido también en el perro (Happe y van der Gaag, 1980; Drazner, 1981, Shaw, 1988). En el páncreas también pueden aparecer otros tipos de tumores secretores (Gross y cols. 1990; Skarda y cols. 1994) frente a los que es necesario realizar un diagnóstico inmunocitoquímico diferencial.

Por otro lado, existe la posibilidad de que en determinadas condiciones puedan aparecer centros gástricos extragástricos (Accary y Bonfils, 1973; Duvaux y Ponter-Duvaux, 1993) así como la posibilidad de inhibición de la expresión del gen gastrina por somatostatina (Karnik y cols. 1989). El aumento patológico de células G es causa de elevación de gastrinemia (Walsh, 1975; Smith, 1991) provocando síntomas clínicos que deben ser diferenciados de otras patologías.

Las modernas técnicas inmunocitoquímicas permiten poner de manifiesto cantidades realmente pequeñas de sustancias (enzimas, hormonas..) presentes en las células gracias a los procedimientos de amplificación de señal de los métodos indirectos utilizados en microscopía óptica que confieren una alta sensibilidad (Danscher y Nørgaard, 1983; Springall y cols. 1984; Su-Ming y Raine, 1984; Bruce Savage, 1986; Carlei y cols. 1993).

Por todo lo anterior pensamos que sería de especial interés el reconocimiento de las células productoras de gastrina inmunoreactiva y la densidad celular en condiciones normales en el aparato digestivo del perro.

Desde las primeras descripciones del método inmunocoloidal de Faulk y Taylor en 1971, diversos autores han estudiado la ultraestructura de las células G en el hombre (Bucham y Polak, 1979; Varndell y cols. 1983; Morrison, 1984; Polak y Priestley, 1992; Canberk, 1992), en pequeños rumiantes (Arnal y cols. 1986), en reptiles (Burrell y cols. 1992), en la rata (Oomori y cols. 1993); así como otros tipos de células endocrinas en équidos (Nieto y cols. 1987), roedores (Kapur 1982b) y cápridos (Sánchez y cols. 1992). No obstante, no tenemos referencias de una descripción detallada de estas células en el perro.

Para la identificación ultraestructural es necesario el inmunomarcado con metales pesados, dado que puede existir confusión con otros tipos de células secretoras endocrinas (Dobbins y Austin, 1991). Nosotros hemos estudiado mediante inmunocitoquímica ultraestructural la célula G en el perro y la influencia del pH en el mecanismo de secreción (Galán y cols. 1995).

La técnica para inmunocitoquímica electrónica, aunque en principio es más sencilla que la técnica para microscopía óptica, presenta sin embargo unos problemas prácticos en su aplicación (Hayat, 1989; Bullock y Petrusz, 1989; Polak y Priestley, 1992; Scala y cols. 1992), siendo el principal la buena preservación y visualización del antígeno sin gran detrimento de la estructura celular (Bendayan y cols. 1987; González y cols. 1994).

Algunos autores señalan la inmunocitoquímica ultraestructural como una técnica tan sensible como el radioinmunoensayo (Moriarty y cols. 1973).

Por otro lado, en el aspecto clínico, la determinación de gastrina sérica en pequeños animales mediante radioinmunoensayo, está indicada en el vómito crónico, diarrea, pérdida ponderal, sospecha de gastrinoma o gastrorragia de etiología desconocida (Willard y cols. 1993).

Las causas más frecuentes de hipergastrinemia son las úlceras gastroduodenales, la obstrucción gástrica, el fallo renal y el gastrinoma. La gastritis atrófica, la hiperplasia de células G antrales, el síndrome de intestino corto, el hiperparatiroidismo (Todd-Sanford-Davidsohn, 1984) y en algunos casos la insuficiencia hepática, son cuadros clínicos menos frecuentes que cursan también con elevaciones de gastrina en suero.

El empleo terapéutico de antiácidos que bloquean los receptores H_2 , como la cimetidina y omeprazol, aumentan los niveles de gastrina en sangre (Hansky y cols. 1979; Bauer, 1986; Sans-Sabrafen, 1988; Fernández-Tresguerres, 1989; Smith y Price, 1991; Willard y cols. 1993).

La técnica de radioinmunoensayo requiere tiempo y personal especializado, pero proporciona una muy alta sensibilidad y especificidad (Lehninger, 1980; Kaplan y Pesce, 1986).

Desde que Accary y Bonfils en 1973 emplearon la técnica de radioinmunoensayo para la determinación de gastrina humana y Walsh en 1975 profundizó en su significación clínica, diversos autores han aplicado dicha técnica para la determinación de esta hormona en el perro (Catambrone y cols. 1980; Gabbert y cols. 1984; Fox y cols. 1990), utilizando en todos los casos gastrina-17 humana sintética. Estos trabajos han sido realizados sobre un reducido número de animales y sin tener en cuenta posibles variaciones fisiológicas en relación con la edad y el sexo.

Por otro lado, en los últimos años la alimentación canina ha experimentado unos cambios muy evidentes en cuanto a componentes, elaboración y presentación, que se alejan de lo que realmente sería la dieta natural de un animal carnívoro.

Pensamos que es necesario establecer los valores fisiológicos de gastrina sérica que puedan servir de referencia para evaluar algunas patologías que cursan con aumentos más o menos marcados de esta hormona en el perro.

1.2. OBJETIVOS.

Los objetivos fundamentales de esta tesis son:

1.- Determinar, mediante el empleo de dos técnicas inmunohistoquímicas indirectas, la localización de las células G productoras de gastrina inmunoreactiva en el perro.

2.- Determinar la densidad de este tipo celular en la mucosa gástrica del perro.

3.- Estudiar las características morfológicas ultraestructurales de la célula G, identificándola mediante marcado inmunocitoquímico para microscopía electrónica.

4.- Determinar los niveles fisiológicos basales de gastrinemia en el perro.

5.- Estudiar las posibles variaciones fisiológicas de la concentración de gastrina en suero en relación con la edad y el sexo.

6.- Determinar la respuesta a los 30 minutos de la ingestión de alimentos de diferente composición y establecer curvas de gastrinemia en relación a éstos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. LA GASTRINA.

El tracto gastroduodenal contiene una amplia variedad de células endocrinas, denominadas colectivamente sistema "APUD" (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation), concepto introducido por Pearse en 1968.

Estas células, que también se encuentran en los islotes pancreáticos, poseen unas características comunes como son su alto contenido en aminas fluorecénicas como las catecolaminas, 5-hidroxitriptófano, etc., su capacidad de captación de aminas precursoras y su descarboxilación y la presencia de esterases o colinesterasas inespecíficas (Sánchez y col. 1984). Este tipo celular parece proceder de las células ectodérmicas de la cresta neural (Drazner, 1981; Banks, 1993).

Hasta el presente más de 30 tipos celulares, repartidos en dos grupos, han sido asignados al sistema APUD (Morrison, 1984; Banks, 1993). Las células G por su carácter neuroendocrino periférico pertenecen al grupo II (Sánchez y cols. 1984).

Recientes evidencias sugieren que algunos de los polipéptidos gastrointestinales producidos en estas células pueden no actuar como hormonas circulantes clásicas, pero en el instante en que son liberadas localmente actúan sobre los tejidos adyacentes (función paracrina) (De Groot, 1989).

Algunos péptidos reguladores del intestino están contenidos exclusivamente en células tipo endocrino: péptido inhibitorio gástrico (GIP), gastrina, enteroglucagón, insulina, etc., mientras que otros han sido identificados en células nerviosas únicamente: neuropéptido, péptido liberador de gastrina, péptido intestinal vasoactivo (VIP). Un tercer grupo ha sido encontrado en neuronas y células endocrinas: sustancia P, colecistoquinina y somatostatina (DeGroot, 1989).

Péptidos relacionados con gastrina se han puesto de manifiesto en neuronas vagales, células de la pituitaria, mucosa bronquial y en células espermáticas humanas (Schalling y

cols. 1990).

Aunque Bayliss y Starling postularon en 1902 la hipótesis de la existencia de la gastrina, ésta no fue comprobada hasta 1964 en que se aisló en estado puro a partir de la mucosa gástrica del cerdo (Bauer, 1986).

La gastrina, secretina, colecistoquinina (CCK), enteroglucagón, polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), polipéptido inhibitorio gástrico (GIP), somatostatina, motilina y otros, tienen efecto sobre la función gastroenteropancreática (Harrison, 1991).

La gastrina, hormona polipeptídica reguladora gastrointestinal, descubierta por John Sydney Edkins (1863-1940) en 1905 (Smith y Price, 1991) y determinada su secuencia de aminoácidos por Gregory y Tracy en 1964 (Tobe y cols. 1976), es el más potente estimulante de los conocidos de la secreción ácida del estómago (Harrison, 1991; Smith, 1991).

Los péptidos reguladores gastrointestinales en las células endocrinas del intestino son sintetizados en el retículo endoplásmico (ribosomas), como proteínas precursoras, divididas enzimáticamente en fragmentos de péptidos activos, y transportadas luego al aparato de Golgi para posteriormente ser empaquetadas en gránulos que se acumulan principalmente en la porción basal de la célula (DeGroot, 1989).

Golgi describió en 1898 el sistema de membranas que lleva su nombre utilizando el método de impregnación argéntica. Los estudios realizados posteriormente tienden a demostrar la especialización química y morfológica de las diferentes membranas intracelulares y la existencia de una relación dinámica entre ellas (De Robertis y cols. 1968).

El microscopio electrónico ha incorporado nuevas relaciones entre el complejo de Golgi y la secreción que ya fuera postulada por Cajal en 1914 en sus estudios sobre la

célula caliciforme. Existe una relación entre el retículo endoplásmico rugoso y liso, el complejo de Golgi, los gránulos de secreción y los lisosomas. El retículo endoplásmico está muy desarrollado en células que intervienen activamente en síntesis proteica (Jamieson y Palade, 1967; De Robertis y cols. 1968).

La gastrina se halla en los tejidos y líquidos orgánicos en diversas formas moleculares. La principal, que se encuentra en determinadas poblaciones celulares (células G) de la mucosa antro pilórica, porción proximal de duodeno en el perro adulto (Morrison, 1984), y en las células D pancreáticas en el hombre (Accary y Bonfils, 1973; Stanley y cols. 1976), así como en los gastrinomas, es un heptadecapéptido (G-17) formado por 17 aminoácidos con una región activa situada en la amida tetrapéptido del extremo carboxílico (Try-Met-Asp-Phe-NH₂). (Harrison, 1991).

La denominada gastrina II es la forma que presenta sulfatación en el aminoácido tirosina de la posición 12, siendo la gastrina I la forma no sulfatada (De Groot, 1989).

En determinadas condiciones pueden aparecer centros gastrínicos extragástricos, en particular pancreáticos, por estimulación patológica de origen hipofisario (Accary y Bonfils, 1973). Durante el desarrollo ontogénico pueden observarse la presencia de células propias de un órgano en otro del mismo sistema orgánico (Tsanadis y cols. 1995). Posiblemente, mecanismos de inducción enzimática y/o represión por el producto final, influyen sobre la iniciación de la transcripción de un gen o pequeño grupo de genes estructurales y reguladores. Nilsson, Yalow y Berson (1973) estudiando extractos de tejidos mediante RIA, detectaron pequeñas cantidades de la hormona en tramos posteriores de duodeno, yeyuno, mucosa bucal, lengua y esófago del hombre.

Los tumores productores de gastrina en el páncreas (gastrinomas) procederían de células capaces de expresar el gen gastrina (Bardram y cols. 1990). Según este autor existen indicios de progastrina y sus productos en el páncreas del perro; sin embargo, según otros investigadores, tanto el páncreas juvenil del perro como el adulto no presentan inmunoreactividad para gastrina (Stanley y cols. 1976; Hawkins y cols. 1987; Bardram y

cols. 1990).

En el hombre, la presencia de gastrina en las células D pancreáticas fué comunicada primeramente por Stanley en 1976. Desde entonces esta localización ha sido objeto de controversia.

Mediante estudios inmunohistoquímicos más recientes, se ha detectado la presencia de gastrina en páncreas humano fetal y neonatal; pero no en poblaciones celulares maduras de este órgano (Hawkins y cols. 1987). En gastrinomas se han estudiado diferentes fragmentos de progastrina (Sobhani y cols. 1989).

Diversos tipos de tumores pueden secretar hormonas como ocurre en carcinomas gástricos (Berner y Nesland, 1991), tumores de las células de los islotes secretores de ACTH, tumores pancreáticos secretores de glucagón e insulina (Gross y cols. 1990) -en este órgano algunos tumores pueden presentar receptores hormonales (Skarda y cols. 1994)- carcinomas de tiroides secretantes de ACTH, melanomas secretores de gastrina y adenomas de hipófisis secretores de prolactina (Martinez de la Colina y cols. 1993). Estos síndromes no están bien documentados en animales (Drazner, 1981).

La G-17, de peso molecular 2114 daltons (1 unidad dalton = masa del átomo hidrógeno), representa más del 90% de la gastrina existente en la mucosa antral (Ponter y Duvaux-Ponter, 1993). Sin embargo, alrededor de dos tercios de la gastrina sérica corresponden a formas moleculares más grandes, de 34 aminoácidos, G-34, de pm 7000 (big gastrin) (Yalow y Berson, 1972).

Molécula de gastrina G-17 humana

() Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Trp*-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

Molécula de gastrina G-34

() Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Pro-His-Leu-Val-Ala-Asp-Pro-Ser-Lys-Lys-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr*-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

Según el trabajo de Yu y cols.(1991), la secuencia de aminoácidos del péptido G-17 del perro difiere de la gastrina humana debido a la sustitución de metionina por leucina en la posición 5 del extremo amino y alanina por ácido glutámico en la posición 10.

Molécula de gastrina G-17 canina

() Gln-Gly-Pro-Trp-Met-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Ala-Tyr*-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

Los 17 aminoácidos del extremo carboxílico de G-34 son idénticos a los de G-17 y puede hallarse o no sulfatada (G-34 II o G-34 I). Gantz y cols. (1990) han realizado trabajos de clonación de la secuencia de aminoácidos de la gastrina canina. Existe evidencia de una molécula aún mayor (pm 25000), denominada "big-big gastrin", en pacientes con síndrome de Zollinger-Ellison, que contribuye a la inmunoreactividad total de la gastrina sérica (Yalow y Berson, 1972; Drazner, 1981).

Según otros autores es probable que esta forma no exista, excepto como artificio de los RIA ó en ciertos tumores productores de macromoléculas (Kaplan y Pesce, 1986).

Existe, así mismo, una molécula más pequeña, minigastrina, de 13 aminoácidos (pm 1800). La actividad biológica de la gastrina radica sobre todo en el pentapéptido C-terminal, que ha podido ser sintetizado, y tiene un peso molecular de 768 daltons. Es la denominada pentagastrina, de amplia utilización en terapéutica humana.

La secuencia de los 17 aminoácidos de la molécula básica de gastrina (G-17), se inserta en la big gastrina humana, entre las posiciones 18-34 de esta molécula y la

minigastrina (G-13), entre las posiciones 22-34 de G-34 y 5-17 de G-17 (Walsh, 1975). La forma G-34 es la más abundante en el plasma. La porción C-terminal es igual en todas ellas.

La gastrina 17 de la rata difiere en 3 aminoácidos respecto a la humana; sin embargo la secuencia de los 12 aminoácidos del extremo carboxílico es idéntica (Schaffer y cols. 1982). La G-17 es el mayor componente del tejido antral y la G-34 del intestinal (DeGroot, 1989).

2.1.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS PRODUCTORAS DE GASTRINA.

Las células productoras de gastrina poseen características morfológicas similares a otras células endocrinas. Son piramidales, alojadas entre las bases de las células exocrinas vecinas y con un estrecho extremo apical, que en ocasiones alcanza la luz glandular, presentando microvellosidades (Fawcett, 1989; Polak y Priesley, 1992).

Sus propiedades citoquímicas son las de las células endocrinas secretoras de polipéptidos (serie APUD), a las cuales pertenecen entre otras, las células secretoras de ACTH, las células alfa (glucagón) y las beta (insulina) de los islotes de Langerhans, las células C del tiroides (calcitonina), las células D (somatostatina), así como las células argirófilas (colecistoquinina, pancreozimina), y enterocromafines del intestino delgado (secretina) (Sandritter, 1979; Dellmann, 1993).

Aunque las células productoras de gastrina aparecen dispersas, su número suele ser de 5×10^5 por centímetro cuadrado de mucosa gástrica en el perro (Fawcett, 1989). Graham y cols. (1993) han comunicado una densidad celular en el hombre de 5.3 ± 0.5 células por glándula en 12 individuos considerados normales.

En embriones humanos se observó que estas células endocrinas pueden ser ya detectadas a las 10 semanas de gestación (Facer y cols. 1989). Recientemente, en un

estudio sobre la ontogénesis y distribución de las células G en la oveja Franco y cols. (1993) han comunicado que las primeras células inmunoreactivas aparecen a los 69 y 77 días de gestación en duodeno y antro pilórico respectivamente.

En la oveja, se han identificado células productoras de gastrina en escaso número (aproximadamente 3 células por mm^2) en el yeyuno proximal y en el íleon distal y son morfológica y estructuralmente diferentes de las células G de la mucosa pilórica. Kitamura y cols. (1990), han identificado células de gastrina y otras células endocrinas en la porción terminal del intestino y en recto en un mamífero insectívoro (*Suncus murinus*), cuya significación no está clara.

Los gránulos secretorios de estas células varían entre los 150 y 300 nm. de diámetro (Arnal y cols. 1986).

Springall y cols. (1984), utilizaron técnica de peroxidasa- antiperoxidasa (PAP) e inmuno-oro-plata (IgGGS) para tefir células G de antro pilórico de cerdo, obteniendo una mayor intensidad de inmunotinción con la segunda técnica.

Larsson y cols. (1975) estudiaron, mediante inmunofluorescencia, las células G en el hombre (en el feto y en el adulto). Hacker y cols. (1990), empleando las dos técnicas inmunocitoquímicas referidas anteriormente (PAP y IgGGS), no observaron diferencias en la densidad numérica de las células G en el hombre en relación con la edad y el sexo.

Algunos estudios han encontrado un incremento en la densidad de células G por el tratamiento continuado con omeprazol (Pawlikowski y cols. 1992), probablemente independiente de la hipergastrinemia, ya que no es bloqueado por tratamiento simultáneo con proglumida (un bloqueador de los receptores de gastrina). En la rata, se ha estudiado la proliferación de células enterocromafines en determinadas condiciones experimentales: durante el tratamiento con omeprazol (Tielemans y cols. 1989) y en la administración crónica de etanol (Todorovic y cols. 1993).

Schepp y Chan (1984), han estudiado los efectos de las prostaglandinas sobre la liberación de gastrina antral en el perro.

En la mucosa antral, en estrecha proximidad con las células de gastrina se encuentran las células productoras de somatostatina. Esta sustancia ejerce efectos reguladores locales sobre la liberación de gastrina (Karnik y cols. 1989; Larsson y Hougaard, 1994).

La biosíntesis de muchas proteínas y péptidos de secreción, incluyendo las hormonas y los enzimas, es llevada a cabo por traducción a partir de ARNm, de grandes polipéptidos precursores que son almacenados en gránulos y disociados por proteasas intracelulares para formar el producto de secreción final. Existen datos que indican que la G-34 puede ser un precursor de la G-17. De hecho, la disociación in vitro de aquella con tripsina libera G-17, y el sitio de disociación está constituido por dos residuos seguidos de lisina (Kaplan y Pesce, 1986; Smith y Price, 1991).

Los gránulos de secreción que contienen gastrina están localizados en la porción basal de las células secretoras (Kaplan y Pesce, 1986; Dellmann, 1993). Las células del bulbo duodenal producen la hormona en menor grado. En el hombre, la concentración de gastrina en el duodeno proximal es alrededor del 10% de la concentración antral (Harrison, 1991; DeGroot, 1989).

La ultraestructura de las células APUD se caracteriza por un abundante retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres y un prominente aparato de Golgi, indicando su naturaleza secretora (Morrison, 1984). Según algunos autores el retículo endoplásmico liso es más abundante que el rugoso (Sanchez y cols. 1985), con una importante presencia de microtúbulos y microfilamentos; mientras que para otros el retículo endoplásmico rugoso es relativamente pequeño en la célula G (Dellmann, 1993). Greider y cols. (1972) realizaron estudios ultraestructurales de las células G en el hombre.

Se ha comunicado (Buchan y Polak, 1979) la existencia de dos tipos de gránulos en la célula productora de gastrina: gránulos secretores grandes electrolúcidos (350 nm) y gránulos pequeños electrodensos (190 nm). Los primeros son característicos de las células G antrales en el hombre y faltan en las duodenales. Realizando secciones semifinas de 800 nm. en antro, duodeno y yeyuno en el hombre, estos autores, midiendo 650 gránulos en 12 células, determinaron un diámetro medio de los gránulos de 220 ± 20 nm.

En un estudio inmunocitoquímico sobre precursores de gastrina en la mucosa antral en el hombre, utilizando antisuero específico frente al péptido sintético Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-Gly (GL7), Funata y cols. (1989) han observado que los gránulos electrodensos presentan una alta afinidad por GL7. Estos gránulos serían el principal lugar de conversión de precursores de gastrina y en consecuencia son más inmaduros.

Así mismo, según este estudio, las células que contienen gastrina en el intestino serían de diferente tipo morfológico que las de la mucosa antral (G.A.); es posible que estos gránulos contengan los productos de la división enzimática de G-34, mientras que los pequeños contendrían G-34 inalterada (G.I.), que es la forma predominante de gastrina intestinal.

Canbert (1992) ha descrito la presencia de grandes vacuolas vacías en el citoplasma de estas células en el hombre, así como diferentes tipos de gránulos que están en relación con el ciclo de secreción celular.

Sin embargo, Oomori y cols. (1993) han señalado en la rata que, según el pH de la fijación, las células G pilóricas presentan diferente electrodensidad en sus gránulos, de manera que a pH 7 predominan los electrolúcidos observándose algunos electrodensos e intermedios. A pH 5 los gránulos electrodensos e intermedios son más numerosos. Para estos investigadores, la variable densidad electrónica de las células G puede reflejar diferencias en el grado de pérdida de contenidos de los gránulos al citoplasma durante la fijación y este fenómeno podría estar relacionado con la acidez de la sustancia de los

granulos durante la maduración intragranular.

2.1.2. MECANISMO DE LIBERACIÓN.

La liberación de gastrina tiene lugar por estímulos químicos, mecánicos o nerviosos, que actúan sobre la célula productora (cél.G), por vía sanguínea, vagal o local (nutrientes) (Jubb y cols, 1993).

La existencia de alimentos en el estómago, estimula la secreción ácida al aumentar la liberación de gastrina, sobre todo gracias al contenido en proteínas de origen animal, más concretamente aminoácidos, primariamente glicina, serina y alanina, así como el ácido acético, el propiónico, y por neutralización del antro con antiácidos (Hansky y cols. 1979; Brent, 1986, Ryberg y cols. 1988; Harrison, 1991; Willard y cols. 1993).

De la acción continuada del omeprazol y ranitidina, inductores de la supresión de la secreción ácida gástrica, resulta una hipergastrinemia en perros y ratas (Ryberg y cols. 1988).

El contacto de la mucosa antral con el contenido luminal es capaz de modular el procesamiento postranslacional de progastrina así como determinar la producción de hormona biológicamente activa mediante pasos que incluyen sulfatación, fosforilación, división y amidación (Varro y cols. 1990).

La propia distensión mecánica del estómago, tras la ingesta, estimula la producción de gastrina mediante un camino colinérgico (Kaplan y Pesce, 1986; Jubb y cols. 1993).

En menor medida, los estímulos nerviosos de la fase cefálica de la digestión también actúan en este sentido, así como el estímulo vagal (De Groot, 1989). En otra parte del intestino, la liberación de hormonas depende más de la química intraluminal. La liberación de gastrina en respuesta a la comida en perros normales no es inhibida por la atropina.

El calcio intravenoso estimula la secreción ácida y produce mínimas reducciones de los niveles séricos de gastrina. Salvo en pacientes con gastrinoma, no suele existir asociación entre hipercalcemia y secreción ácida o aumento de gastrina en suero (Kaplan y Pesce, 1986).

Otros agentes químicos que actúan sobre la célula productora de gastrina son: sales biliares, epinefrina, factor liberador de gastrina (FLG), acetilcolina, etanol y magnesio, principalmente (Fernández-Tresguerres, 1989).

Hay dos familias principales de hormonas intestinales: La secretina y las similares estructuralmente y la gastrina y los péptidos relacionados (Strombeck y Guilford, 1991).

La secretina y el glucagón inhiben la liberación de gastrina, las catecolaminas estimulan su descarga.

La secretina es un polipéptido de 27 aminoácidos relacionado estructuralmente con el glucagón. Esta sustancia es liberada por las células endocrinas de la mucosa del intestino delgado (cél. S) como respuesta a la acidificación de la mucosa antral.

La gastrina provoca la máxima secreción de ácido gástrico cuando ocupa sus receptores situados en las células oxínticas. La colecistoquinina se une a los receptores con menos afinidad que la gastrina; pero si están presentes grandes cantidades de aquella desplazará a esta última. En este caso la secreción resultante es menor que la máxima (Harrison, 1991).

En la célula oxíntica de la mucosa gástrica existen receptores para los secretagogos gastrina, acetilcolina e histamina. Los tres son requeridos para estimular la secreción. También existen receptores para la secretina, que tiene efecto inhibitorio (Strombeck y Guilford, 1991).

Aunque varían en potencia, todas las formas de gastrina desde el tetrapéptido al heptadecapéptido son plenos inductores de la secreción gástrica. La pentagastrina tiene considerablemente mayor actividad.

El heptadecapéptido de gastrina tiene una vida media de tres minutos. El mayor péptido de gastrina (big gastrina), de nueve. Otros autores señalan una vida media para G-17 de 6 minutos y para G-34 de 40 (Kaplan y Pesce, 1986).

Hay factores que inhiben la secreción de gastrina, como son: la acidificación del antro pilórico, atropina, calcitonina, hiperglucemia, glucagón, secretina, somatostatina y el VIP (Bauer, 1986; Fernández-Tresguerres, 1989).

A pH 5.5, el índice de liberación de gastrina es tres veces mayor que a pH 2.5. El efecto inhibitor del ácido proporciona un mecanismo de retrocontrol para la autorregulación de la liberación de gastrina (Kaplan y Pesce, 1986).

La reducción del pH intragástrico a 3.0 produce una inhibición parcial de la liberación de gastrina; mayores reducciones del pH a 1.5 bloquean por completo su liberación. No se conoce en detalle este mecanismo de control, aunque se han propuesto como mediadores las neuronas intramurales colinérgicas y no colinérgicas (Harrison, 1991).

Parece ser que la somatostatina desempeña un importante papel en la inhibición de la liberación de gastrina como respuesta a la presencia de ácido en la luz gástrica, por un lado, por los efectos locales de las células D sobre las G (paracrinas) y por otro, a través de una inhibición directa de la secreción de las células parietales. Parece ser, además, que deprime la expresión del gen gastrina en las células productoras (Karnik y cols. 1989; Varro y cols. 1990).

La familia gastrina-colecistoquinina contiene otro miembro, denominado cerulina,

que no se encuentra en mamíferos pero sí en la piel de la rana como un decapeptido (DeGroot, 1990).

La colecistoquinina (CCK) se encuentra en vertebrados inferiores y puede ser considerada un ancestro de gastrina en términos evolutivos (Harrison, 1991).

Molécula de colecistoquinina C-33

() Lys-Ala-Pro-Ser-Gly-Arg-Val-Ser-Met-Ile-Lys-Asn-Leu-Glu-Ser-Leu-Asp-Pro-Ser-His-Arg-Ile-Ser-Asp-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

La colecistoquinina se halla en el cerebro y en las células K de la mucosa del intestino delgado, las cuales corresponden a las células I previamente identificadas con el microscopio electrónico (Kaplan y Pesce, 1986). Estimula la secreción de enzimas pancreáticos y la contracción de la vesícula biliar (Brent, 1986). En el perro, la máxima concentración se encuentra en yeyuno, con cantidades considerables en ileon y duodeno (Ettinger, 1989).

A partir del intestino del cerdo se aislaron primeramente CCK 33 y CCK 39, posteriormente se aisló CCK 8 en el cerebro de cordero. En estos aislamientos influyen tanto la especificidad del anticuerpo como los métodos de extracción empleados: extracción ácida o con agua a ebullición respectivamente (Kaplan y Pesce, 1986).

La gastrina es la mitad de potente que la colecistoquinina en la estimulación de la secreción de enzimas pancreáticos (Brent, 1986).

Según Ponter y Duvaux-Ponter (1993), se estima que en el hombre el duodeno contiene aproximadamente tanta cantidad de gastrina como el antro, mientras que en el perro el duodeno contiene solo el 2% de la cantidad presente en la mucosa antral.

Tres tipos de receptores estimulan por interacción química la secreción de ácido clorhídrico por las células parietales u oxínticas. Fig.1. Son los receptores para gastrina, histamina y acetil-colina, todos ellos son necesarios para una estimulación óptima de la secreción (Strombeck y Guilford, 1991). (Fig.1).

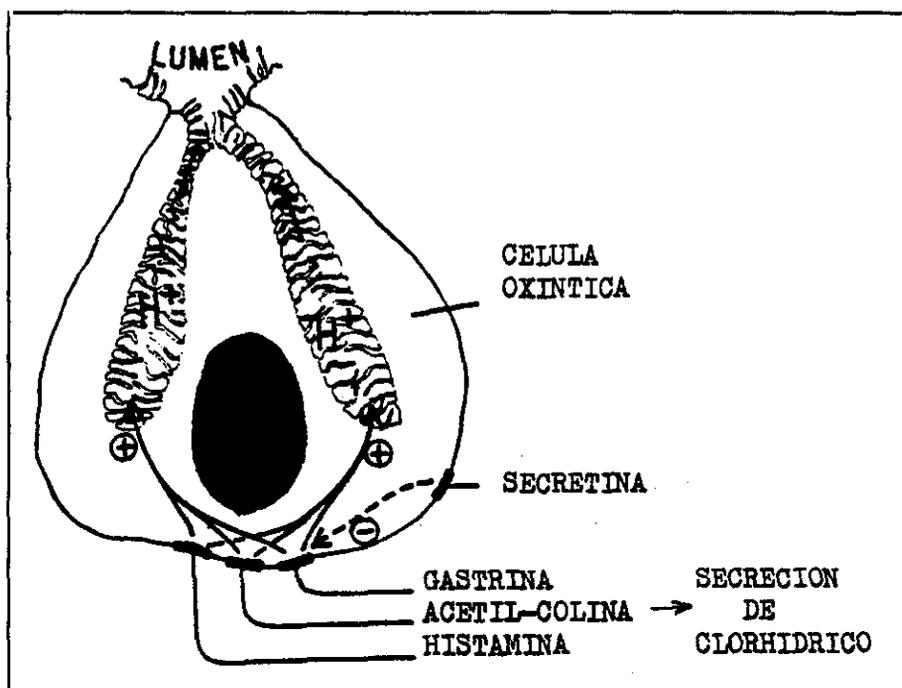


Fig. 1. Esquema de célula parietal mostrando receptores para los secretagogos gastrina, acetilcolina e histamina. También se muestra receptor para el inhibidor secretina (modificado de Strombeck y Guilford, 1991).

Las células parietales componen uno de los cinco tipos de células de las glándulas del cuerpo del estómago: células mucosas del istmo, oxínticas, mucosas del cuello, cimogénicas y argirófilas (Junqueira y Carneiro, 1974).

Las células parietales u oxínticas son redondeadas o piramidales con un citoplasma intensamente eosinófilo. En el hombre se encuentran como embutidas entre la base de las otras células de las glándulas. A microscopía electrónica presentan un surco intracitoplásmico profundo y abundante presencia de mitocondrias (Junqueira y Carneiro, 1974). Estas células son responsables de la producción de ácido clorhídrico, cloruro de potasio y vestigios de otros electrolitos.

Se ha demostrado que el ácido secretado se origina de los cloruros presentes en la sangre y protones (H⁺) resultantes de la acción de una enzima - la anhidrasa carbónica - localizada en esta célula.

Esta enzima actúa sobre el CO₂ presente, produciendo ácido carbónico que, a su vez, se disocia en bicarbonato y en un protón (Harrison, 1991).

Ambos, el protón y el ión cloro, son transportados activamente a través de las células, en cuanto que el agua pasa por ellas pasivamente a favor de un gradiente osmótico. El ión bicarbonato regresa a la sangre. Este proceso es el responsable de la elevación del pH sanguíneo durante el periodo de la digestión (onda alcalina)(Harrison, 1991).

La abundancia de mitocondrias presentes en las células parietales indica que el proceso requiere mucha energía. De hecho, este tipo celular presenta una altísima actividad de la enzima succinodeshidrogenasa, que la caracteriza como una de las células de más alto metabolismo del organismo.

La gastrina actúa sobre su propio receptor, pero no puede estimular la célula a secretar, a menos que, la histamina y acetilcolina estén disponibles para ligarse a sus propios lugares al mismo tiempo. Este receptor ha sido puesto de manifiesto en la rata mediante el empleo de antagonista (Douglas y cols. 1990).

La histamina ocupa los lugares de los receptores H₂, que son diferentes de los H₁, los cuales son bloqueados por antihistamínicos. Análogos a la histamina cimetidina y ranitidina pueden ligarse a los lugares de los receptores H₂ de la célula oxíntica, pero son incapaces de estimular la producción de ácido. Estos fármacos pueden inhibir la respuesta secretora a gastrina, comida, colinérgicos e insulina.

La histamina estimula la secreción ácida del estómago aumentando la actividad del monofosfato cíclico de adenosina (AMP) en las células parietales, con lo que se activa la

proteína cinasa dependiente del AMP.

La gastrina y los agentes colinérgicos, que no estimulan la producción de AMP cíclico, promueven la secreción ácida aumentando el calcio en el citosol de la célula parietal (Harrison, 1991).

La histamina está presente en alta concentración en la mucosa gástrica; el origen de la histamina en el perro parece estar en células semejantes a las cebadas localizadas en la lámina propia adyacente a las células parietales secretoras de ácido. El mecanismo para la producción y liberación de histamina en este lugar permanece desconocido (Shaw, 1988).

La célula oxíntica tiene también receptores para secretina, la cual es un inhibidor de la secreción ácida. Las prostaglandinas tienen un efecto directo sobre la célula y reduce la secreción por inhibición de la formación de AMP cíclico. La atropina puede bloquear estos receptores inhibiendo la respuesta a gastrina e histamina.

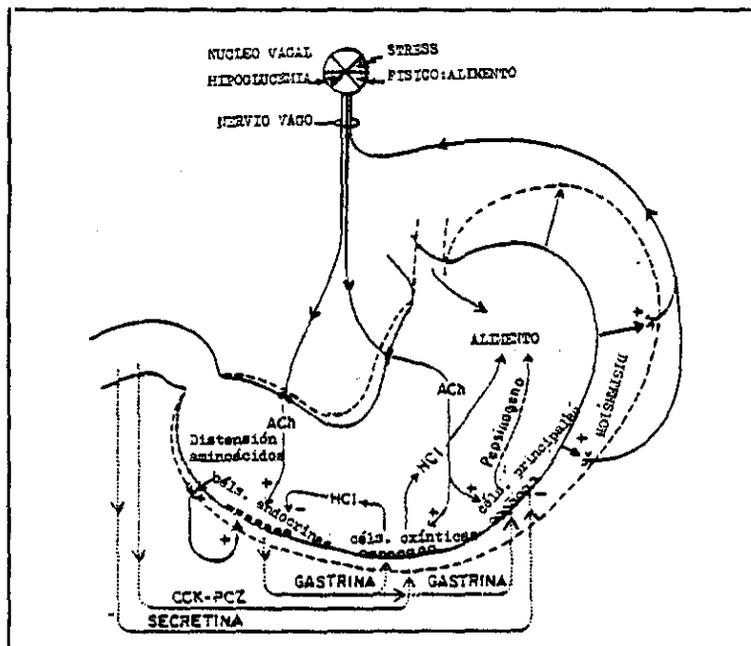


Fig.2.- Esquema del mecanismo de control nervioso y endocrino de la secreción gástrica de ácido y pepsinógeno. Fase cefálica, gástrica e intestinal. (modificado de Strombeck y Guilford, 1991).

La secretina es un polipéptido lineal de 27 aminoácidos relacionado estructuralmente con el glucagón. Es liberada por las células S de la mucosa del intestino delgado como respuesta a la acidificación de ésta (Harrison, 1991).

En la fase cefálica de la digestión, la vista, el gusto, olfato y el masticar el alimento, estimula la fase inicial de la secreción gástrica. **Fig.2.** Este reflejo de respuesta está mediatizado por altas áreas corticales del cerebro (Strombeck y Guilford, 1991).

La inervación se realiza a través del nervio vago; sus fibras terminales actúan sobre las células G secretoras de gastrina, células oxínticas y las células principales (Miller y cols. 1989).

La liberación de gastrina estimulada vagalmente es un tanto resistente a la inhibición con atropina. Este mecanismo neural es el mayor estímulo para la secreción de pepsina, cantidades pequeñas de gastrina y ácido clorhídrico (Strombeck y Guilford, 1991).

La reducción de la respuesta de las células oxínticas por vagotomía a gastrina e histamina, no refleja una disminución de la población de este tipo de células, dosis mayores de estimulantes pueden producir una respuesta máxima similar a la de perros intactos.

Los más importantes determinantes de la secreción gástrica son los acontecimientos que ocurren en el estómago. El principal factor de la fase gástrica de la digestión es la liberación de gastrina, la cual es estimulada por sustancias químicas y por distensión de la mucosa del estómago (Debas y cols.1975).

La presencia de alimento en el intestino (fase intestinal de la digestión) estimula la secreción de ácido en el estómago. Esto es debido a la distensión de la pared intestinal y a la presencia de aminoácidos y péptidos. La respuesta es mediada por un agente humoral llamado enteroxintina.

Por otro lado, recientes estudios parecen confirmar la influencia de determinadas bacterias (*Helicobacter pylori*) sobre la secreción gástrica anormal (Lamers, 1992), concentraciones de gastrina y el desarrollo de úlcera péptica en el hombre (Graham y cols. 1993; Mossiy cols. 1993; Mulholland y cols. 1993; Queiroz y cols. 1993).

También es liberada la colecistoquinina y puesto que es un inhibidor competitivo de la gastrina, perteneciente a la misma familia, y un débil inductor de la secreción ácida, la respuesta gástrica es menor (Strombeck y Guilford, 1991).

En general, los reflejos que proceden de la parte más anterior del tracto gastrointestinal son inhibitorios. Este mecanismo puede ser neural y humoral.

El único reflejo neural es un reflejo bulbofúndico que es estimulado por el ácido en el duodeno. La presencia de ácido en el duodeno reduce la secreción de ácido por el estómago. Los agentes humorales que son liberados por la mucosa intestinal e inhiben la secreción gástrica pertenecen a la familia de la secretina.

En la hiperplasia de las células productoras de gastrina prácticamente no se observan cambios en la respuesta sérica de gastrina tras la inyección de secretina. Sin embargo, tras una comida de prueba el aumento es llamativo: mayor del 200% (Harrison, 1991).

La familia de la secretina incluye el polipéptido inhibitorio gastrointestinal, el péptido intestinal vasoactivo, el enteroglucagón y la urogastrona. Todos ellos inhiben tanto la secreción de ácido clorhídrico como de pepsinógeno, excepto la secretina que estimula la secreción de este último.

Parece existir, además, un control hipofisario, dado que la hipofisectomía causa atrofia de la mucosa gastroduodenal y reducción, por tanto, de la población de células G. Esta acción podría estar mediada por la función tiroidea, ya que el hipotiroidismo se

acompaña de hiposecreción de gastrina, mientras que los niveles de hormona aumentan en el hipertiroidismo. Determinadas sustancias pueden suprimir la liberación de gastrina antral en el perro (Lau y cols. 1990).

En el hombre la secreción de gastrina aumenta con la edad (Todd-Sanford-Davidsohn, 1984). También se incrementa a lo largo del embarazo, llegando a un máximo en el parto. Se ha observado un ritmo circadiano en la secreción de la hormona; los niveles más altos se sitúan entre las 20 y las 24 horas, y los más bajos al final de la noche. En situaciones de ayuno la gastrina pierde su ritmo secretor. La multiplicación celular en el aparato digestivo tiene también un ritmo circadiano y parece que la ritmicidad secretora de la gastrina está implicada en este fenómeno, estimulando la proliferación y división celular (Fernández-Tresguerres. 1989).

La grasa en el intestino causa inhibición de la secreción gástrica por un mediador humoral, al cual se ha denominado enterogastrona. La presencia de grasa en el intestino también inhibe la liberación de gastrina (Strombeck y Guilford, 1991).

Recientes estudios indican que la inhibición de la secreción ácida gástrica por perfusión experimental del colon con un ácido graso (ác. oléico), no es debida a una inhibición de la liberación de gastrina (Hashimoto y cols. 1991).

El péptido liberador de gastrina (GRP) es un péptido lineal que contiene 27 aminoácidos y está relacionado funcional y estructuralmente con bombesina (aislada de la piel de ranas: *Bombina bombina* y *Bombina variegata*). El GPR ha sido aislado de la mucosa intestinal del cerdo.

En ambas sustancias los 10 aminoácidos del extremo carboxílico son idénticos, salvo la sustitución de histidina (GPR) por glutamina (bombesina) en la posición 8.

Se ha detectado alta inmunoreactividad semejante a bombesina en cerebro de

mamíferos (hipotálamo). Nervios conteniendo GRP están presentes a lo largo de todo el tracto intestinal y en pulmón fetal, así como en ciertos carcinomas pulmonares humanos (De Groot, 1989).

De una amplia resección de intestino delgado resulta hipersecreción de ácido gástrico. Se ha postulado que un inhibidor de la liberación de gastrina sería activado, ó que una función importante del intestino es retirar y degradar la gastrina (Catrambone y cols. 1980).

Las células D de la mucosa antral contienen somatostatina (Jubb y cols. 1993) y presentan unas prolongaciones citoplásmicas que se extienden entre las células vecinas productoras de gastrina. La somatostatina inhibe la liberación de gastrina por sus efectos locales (paracrinos) sobre las células productoras.

En la porción del estómago donde se secreta ácido, las prolongaciones citoplásmicas de las células D se mantienen en íntimo contacto con las células parietales y otros tipos celulares (Harrison, 1991).

2.1.3. ACCIONES DE LA GASTRINA.

Dentro de las hormonas reguladoras de la función gastrointestinal, la gastrina (familia de la colecistoquinina) pertenece al gupo de los péptidos circulantes (**tabla 1**) y tiene una molécula básica de 17 aminoácidos frente a los 33 de la colecistoquinina. Los C-5 terminales son idénticos en ambas hormonas (DeGroot, 1989).

La gastrina es la mitad de potente que la colecistoquinina en la secreción de enzimas pancreáticos en el perro, siendo este efecto más activo en el perro que en el hombre (Ponter y Duvaux-Ponter, 1993).

La gastrina estimula la secreción de electrolitos, agua y enzimas en el estómago, páncreas, hígado e intestino delgado (Brent, 1986)

Tiene acción estimulante sobre el músculo liso: porción inferior del esófago, estómago, intestino delgado, colon y vejiga de la orina (Bauer, 1986).

HORMONAS CIRCULANTES	PÉPTIDOS PARACRINOS	PÉPTIDOS PERIFÉRICOS
Gastrina	Somatostatina	Somatostatina
Polipéptido pancreático	Sustancia P	Sustancia P
Secretina	Péptido intestinal vasoactivo	Péptido intestinal vasoactivo
Colecistoquinina		Bombesina
Motilina		Encefalina
Péptido inhibitorio gástrico		
Neurotensina		
Enteroglucagón		

Tabla.1.- Péptidos hormonales clasificados por su modo de acción (Smith y Price, 1991).

Produce efecto inhibitorio sobre el músculo estriado: esfínter pilórico, ileocecal, de Oddi (Bauer, 1986; Brent, 1986; DeGroot, 1989).

Acción estimulante del crecimiento de la mucosa gástrica (Kaplan, 1986; Ponter y Duvaux-Ponter, 1993).

Provoca incremento del flujo sanguíneo en intestino delgado y páncreas (DeGroot, 1989).

Pero su principal acción fisiológica es, como ya se ha indicado, estimular la secreción ácida gástrica. Este efecto se lleva a cabo por tres mecanismos (Fernández-

Tresguerres, 1989):

- Estímulo directo de las células parietales.
- Estímulo de la liberación de histamina.
- Potenciación de la acción de la histamina.

Además, la gastrina es un potente agente trófico de la mucosa gastrointestinal y del páncreas (Brent, 1986), acción que lleva a cabo mediante el estímulo de la síntesis de DNA y RNA, involucrados en el crecimiento tisular. Evita la atrofia que aparece en la rata tras la hipofisectomía (Fernández-Tresguerres, 1989).

Los individuos que padecen tumores secretores de gastrina, presentan hipertrofia e hiperplasia de la mucosa gastrointestinal. También parece tener esta hormona un papel en la maduración del tracto digestivo.

La gastrina estimula la secreción de pepsina e incrementa el flujo sanguíneo en la mucosa gástrica. Esto produce mayor secreción de agua y electrolitos en el estómago, páncreas e hígado. Estos efectos se potencian por acción de la histamina.

La gastrina parece aumentar la presión del esfínter esofágico inferior en dosis suprafisiológicas. También lentifica la evacuación gástrica, a pesar de aumentar la frecuencia y la fuerza de las contracciones a nivel del estómago proximal (Fernández-Tresguerres, 1989).

La gastrina reduce la absorción de agua, K^+ y Na^+ a nivel de yeyuno y provoca la liberación de tirocalcitonina mediante administración exógena en dosis suprafisiológicas. Asimismo, parece desempeñar una función en la liberación de insulina en respuesta a una carga glucídica.

2.1.4. ELIMINACIÓN.

Se cree que la gastrina se cataboliza y elimina en un 40% por los riñones por actividad peptidásica (Bauer, 1986. Kaplan y Pesce, 1986). También el intestino delgado juega un papel en el metabolismo (Catrambone y cols. 1980; Bauer, 1986).

El duodeno puede ser el lugar más importante en el control inhibitorio de la secreción ácida y liberación de gastrina endógena en el perro (Parekh y cols. 1988).

El hígado solo elimina fragmentos de la molécula de gastrina de la circulación. Este órgano es considerado el más importante en la eliminación de hormonas endocrinas intestinales de la circulación portal; pero tanto la colecistoquinina como la gastrina intacta no son catabolizadas por el hígado. Si esta víscera eliminara la hormona antes de alcanzar los órganos diana todos sus efectos se perderían (Strombeck y Guilford, 1991). No obstante, los fragmentos COOH terminales más pequeños de la gastrina, como el pentapéptido, pueden ser casi completamente depurados por el hígado en un solo paso por esta víscera.

Se ha sugerido que existe un sistema portal entre el antro y el fundus del estómago que transportaría directamente la gastrina a sus lugares de acción. Aunque dada la proximidad de las células G antrales a las oxínticas de la pared puede existir una acción directa sobre estas últimas al quedar la gastrina liberada en la luz del estómago. El pulmón y el lecho vascular parecen ser sitios de inactivación (Fernández-Tresguerres, 1989).

Es posible que la gastrina sea degradada por proteasas en el endotelio vascular y retirada del organismo en múltiples lugares (Strunz y cols. 1978).

2.1.5. VALORES NORMALES DE GASTRINA EN SUERO.

Los valores normales de concentraciones séricas de gastrina en ayunas varían según los distintos laboratorios. Las variaciones de la especificidad de los anticuerpos y de la potencia de las diferentes preparaciones estandar pueden ser responsables de estas

diferencias.

Además, las proteínas séricas determinan una inhibición específica del radioinmunoanálisis para la gastrina, que varía según el antisuero.

La G-17 tiene cinco veces mayor potencia endógena (concentración sanguínea requerida para lograr una velocidad de secreción ácida determinada) que G-34, tanto en el perro como en el hombre (Kaplan y Pesce, 1986). Es probable que la G-17 represente casi toda la gastrina circulante biológicamente activa después de una comida normal.

Los análisis con filtración por geles indican que el incremento sérico postprandial es casi enteramente el resultado del aumento de G-17 y G-34. La concentración máxima de G-17 puede detectarse a los 20 minutos de la ingestión de comida, la concentración pico de G-34 se observa después de 45-60 minutos (Kaplan y Pesce, 1986).

En general, en individuos humanos normales, los niveles en ayunas de gastrina en plasma están inversamente relacionados con la velocidad de secreción gástrica de ácido (Todd-Sanford, 1984).

Los valores establecidos en el hombre con el mismo sistema de detección empleado en nuestro trabajo fue de 68.5 pg/ml, en un grupo control de 75 individuos considerados normales (Cis biointernacional, 1990).

Becton Dickinson (1991), en su kit de gastrina, establece para 135 voluntarios sanos (61 mujeres y 74 hombres) un valor medio de 49.6 pg/ml. con un rango de 25-111 pg/ml. Estos valores se distribuían normalmente después de una transformación logarítmica.

Happé y cols. (1980) en un estudio sobre 17 perros clínicamente normales obtuvieron una concentración media de gastrina en suero de 70.9 pg/ml. Drazner (1981) en un perro en ayunas obtuvo una tasa de 39 pg/ml. Los valores normales usuales en el

hombre son inferiores a 25 pmol/litro ó 50 pg/ml (equivalentes de G-17 humana) según Kaplan y Pesce (1986).

La gastrina I humana sintética presenta variabilidad según los lotes, la porcina es más estable (Accary y Bonfils, 1973). Es difícil fijar un valor normal de gastrinemia. Los resultados obtenidos varían de unos autores a otros, incluso de unos trabajos a otros del mismo autor.

La elección de la hormona utilizada como estandar juega un importante papel, una baja de la reactividad inmunológica de la hormona estandar implica tasas plasmáticas más elevadas.

Algunos cambios en la degradación de la gastrina pueden no ser detectados por RIA (Lewin y Willie, 1977). Sin embargo, la inmunidad cruzada con colecistoquinina-pancreozimina (CCK-PZ), que portan igualmente el tetrapéptido terminal: TRY-MET-ASP-PHE-NH₂, no parece ser un factor de error (Accary y Bonfils, 1973).

Parece probable que G-17 represente casi toda la gastrina circulante biológicamente activa presente después de una comida normal (Kaplan, 1986).

En el hombre, la tasa de gastrina aumenta con la edad (individuos entre 60 y 79 años más de tres veces superiores a los de 20-39 años) (Accary y Bonfils, 1973). Sin embargo, para otros autores, estos incrementos serían pequeños (Todd-Sanford, 1984). Se observan variaciones circadianas (Fernández-Tresguerres, 1989), aunque este hecho ha sido discutido por diversos autores (Accary y Bonfils, 1973). También aumenta durante el embarazo y no hay datos objetivos sobre la influencia del sexo.

En el hombre, el pico máximo en el incremento de gastrina sérica total se alcanza aproximadamente entre los 30 y 60 minutos tras la ingestión de alimento y luego declina hacia los valores basales en el curso de 1 a 2 horas (Kaplan y Pesce, 1986).

Los análisis por filtración con geles indican que el incremento sérico postprandial es casi enteramente el resultado del aumento de G-17 y G-34. La concentración máxima de G-17 puede detectarse a los 20 minutos de la ingestión de comida, mientras que la concentración pico de G-34 se observa después de 45 a 60 minutos (Kaplan y Pesce, 1986).

En el perro, los niveles de gastrina sérica se incrementan hasta un pico de 160 pg/ml después de comer (Brent, 1986).

Sin embargo, un estudio sobre un lote de diez perros sitúa la media de concentración de gastrina plasmática en 146.3 ± 16.6 pg/ml (Fox y cols. 1990).

En otro trabajo sobre doce perros normales, los valores en ayunas eran inferiores a 100 pg/ml y el valor máximo postprandial inferior a 200 pg/ml, que se alcanzaba entre los 15 y 30 minutos tras la ingesta (Gabbert y cols. 1984).

Se han señalado (Strombeck y Guilford, 1991) valores en ayunas en el perro entre 23 y 190 pg/ml, con unos incrementos después de la comida de 20 a 70 pg/ml.

Zhang y cols. (1990), determinando las concentraciones de gastrina en suero en pacientes con úlcera duodenal observaron que eran muy inferiores a los niveles que aparecían en el jugo gástrico y las desviaciones estándar eran altas.

2.1.6. VALORES PATOLÓGICOS.

Un aumento muy marcado de gastrina inmunoreactiva en suero aparece en el síndrome de Zollinger Ellison, provocado por la existencia de un tumor secretor de gastrina, con valores superiores a 1000 pg/ml (Drazner, 1981; Happé y cols. 1980; Kaplan y Pesce, 1986; Harrison, 1991).

Se han comunicado concentraciones de gastrina de hasta 2.780 pg/ml. en dicho síndrome (Shaw, 1988). La localización más frecuente del tumor -gastrinoma- es

pancreática, aunque también puede localizarse en estómago y duodeno y en muy raras ocasiones fuera del tracto gastrointestinal (Smith y cols, 1991; Hirai y cols, 1993).

Valores de 200 a 400 pg/ml pueden aparecer en la gastritis crónica, gastritis atrófica, anemia perniciosa, fallo renal crónico, antagonistas H₂, síndrome de intestino corto y vagotomía (Strombeck y Guilford, 1991).

En un estudio experimental en perros en los que se había practicado una resección de duodeno proximal, se observó un aumento de la tasa de gastrina (Catrambone y cols. 1980).

En el perro se han señalado elevaciones de gastrina sérica en asociación con aclorhidria (Strombeck y Guilford, 1991).

Fox y col. (1990), ha observado una disminución en los niveles de gastrina plasmática en perros con tumores de células cebadas (mastocitomas), aunque no encuentra relación significativa entre la concentración de la hormona y los diferentes estadios clínicos de la enfermedad. Emplea un lote de diez perros normales como grupo control y concluye que la concentración de histamina plasmática puede ser empleado como un parámetro para evaluar la respuesta al tratamiento.

En el hombre, los niveles de gastrina sérica en pacientes con carcinoma de antro no difieren de la población control. Sin embargo en los pacientes con carcinoma de cuerpo de estómago y de la conjunción cuerpo-antro, la elevación de gastrina era significativa (McGuigan y Trudeau, 1973).

En la hiperplasia de células G y en la artritis reumatoide se han señalado aumentos de los niveles de gastrina (Walsh, 1975; Smith y Price, 1991).

Ciertos factores agresivos pueden ser capaces de liberar hormonas digestivas como

se ha observado en el carnero, en el cual la frecuente infestación del cuajar por *Ostertagia circumcincta* es causa de hipergastrinemia (Bell, 1978).

En el hombre se ha comprobado en los últimos años que muchos pacientes con gastrinoma poseen niveles de gastrina que se superponen con los valores límite de individuos normales y de personas con úlcera péptica (Kaplan y Pesce, 1986).

Se han establecido por ello, unas pruebas funcionales de estimulación para el diagnóstico diferencial del gastrinoma. Las más empleadas son: comida de prueba estándar, prueba de la secretina y la estimulación con calcio.

Mientras la secreción de gastrina no se altera normalmente tras la ingestión de comida en pacientes con gastrinoma, sí lo hace de manera pronunciada tras la inyección i.v. de secretina en la mayoría de estos pacientes, al contrario que en individuos normales (Willard y cols. 1993).

Después de una infusión de calcio, el nivel sérico de gastrina aumenta considerablemente en pacientes con gastrinoma (Willard y cols. 1993). Aunque el calcio puede provocar elevación de gastrina sérica en personas normales y pacientes con úlcera duodenal, estas respuestas normalmente son mucho menores que las detectadas en el curso del tumor (Kaplan y Pesce, 1986).

2.1.7. BASES ANATOMOTOPOGRÁFICAS Y FUNCIONALES.

El aparato digestivo del perro es el típico de un mamífero carnívoro y está constituido por el tubo digestivo y las glándulas anejas, los cuales conjuntamente ejercen la función digestiva.

El tubo digestivo está formado por la boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, con sus segmentos descendente y ascendente, yeyuno proximal y distal e íleon proximal y distal), válvula ileocecal, válvula cecocólica, ciego, intestino grueso

(colon proximal-ascendente y transverso- y distal o descendente), recto y ano.

Las glándulas anejas, aquellas que desarrollan actividades directamente vinculadas con las funciones digestivas, son las salivares (parótida, mandibular, sublingual, zigomática y glándulas salivares menores), hígado y páncreas.

El estómago del perro no presenta región esofágica (no glandular), la porción cardial es muy pequeña y está adyacente a la mucosa esofágica, la región fúndica ocupa aproximadamente la mitad del estómago y se halla dividida en dos zonas: una zona clara, en la que la mucosa es delgada y solamente hay presente algunas células parietales, y una zona oscura adyacente a la región pilórica, que tiene una gruesa mucosa, profundas criptas gástricas y glándulas fúndicas típicas. El resto del estómago corresponde a la región pilórica.

La región pilórica del estómago presenta criptas muy profundas en las cuales se abren glándulas relativamente cortas situadas en la lámina propia de la mucosa gástrica. Estas glándulas constan de células mucosas de citoplasma pálido entre las que se encuentran las células endocrinas, principalmente G (gastrina) y D (somatostatina) (Jubbs y cols. 1993).

La pared del tubo digestivo está formada por diferentes capas. De fuera a dentro se distingue la túnica serosa, de escaso espesor, cubre la superficie exterior del órgano y está formada por una delgada capa conectiva y el mesotelio que la recubre. La túnica muscular presenta dos capas, una externa, de fibras longitudinales y otra interna de disposición circular. La capa submucosa con numerosos vasos sanguíneos y la túnica mucosa con una fina capa muscular, la muscular de la mucosa, que envía haces delgados de fibras hacia el epitelio y que se intercalan entre las glándulas. En la mucosa se distingue la zona glandular, la zona de las foseas o criptas y el epitelio cilíndrico simple de revestimiento.

Las glándulas pilóricas contienen células de tipo mucoso con núcleo aplanado y

basal y citoplasma rosa pálido, que junto con las glándulas cardiales refuerzan la producción de mucus de las células mucíparas superficiales. La mucosa pilórica del perro no contiene zimógeno pero secreta pepsinógeno y mucina (Krause y cols. 1977). El otro tipo celular corresponde a células endocrinas productoras de gastrina (Dellmann, 1971; Di Fiore, 1986).

La mucosa de la región fúndica gástrica presenta diferentes tipos celulares que pueden ponerse de manifiesto por sus características tintoriales. Las células mucosas del cuello son suavemente acidófilas. En el cuerpo, las células principales, adelomorfas o cimogénicas son basófilas y las células de revestimiento o accesorias fuertemente acidófilas. Las células parietales o delomorfas del fondo son intensamente acidófilas (Di Fiore, 1986).

Los núcleos de las células glandulares pilóricas se sitúan en la base de las células en disposición horizontal. En la profundidad de las fosetas pilóricas y tubulos glandulares próximos adoptan disposición vertical (Di Fiore, 1986).

Las glándulas pilóricas están muy ramificadas, se agrupan en paquetes de tamaño aproximadamente igual, mediante ramificaciones de la muscular de la mucosa que ascienden hasta el epitelio. En los carnívoros existe un estrato subglandular formado por tejido conectivo compacto muy resistente.

Hemos comprobado que la longitud total del intestino de un perro de talla media, medida desde el esfínter pilórico hasta el ano, es de 2.60 metros, es decir, sensiblemente menor a la indicada por algunos autores, que señalan para el intestino delgado del perro una longitud media de unos cuatro metros, siendo el duodeno la porción más corta (25 cm), y el yeyuno la más larga (hasta 8 asas de intestino) (Sisson, 1973).

Después de la muerte y el cese de las contracciones peristálticas, el intestino incrementa su longitud debido a la pérdida del tono muscular (Miller, 1979).

En el duodeno se encuentran las glándulas de Lieberkühn, más superficiales y fuertemente teñidas, y las de Brünner, más numerosas y suavemente acidófilas. En los fondos de las glándulas de Lieberkuhn se sitúan unas células serocimogénicas con citoplasma repleto de gránulos acidófilos y núcleo basal, denominadas células de Paneth. Estas células no están presentes en los carnívoros ni en el cerdo (Grau y Walter, 1975).

Las células argentafines, argirófilas, cromoargentafines o enterocromafines se encuentran distribuidas junto a las anteriores y a lo largo de todo el tubo digestivo. Presentan granulaciones citoplasmáticas con gran afinidad por las sales de plata y cromo. Son las denominadas células basigranulosas de Kultschitzky, sus núcleos no están tan desplazados hacia la base y se ha demostrado que contienen serotonina (Di Fiore, 1986). Las células enterocromafines no se encuentran en los carnívoros (Grau y Walter, 1975).

La coloración de plata revela estas células y las fibras de reticulina o argirófilas existentes en la lámina propia.

En la submucosa de la porción inicial del duodeno existen unos acúmulos de glándulas tubulares ramificadas y enrolladas denominadas glándulas duodenales o de Brünner. Sus células son de tipo mucoso y producen en el hombre una glucoproteína neutra. Su producto de secreción es alcalino y parece que su función es proteger a la mucosa duodenal de la acidez (Junqueira, 1987). En el perro existen glándulas duodenales solo en la inmediata proximidad del píloro (bulbo duodenal) (Dellmann, 1980).

El conducto pancreático menor y el conducto biliar (que nos ha servido de referencia) se abren en el duodeno a unos 5-8 cms. del píloro, dependiendo de individuos y razas, y el conducto pancreático mayor a unos 2,5-5 cms. más atrás (Sisson, 1973).

No obstante, en el perro se han descrito cinco posibilidades diferentes en lo que respecta al origen, trayecto y desembocadura del sistema de conductos pancreáticos

(Dellmann, 1980).

El intestino grueso tiene una longitud de 60 a 75 cms. y el ciego de unos 15 (Sisson, 1973). Las medidas del ciego efectuadas por nosotros en el Pastor Alemán rondan los 10 cms. (desbridando el segmento) y se encuentra a una distancia de 2.25 m. del esfínter pilórico. En el perro el ciego se comunica con un divertículo con la porción inicial de colon, no del fleon (Miller, 1979).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS.

3.1.1. ANIMALES EMPLEADOS EN EL ESTUDIO.

Se utilizaron 17 perros -un tercio de los cuales eran hembras- sin patología gastrointestinal previa, con edades comprendidas entre 0 y 17 años y de las siguientes razas:

- Pastor Alemán (7)
- Pastor Belga (2)
- Gran Danés (2)
- Collie (1)
- Mastín de los Pirineos (1)
- mestizos (4)

3.1.2. METODOLOGÍA DEL SACRIFICIO.

La eutanasia se realizó mediante el empleo de un barbitúrico de acción corta, el pentobarbital sódico (Euta-Lender. Normon), al 20% en solución inyectable administrado por vía intravenosa (vena cefálica). La dosis fue de 10 ml para perros de hasta 15 kg y de 15 - 20 ml para animales entre 30 y 40 kilogramos de peso.

3.1.3. METODOLOGÍA DE LA NECROPSIA.

Las necropsias se realizaron en el Centro Militar de Veterinaria según el procedimiento habitual (Gázquez, 1989), en la mayoría de los casos inmediatamente tras la eutanasia y siempre dentro de las 24 horas siguientes.

Colocado el animal en decúbito supino se practicaba una incisión desde la base intermandibular hasta la sínfisis pélvica, levantando la piel de la mitad superior e inferior del cuerpo y retirándola a ambos lados.

La abertura de la cavidad abdominal se realizó practicando un corte por la línea blanca desde la apófisis del esternón hasta la región del periné. Seguidamente, se realizaron

dos cortes retrocostales desde la apófisis xifoides hacia ambos lados.

Se practicó incisión en curvatura mayor del estómago, siguiendo la inserción del omento mayor, a través de la porción pilórica, esfínter pilórico y a lo largo del duodeno y tramos posteriores de intestino.

Se evisceró el aparato digestivo mediante doble ligadura a nivel del cardias y del recto a la entrada de la pelvis, seccionando posteriormente en dirección caudal junto con el mesenterio y páncreas.

Se obtuvieron muestras seriadas de los diversos tramos intestinales tomando como referencia el esfínter pilórico, midiendo cuidadosamente la distancia desde ese punto al de las diferentes muestras.

Las piezas extraídas para este estudio correspondían a estómago completo, duodeno descendente y ascendente, páncreas, yeyuno proximal y distal, íleon proximal y distal y colon proximal y descendente. En algún caso también se obtuvieron muestras de mucosa oral, glándulas salivares principales, esófago, hígado, ciego y recto.

Las piezas anatómicas fueron procesadas para inmunohistoquímica óptica a los 2 - 7 días de la inclusión en el fijador y en ocasiones al cabo de 20-30 días, no apreciándose diferencias significativas en los resultados.

3.1.4 MATERIAL PARA EL ESTUDIO HISTOLÓGICO.

- Formol 35-40%. Panreac.
- Formol neutro tamponado. Bio-óptica.
- Sustitutivo del Xilol. Shandon.
- Parafina Histoplast. 56°-57°C. Shandon.
- Resina Historesin (Reichert-Jung).
- Xileno. Panreac.
- Procesador de tejidos para inclusión Citadel 1000 (Shandon).

- Estación formadora de bloques Histocentre-2 (Shandon).
- Microtomo S.C.I.L. M1 (Shandon).
- Microscopio Nikon Optiphot de óptica plana.
- Dispositivo automático para microfotografía Nikon HFX. Películas de diapositivas Kodak Ektachrome de 100 Asa y Polaroid y negativos Konica XG100 y Agfa de 100 Asa.

3.1.5. MATERIAL PARA INMUNOCITOQUÍMICA ÓPTICA.

- Portaobjetos pretratados. Kreatech.
- Cassettes portamuestras. Shandon.
- Moldes para bloques. Shandon.
- Peróxido de hidrógeno al 30%. Probus.
- Metanol absoluto. Normasolv.
- Etanol absoluto. Panreac.
- Agua destilada y desionizada
- Fosfato Buffer Salino (PBS) pH 7.2).

Preparación de PBS 2x:

ClNa	76.50 g.
PO ₄ HNa ₂	7.24 g.
Si es PO ₄ HNa ₂ . 2H ₂ O	9.07 g.
Si es PO ₄ HNa ₂ . 12H ₂ O ...	18.20 g.
PO ₄ H ₂ K	2.10 g.
Agua c.s.p.	5 litros.

Para preparar el PBS añadir a partes iguales PBS 2x y agua.

3.1.5.a. Material para la técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa.

Reactivos suministrados por Zymed Laboratories Inc. 458 Carlton Court, South San Francisco, CA 94080, distribuido por Imico.

-Solución bloqueante de peroxidasa endógena. Una parte de agua oxigenada al 30% y nueve partes de metanol absoluto.

-Solución de suero normal de bloqueo de uniones inespecíficas. 10% de suero no inmune de cabra.

-Anticuerpo primario (anti-gastrina). Anticuerpo policlonal obtenido en conejo, diluido en PBS conteniendo BSA y 0.05% de azida de sodio (NaN_3). El antisuero se obtiene en conejos blancos por inoculaciones repetidas de gastrina I humana sintética emulsionada en un adyuvante.

-Anticuerpo secundario biotinilado (cabra anti-conejo unido a biotina)

-Enzima conjugado. Peroxidasa conjugada con estreptavidina.

-Sustrato buffer concentrado.

-Solución cromógena concentrada. AEC en DMF.

-Peróxido de hidrógeno al 3%.

Una vez preparada la mezcla cromógena se debe proteger de la luz y emplear antes de una hora.

-Solución de Hematoxilina para tinción de contraste.

-Solución para montaje acuoso GVA.

3.1.5.b. Material para la técnica de inmuno-oro coloidal-plata.

Reactivos suministrados por Biocell Research Laboratories. Cardiff Business Technology Centre. Senghenydd Road, Cardiff CF2 4AY, UK.

Distribuidos por Imico.

-Conjugado de oro coloidal de 5nm.

-Solución iniciadora de plata.

-Solución reveladora.

-Solución buffer para el conjugado. Tris a pH 8.2 con 0.1% BSA. Contiene:

2.42 g. Tris Base.

1.3 g. Azida de sodio.

8.77 g. ClNa.

1 g. Albúmina sérica bovina.

800 ml. dd H₂O.

-Seroalbúmina Bovina (BSA). Sigma Chemical Corp.

-Eosina sol. acuosa. Bio-Optica.

3.1.6. MATERIAL PARA INMUNOCITOQUÍMICA ELECTRÓNICA.

3.1.6.a Material para la técnica de inmuno-oro coloidal.

-Anillas de cobre para recogida de cortes.

-Rejillas de cobre o níquel circulares de 100, 150, 200 y 300 Mesh. (sección cuadrada). Cubiertas o no con *formvar* al 0.25% en cloroformo.

-Viales eppendorf para polimerización.

-Glutaraldehído 25%. Merck.

-Formaldehído 35-40%. Panreac.

-Paraformaldehído. polvo. Panreac.

- Acido tánico al 8%.
- Resina Unicryl. British Biocell International.
- Resina epoxi Araldita (CY212).
- Albúmina sérica bovina (BSA). Sigma Chemical Corp.
- Suero normal de cabra (NGS). Zymed.
- Ac. 1° (anti-gastrina). Zymed.
- Inmunoconjugado con partículas de oro de 15 nm. BioCell.
- Solución Buffer. PBS.
- Tween 20. Panreac.
- Cápsulas de gelatina para inclusión.
- Cámara UV para polimerización.
- Dos lámparas UV de 8w.
- Estufa de polimerización.
- Agitador magnético Agimatic. Selecta.
- Cuchillas de cristal y diamante.
- Cuchillas de vidrio con cubetas ("balsas") de flotación.
- Ultramicrotomo LKB Ultratome U 2088.
- Microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM10C. Resolución 0,2-0,3 nm.
Aumentos: 30x a 500.000x.
- Sistema de fotografía: placas fotográficas de 6.5 x 9 cm. (Agfa, Scientia Film) y película Agfaortho 25 y Agfapan APX 25.
- Revelador "Rodinal Special" (Agfa).
- Ampliadora "Meopta" (Mod. Magnifax 4).

3.1.7. MATERIAL DIVERSO DE LABORATORIO.

- Pipetas graduadas.
- Pipetas Pasteur.
- Cristalizador.
- Micropipetas de volumen variable Socorex 821.
- Puntas de pipeta. Daslab.

- Estufas de incubación (37-60°). Selecta
- Jarras de vidrio verticales.
- Cubetas de tinción.
- Gradillas para portaobjetos.
- Cámara húmeda.
- Baño termostático Precistern (Selecta).
- Cubetas para baños. Labonord.
- Portaobjetos. Menzel-Glaser.
- Cubreobjetos. Hirschmann.
- Tubos de ensayo.
- Cubetas de tinción. Labonord.

3.2. TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA.

3.2.1. INTRODUCCIÓN.

En este estudio se han empleado dos técnicas inmunohistoquímicas. En la primera, estreptavidina-biotina-peroxidasa (SBP), se realiza un marcaje indirecto (empleo de Ac. 2º o puente), visualizándose la reacción mediante un enzima que actúa sobre un sustrato cromogeno.

La estreptavidina es una proteína con peso molecular de 60000 daltons aislada de *Streptomyces avidinii*. Tiene cuatro subunidades idénticas de alta afinidad para unirse con una variedad de moléculas marcadas sin afectar adversamente sus enlaces característicos con biotina.

La biotina es una vitamina soluble en agua que puede ser acoplada a diversas proteínas y ácidos nucleicos.

La estreptavidina no contiene el aminoácido triptófano ni prácticamente arginina. La avidina no contiene alanina, ácido alfa-aminobutírico ni ácido glutámico (Chaiet y Wolf, 1964).

La segunda técnica empleada, inmuno-oro coloidal-plata (IgGGS), utiliza una inmunoglobulina conjugada con partículas de oro que se unen al complejo Ag-Ac primario. En este caso, la señal, partículas de oro de 15 nm., está por debajo del límite de resolución del microscopio óptico, por lo cual empleamos una solución de plata que se deposita sobre las partículas de oro aumentando la señal hasta hacerla visible.

Los dos enzimas mas empleados en inmunohistología son la fosfatasa alcalina (AP) de mucosa de ternera y la peroxidasa de la raíz de rábano (POD).

La fosfatasa alcalina se encuentra en altas concentraciones en la mucosa intestinal,

placenta, riñón, hígado, pulmón y bazo. Su bloqueo se realiza con levamisole 1 mmol/l añadido al sustrato.

Los isoenzimas intestinal y placentario pueden ser bloqueados por tratamiento de las secciones antes de la tinción: incubación en ácido acético al 20% durante 15 minutos a 4°C, ó ácido peryódico 2,3% durante 5 minutos seguido de borohidrato de potasio 0,02%, 2 min.

La peroxidasa se encuentra en leucocitos, hígado, bazo, útero, glándulas lagrimales, mucosa intestinal, pulmón. Es posible bloquearla por incubación de las secciones antes de añadir el anticuerpo primario, en una solución de 1 parte de H₂O₂ al 30% y 9 partes de metanol absoluto.

Altos niveles de peroxidasa endógena pueden interferir sustancialmente con la interpretación de la inmunoreactividad específica, sobre todo, en áreas de extravasación de células rojas sanguíneas y dificultar la interpretación.

En ambos métodos se ha empleado un anticuerpo policlonal anti-gastrina humana obtenido en conejo blanco.

Además, se han realizado inmunotinciones frente a citoqueratinas y vimentina. Técnicas de tinción habituales: hematoxilina-eosina y azul de toluidina al 1% (en bórax al 1%) durante un minuto, esta última sobre secciones semifinas de 1-2 micras incluidas en resina Histoiresin (Reichert-Jung).

Para la infiltración de las muestras en Histoiresin se preparó una solución de resina (hidroxietilmetacrilato) 10 cc y endurecedor I (peróxido de benzoilo) 0.1 grs. a temperatura ambiente durante un tiempo variable (entre una y doce horas), según el tamaño de la muestra.

La inclusión se realizó sumergiendo las piezas en solución de inclusión (sol. de infiltración 3.1 cc y endurecedor II 0.2 cc), en cápsulas de gelatina. Una vez orientadas las muestras en el molde, se dejaron polimerizar a temperatura ambiente durante una hora.

3.2.2. MÉTODO DE ESTREPTAVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASA (SBP).

3.2.2.a. Preparación.

La fijación se realizó con formol tamponado al 10% (sin glutaraldehído), aunque pueden emplearse otros fijadores.

Antes de realizar los cortes enfriamos los bloques de parafina a varios grados bajo cero. Las secciones de tejido eran de 4 micras y reforzamos su adherencia al portaobjetos, ya que el proceso de tinción es largo e incluye diversas incubaciones y lavados. Esto es muy importante cuando se utilizan tratamientos previos con proteasas (tripsina..). Nosotros hemos empleado un producto comercial "Coat-Quick"S, para facilitar la adherencia, aunque también hay portas en el mercado que llevan el adhesivo incorporado.

Una vez recogidas las secciones del baño maría se dejaron secar suavemente toda la noche a 37° o una hora a 50°.

El material embebido en Paraplast, por ejemplo, puede presentar una retención considerable de este medio después del tratamiento de rutina con xileno. El calentamiento de los portaobjetos justo por debajo del punto de fusión del medio de inclusión (55°C), antes de desparafinar, es eficaz para evitar la tinción de fondo (DeLellis, 1981).

3.2.2.b. Descripción de la técnica.

Hemos utilizado un Kit Histotain-SP (Zymed Laboratories Inc.), distribuido por Imico. El sistema utiliza estreptavidina con unión covalente a peroxidasa (SP), este método es de 4 a 8 veces más sensible que el método avidina-biotina complex (ABC) y de 8 a 16 veces más sensible que el de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) (Hsu y Raine, 1984).

Preparación.

Mantenemos las secciones a 37°C durante 24h.

Pasamos a estufa a 55°C durante 10 min.

Desparafinación:

- Xilol I 15 min.
- Xilol II 15 min.
- Alcohol etílico abs. 10 min.
- Alcohol " 96° 10 min.
- Alcohol " 70° 10 min.

Introducimos las muestras en PBS o agua destilada un mínimo de diez minutos.

Tinción:

- 1.- Sumergimos los portas en una solución bloqueante de peroxidasa a temperatura ambiente. 10 min. Lavar con PBS 3 min.

- 2.- Añadimos 2 gotas ó 100 microlitros (μ l) de solución de suero bloqueante (suero normal de cabra, para bloquear las uniones inespecíficas), no es necesario lavar. Este proceso puede omitirse si el anticuerpo primario está diluido en una solución conteniendo 10% de suero no inmune.

- 3.- Añadimos 2 gotas ó 100 μ l. de anticuerpo primario frente a gastrina sobre cada sección. Incubamos en cámara húmeda a 37°C durante 45 min. Lavamos bien con PBS 3 min. La dilución puede oscilar de 1:20 a 1:200.

- 4.- Aplicamos 2 gotas ó 100 μ l. de anticuerpo secundario biotinilado (cabra anti-conejo) sobre cada sección. Incubar a temp. ambiente durante 10 min. Lavar bien con PBS.

- 5.- Añadir 2 gotas de enzima conjugado (estreptavidina-peroxidasa) a cada sección. Incubar 5-10 min. Lavar con PBS.

6.- Añadir 2 gotas ó 100 µl. de sustrato cromógeno a cada sección. Incubar 10 min. Lavar con agua destilada.

7.- Cubrir las preparaciones con Hematoxilina 3-5 min. Lavar con agua corriente.

8.- Montar con solución de montaje en medio acuoso a base de glicol-metacrilato GMA (2-hidroxietil metacrilato).

Todos los reactivos fueron preparados inmediatamente antes de su uso.

El color de fondo no específico se elimina por incubación de las secciones de tejido con suero no inmune.

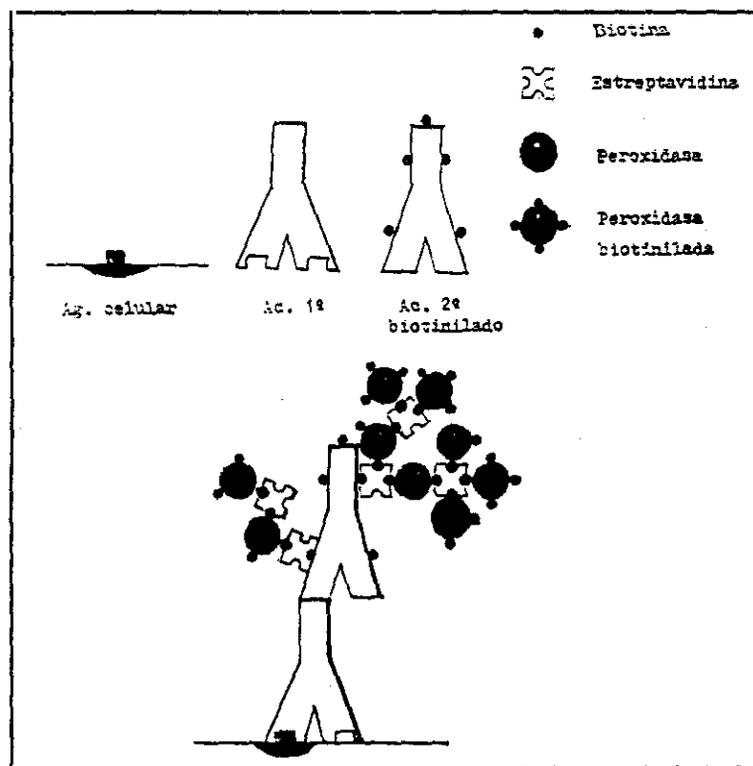


Fig 3. ESQUEMA DE LA FORMACION DEL COMPLEJO ESTREPTAVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASA (modificado de Hsu y Raine, 1984)

El anticuerpo secundario biotinilado sirve de enlace entre el primario y el conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Al añadir este último se unirá a los residuos de

biotina que permanecen sobre el anticuerpo.

La presencia de esta enzima enlazada puede ser revelada por la adición de la mezcla de sustrato-cromógeno. La enzima peroxidasa cataliza el sustrato (con peróxido de hidrógeno) y convierte el cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) en un depósito coloreado de rojo, demostrando la localización del antígeno. Cuando se utiliza DAB (diamino-bencidina) el color de marcado -marrón- puede modificarse e intensificarse mediante iones metálicos, principalmente níquel y cobalto (color azul intenso) (Hsu y Raine, 1984).

Hemos empleado controles para la interpretación de los resultados: un control positivo (mucosa pilórica), otro negativo (secciones de riñón) y un control del reactivo (sustitución del Ac. primario por solución buffer).

3.2.3. MÉTODO DE INMUNO-ORO COLOIDAL-PLATA (IgGGS).

3.2.3.a. Técnica de marcaje con oro coloidal.

Incubar las secciones una vez desparafinadas (como se señaló en la técnica anterior) con 50 µl. de las siguientes soluciones:

-Incubar las muestras con solución de suero bloqueante (suero normal de cabra inactivado por calor) durante 10 minutos (no es necesario en el caso de emplear proteína A).

-Retirar el exceso de suero y depositar sobre las secciones el anticuerpo primario diluido. Incubar durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente o a 37°C en cámara húmeda.

-Lavar bien con PBS con pipeta e inmersión en diferentes baños para retirar el anticuerpo no ligado.

-Incubar con el anticuerpo secundario-oro conjugado (anti-conejo IgG(H+L)) diluido 1:100 en PBS durante 30-60 min.

-Lavar a fondo en varias cubetas de agua destilada desionizada para retirar todas las partículas de oro no ligadas. Todos los objetos de vidrio deben estar muy limpios y el agua debe ser pura en este paso y en los siguientes.

Opcionalmente puede fijarse con glutaraldehído al 1% en PBS durante 3 min. Lavar después a fondo en agua destilada-desionizada.

3.2.3.b. Realzado con plata

-Mezclar una o dos gotas de cada solución, iniciadora e intensificadora, en un tubo a temperatura ambiente (20°C). Depositar una gotita de la mezcla sobre cada sección.

Podemos situar un cubreobjetos sobre la preparación para permitir que el realzado sea observado a gran aumento.

-Observar la reacción hasta que se obtenga la señal deseada. No usar una iluminación excesivamente intensa ya que podría calentar la reacción y dar resultados desiguales.

-Lavar a fondo para terminar el proceso.

-Tinción de contraste con Hematoxilina-Eosina. Montar con GMA. Tener cuidado de no sobreteñir y anular la señal de la plata.

-Examinar con campo claro o luz epipolarizada.

Hemos utilizado un control positivo (mucosa pilórica), un control negativo (secciones de hígado y riñón) y un control del reactivo (omitiendo o reemplazando el Ac.

primario por solución salina).

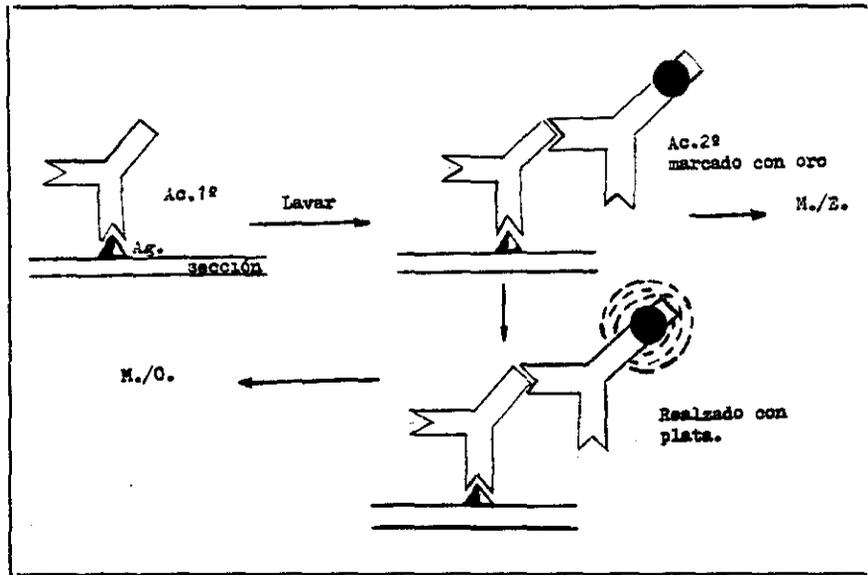


Fig. 4 ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DE INMUNOMARCADO INDIRECTO EN M/E Y M/O

Los problemas más comunes de no marcaje, alto color de fondo, etc. están contemplados en la literatura especializada (Beesley, 1989).

El realzado con plata lo realizamos mediante dos soluciones que se mezclan inmediatamente antes de su uso depositándolas en un tubo separado. Una vez mezcladas, las soluciones deberán ser mantenidas lejos de objetos metálicos y contaminantes salinos. No es necesario fijación.

Las soluciones tienen pH neutro, de este modo se reduce la posibilidad de eliminar de los tejidos el oro marcado. La hemos empleado a temperaturas de entre 20° y 25°C, a la cual la señal toma una intensidad adecuada entre 5 y 15 minutos.

Las partículas de oro no son visibles con el microscopio óptico. Con el empleo de procedimientos de intensificación con plata las partículas crecen *in situ*, apareciendo un color pardo/negro que muestra una localización más precisa que las tinciones enzimáticas.

Con el empleo de luz epipolarizada se obtiene un incremento en la sensibilidad.

Es conveniente añadir 1% de detergente (ej. Tween 20 o tritón) para reducir el color de fondo hidrofóbico. Añadir hasta un 1% de gelatina, que reduce la atracción de la proteína no específica, y también CNa al 5% para reducir el color de fondo por carga iónica.

La preincubación con buffer conteniendo estos aditivos ayuda a reducir el color de fondo no específico.

El Ac. primario se utilizó a dilución 1:1 y el Ac. secundario conjugado con oro a 1:30 y 1:40. En el tejido hay un número indefinido de lugares de unión no específica para ambos anticuerpos que deben ser bloqueados antes de aplicar los reactivos.

3.3. TÉCNICA INMUNOCITOQUÍMICA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

A continuación describimos el método empleado por nosotros en este trabajo.

3.3.1. MÉTODO DE ORO COLOIDAL CONJUGADO.

Preparación de los fijadores

En el presente estudio hemos utilizado diferentes combinaciones de fijadores con algunas variaciones sobre las referidas por Scala y cols. (1992).

Glutaraldehído 0.5 % - Paraformaldehído 4 %:

A continuación describimos el método empleado por nosotros en este trabajo.

- * PBS 98 cc.
- * Paraformaldehído 4 gr. (PanReac 141451 PRS)
- * Glutaraldehído (25%)..... 2 cc. (Merck)
- * Cl_2Ca 0.025 % 0.025 cc. (0.0125 gr. en 50 cc. H₂O)

Acido tánico 8% - Glutaraldehído 2.5%

- * Glutaraldehído al 25%.....5 cc.
- * Acido tánico..... 4 gr.
- * PBS 45 cc.

También se utilizó Glutaraldehído al 2.5% en PBS y ácido tánico al 2% en PBS.

Ajustar con sosa concentrada o en lentejas hasta pH normal.

Este procedimiento no puede utilizarse para inmunotición.

Es importante que el glutaraldehído sea nuevo o al menos no tenga un pH inferior a 4, siendo conveniente filtrarlo por milipore de 0.22 micras antes de su empleo.

PBS para inclusión:

- ClNa..... 8 gr. (135 mM)
 - ClK..... 0.20 gr. (2.7 mM)
 - KH₂PO₄..... 0.20 gr. (1.5 mM)
 - Na₂HPO₄..... 1.15 gr. (8.0 mM)
 - H₂O dest..... 1 litro.
- pH: 7.4

Lavamos la muestra (mucosa pilórica) en PBS, la introducimos en la mezcla fijadora después de trocearla hasta un tamaño de unos 2 mm², para facilitar el corte podemos dejar previamente las piezas más grandes unos minutos en el fijador.

El tiempo de permanencia de las muestras en la mezcla fijadora varía según la concentración de sus componentes. Nosotros las dejamos durante 3 horas.

Pasamos las piezas a PBS donde solo estarán unas horas, máximo 2 días, en cuyo caso añadiremos al tampón unas gotas de paraformaldehído (en una proporción aproximada del 0.1%).

El paraformaldehído es un polímero que se comercializa en forma sólida (polvo) con una riqueza mínima del 95 % . Se disuelve mal en agua tomando la solución aspecto lechoso con abundante precipitado, siendo necesario añadir unas gotas de NaOH, agitando en caliente durante unos minutos. También puede disolverse en PBS y en frasco cerrado calentar en estufa a unos 80 - 90 grados. El pH de la solución suele estar comprendido entre 5.6 y 5.8.

Preparación del Buffer:

Buffer nº1: TBS (pH 7.6) + 2% BSA + 3% NGS

Buffer nº2: TBS (pH 7.6) + 0.2% BSA

Buffer nº3: TBS (pH 8.2) + 0.2% BSA

(NGS aprox. 3% = 0.5% NGS 10% + 1 cc Buffer).

-Añadir opcionalmente:

0.1% TWEEN 20 (evita uniones hidrofóbicas)

0.1% Gelatina (evita atracciones de carga)

0.1% Caseína (evita atracciones de carga)

Nosotros utilizamos metaperyodato sódico para eliminar el OsO₄ y glicina para el bloqueo de radicales aldehídos.

Procesado de las muestras.

Fijación.

Hemos realizado cuatro protocolos de fijación con distinta finalidad: preservar el antígeno, preservar lo mejor posible la estructura y hacer más lento el proceso de liberación de los gránulos de secreción (exocitosis).

1/ Glutaraldehído al 2.5%

Ac. Tánico al 8%

en PBS

4°C - 3 horas

Pasar a la solución tampón a pH 7.4

2/ Paraformaldehído (HCHO)_n 4%

Glutaraldehído (C₅ H₈ O₂) 0.5% en PBS

4°C - 3 horas

Pasar a la solución tampón a pH 7.4

3/ Glutaraldehído 2.5% en PBS

4°C - 3 horas

Pasar a la solución tampón a pH 7.4

4/ Acido Tánico 2% en PBS

Ajustar con hidróxido sódico a pH 7.4

Piezas de 4-5 mm²

4°C - 15 minutos.

Lavar en PBS - 2 horas

Inmersión en Glutaraldehído al 2.5% en PBS

Pasar a la solución tampón a pH 7.4%

Primero preparamos el paraformaldehído y después añadimos el glutaraldehído o el ácido tánico. También se realizaron fijaciones a pH 5.

Lavado.

Toda la noche en PBS

Añadir unas gotas de fijador si se deja 2 - 3 días.

Postfijación.

A) OsO₄ 1% 2h. PBS 30 min.

B) sin postfijación.

Deshidratación.

Puede hacerse en alcohol o acetona a temperatura ambiente. Nosotros hemos utilizado la segunda.

En acetona:

30% - 15 min.

50% - 30 min.

70% - 30 min.

En algunos casos las piezas osmificadas se contrastaron con acetato de uranilo al 2% en acetona al 70% 2 h. a t^a ambiente o toda la noche a 4°C, en nevera).

80% - 15 min.

90% - 30 min.

100% - 30 min.

Acetona al 100% en sulfato de cobre - 30 min.

Las piezas fijadas en los fijadores 1, 3 y 4: Postfijación A - B. Inclusión en Araldita, Unicryl e Historesin.

Las piezas fijadas en 2: Postfijación A - B. Inclusión en Araldita y Unicryl. Se empleó Historesin para cortes semifinos para microscopía óptica.

En las piezas incluidas en Araldita se realizaron todos los pasos anteriormente señalados. Las piezas incluidas en Unicryl solo hasta acetona al 80%. Efectuar varios cambios en todos los pasos.

Decantamos el alcohol y añadimos la resina. Pasar después a resina pura.

Aclaramiento e Infiltración de las muestras.

1.- Araldita

Soluciones a emplear:

a) Óxido de propileno

b) Araldita I

Araldita CY - 212 10 cc
Endurecedor (DDSA) 10 cc
Dibutil - ftalato (plastificante)..... 0.15 cc

Esta mezcla debe ser preparada una hora antes de ser utilizada. Debe agitarse convenientemente para que se homogeneice, y mantenerse hasta su uso en estufa a menos de 50°C.

c) Araldita II

Araldita I 20.15 cc
Acelerador (DY - 062)..... 0.4 cc

Esta mezcla se debe preparar una media hora antes de su uso, agitando adecuadamente hasta que se homogeneice y debe ser guardada en estufa a 40 - 45°C (nunca a más de 50°C, ya que a partir de esta temperatura se produce la polimerización de la resina).

d) Araldita - óxido de propileno

Araldita I - óxido de propileno en proporciones 1/3, 1/1 y 3/1.

Método:

Tras la deshidratación, las muestras se aclararon en óxido de propileno durante dos horas, renovando varias veces el reactivo durante este tiempo. Posteriormente, se procedió a la infiltración de las piezas, como se detalla a continuación:

- Propilenóxido/Araldita I, 3:1 (t. ambiente) ... 1h.
- Propilenóxido/Araldita I, 1:1 (t. ambiente) ... 2h.
- Propilenóxido/Araldita I, 1:3 (t. ambiente) ... 12h.
- Araldita I (45°C) 2h.
- Araldita I (45°C) 2h.
- Araldita I (45°C) 24h.
- Araldita II (45°C) 1h.
- Araldita II (45°C) 30 min.
- Araldita II (45°C) 2h.

Inclusión.

Para la inclusión definitiva se utilizaron moldes de material plástico o cápsulas de gelatina, rotulados convenientemente. Se colocaron una o dos gotas gruesas de Araldita II en el fondo de cada molde. Después, con una aguja enmangada o una pinza de disección, se introdujo el tejido en el molde correspondiente, dejándolo escurrir por la punta de la pinza junto con una gota de Araldita. Cuando los trocitos de tejido llegaron al fondo del molde, se procedió al llenado completo del mismo con Araldita II.

A continuación, se dejaron reposar unos minutos y se orientaron las piezas convenientemente utilizando una aguja enmangada. Una vez comprobado que la orientación de las piezas era la deseada, se introdujeron los moldes en la estufa de polimerización, a 65-70 °C, donde permanecieron un tiempo mínimo de 48 horas para su correcta polimerización.

2.- Unicryl

Las muestras parcialmente deshidratadas se infiltraron en Unicryl a temperatura ambiente y en oscuridad durante un tiempo variable (de 2 a 12 horas), según el tamaño de la muestra.

Inclusión.

Para Unicryl, una resina acrílica que permanece líquida a -30°C y es estable durante 1 año a 4°C , se emplearon cápsulas de gelatina manteniéndose las piezas a 55°C durante 24h-48h hasta su completa polimerización. Durante la polimerización se produce una retracción de la resina de aproximadamente el 30% de volumen inicial contenido en las cápsulas. Para Unicryl no utilizamos postfijación con tetraóxido de Osmio y poco metaperyodato sódico.

Usamos Formvar o cortes gruesos (amarillos. Aprox. $0.1\ \mu$).

Se utilizó Historesin para cortes semifinos con fijador n°2. Araldita con fijador n°2 y osmio.

Método:

El método seguido por nosotros es el recomendado por Beesley (1989) y Polak y Bristley (1992), con algunas modificaciones.

-Una vez realizadas las secciones, para evitar arrugas en el baño, las sometemos a la acción de vapores de xilol, situando una torunda o papel de filtro sobre éstas. Esto no es necesario si utilizamos la resina Unicryl.

-Situamos las secciones ultrafinas (900 nm de grueso) sobre rejillas de oro o níquel. Evitar las rejillas de cobre ya que pueden causar problemas de ruido de fondo.

-Hacer flotar las secciones boca abajo sobre las siguientes soluciones a temperatura ambiente. No dejar que queden secas.

-Metaperyodato sódico al 5% 20 min. (Araldita)/ 5 min. (Unicryl).

-H₂O destilada..... 15 min. 3 cambios.

-Utilizamos Glicina para el bloqueo de radicales aldehído:

TBS (7.4) + Gly 0.5% (0.01 M - 5 mg en 1 cc) + 2% BSA + 1% NGS +
0.05% tritón X-100 30 min.

-Con un alambre de platino transferir la rejilla a la superficie de una gota del anticuerpo primario en dilución 1:1 y 1:10 del prediluido, en buffer nº2. Incubar durante toda la noche a 4°C. Las incubaciones más largas con altas diluciones de anticuerpo producen marcados más específicos.

-Lavar bien en buffer nº2..... 10 min.

-Lavar con buffer nº3..... 10 min.

-Transferir la rejilla a una gota (50 micl) de oro conjugado en dilución 1:30 en buffer nº3..... 2 horas

-Lavar con TBS a pH 7.6..... 10 min.

-Lavar con TBS a pH 7.4..... 10 min.

-Glutaraldehído 1% en TBS a pH 7.4..... 10 min. Esta postfijación facilita la permanencia del oro sobre el antígeno.

-Lavar con TBS a pH 7.4..... "a chorro".

-Lavar con H₂O destilada..... "a chorro".

-Opcionalmente se puede realizar una tinción de contraste con acetato de uranilo o citrato de plomo (Burk, 1969). Nosotros hemos utilizado este último a pH alto, según el método de Reynolds (1963), por breve tiempo para evitar enmascarar la señal. Lavar.

Preparación de la solución de citrato de plomo:

- 1.33 g. de Nitrato de plomo.
- 1.76 g. de Citrato sódico.
- 30 cc de agua destilada, previamente hervida durante 15 min. y enfriada rápidamente.

La solución así preparada se sometió a agitación fuerte durante 1 min. y posteriormente durante 30 min., en intervalos de agitación-reposo. Una vez preparada esta disolución, se añadieron 8 cc de NaOH 1N, y agua bidestilada hasta completar 50 cc.

Método de contrastado de las secciones:

Se depositaron gotas de citrato de plomo sobre una placa de cera dental o sobre Parafilm. En torno a las gotas de citrato de plomo se depositaron "lentejas" de hidróxido sódico con el fin de conseguir una microatmósfera pobre en CO₂ y evitar así la formación de precipitados de plomo sobre los cortes. Las secciones se mantuvieron sobre las gotas durante 15-20 min, a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron en hidróxido sódico 0.01 N y en agua bidestilada. Una vez contrastadas, las muestras se dejaron secar sobre papel de filtro, convenientemente protegidas del polvo y la humedad.

Se realizaron controles negativos para confirmar el marcado específico de las secciones, sustituyendo el anticuerpo primario por una solución buffer.

3.4. TÉCNICA DE RADIOINMUNOENSAYO (RIA)

3.4.1. INTRODUCCIÓN.

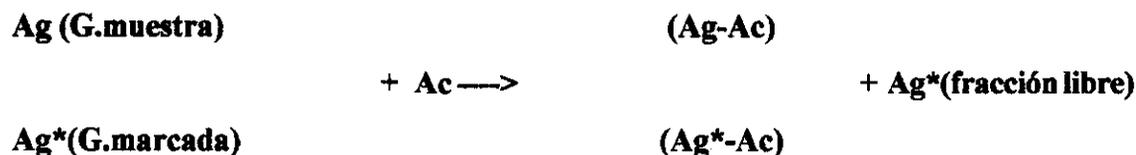
El sistema utilizado para nuestro estudio es el GASK-PR para medida radioinmunológica de gastrina humana en suero y plasma, no modificado, suministrado por Cis Biointernacional B.P.32 F91192 GIF-SUR-YVETTE CEDEX.FRANCE.

El principio de la medida se basa en la competición entre gastrina marcada con un isótopo, Iodo¹²⁵, (el yodo es un no metal de n° atómico 53 y peso atómico 126,90) y la gastrina contenida en los standars y muestras, por un determinado y limitado número de espacios de anticuerpos antigastrina.

Al final del periodo de incubación y después de la separación, la cantidad de gastrina marcada es inversamente proporcional a la concentración de gastrina no marcada presente en el tubo de la muestra o estandar.

La metodología para la separación de las fracciones libres y unidas utiliza un reactivo inmunoprecipitante en el que un segundo anticuerpo (suero de cabra anti-conejo) se encuentra pre-precipitado y en exceso.

-En esquema la reacción es la siguiente:



El radioinmunoensayo de gastrina se ha realizado sin modificación del *kit* comercial. Los datos de especificidad del Ac. utilizado en este ensayo y aportados por la compañía suministradora permiten un correcto reconocimiento de G-17 humana y big-

gastrina.

3.4.2. MATERIAL EMPLEADO.

3.4.2.a. Animales empleados en el estudio.

Mediante la técnica de radioinmunoensayo se han realizado 352 determinaciones sobre un total de 154 perros de diferente raza, edad, sexo y aptitud, procedentes de distintas Unidades del Ejército..

Fueron desechadas 49 determinaciones (13.9 %) por presentar algún grado de hemolisis, valores anormales, pérdida o rotura de los tubos, etc., correspondientes a 29 perros (18.8 %) de los cuales 25 eran machos y 4 hembras.

Por tanto, el número de determinaciones válidas han sido 303 sobre 125 perros de ambos sexos. En todos ellos se realizó un chequeo de su estado general mediante la realización de un hemograma, fórmula leucocitaria y perfil bioquímico de 22 parámetros, considerando como valores normales los de referencia en nuestro laboratorio.

Aunque en el estudio no se ha considerado el factor racial, conviene hacer constar que aproximadamente el 80% de los perros eran de raza pastor alemán, mastín o mestizo de ambos, estando formado el resto por animales de talla media.

1.- Estudio según la edad:

Se han establecido tres grupos de edad:

Grupo A: 34 perros de 0 - 1 año.

Grupo B: 64 perros de 2 - 8 años.

Grupo C: 27 perros de edad igual o superior a 9 años.

2.- Estudio según el sexo:

Se han establecido dos subgrupos dentro de cada grupo anterior (A, B y C).

Subgrupo A-1: 19 machos.

Subgrupo A-2: 15 hembras.

Subgrupo B-1: 42 machos.

Subgrupo B-2: 22 hembras.

Subgrupo C-1: 17 machos.

Subgrupo C-2: 10 hembras.

Por otro lado, en un lote de 30 animales de diferente raza, edad y sexo se determinó la concentración media de gastrina basal y la concentración media transcurridos 30 minutos de la ingestión de comida (fórmulas nº 1, 2, 3 y 4 de las tablas).

También se han realizado 13 curvas de gastrina en 6 perros (5 machos y 1 hembra) con edades comprendidas entre 3 y 9 años, de raza Pastor alemán o mestizo de esta raza y Mastín. Para ello se han empleado cuatro tipos de dietas. Ver tablas de composición nº 2, 3, 4 y 5.

Tras ayuno de 24 horas se extrajo sangre por punción de la vena cefálica, dejándola fluir libremente en tubos con silicona, antes y cada 15 minutos tras la ingesta, a la misma hora del día y del mismo modo para todos los perros.

Las muestras eran procesadas en un plazo de 24 horas desde su obtención, cuando esto no era posible se mantuvieron a -20° hasta el momento del análisis.

3.4.2.b. Material de extracción de sangre.

- Sistema de extracción de sangre. Vacutainer. Holber.
- Agujas estériles con protección. Venoject. 0.9 x 25 mm y 0.8 x 40 mm.
- Tubos para extracción con vacío, sin aditivo, con silicona Vacutainer.
- Tubos con anticoagulante para extracción de sangre. Vacutainer.
- Tubos de plástico desechables.
- Micropipetas de volumen variable. Socorex 821.

-Puntas de pipetas. Daslab.

-Centrifuga de mesa Selecta Centromix. mod. S-549.

3.4.2.c. Material para radioinmunoensayo.

-Gradillas para tubos.

-Contador gamma.

Adaptado para la medida del yodo 125. Hemos utilizado un contador gamma multi-cristal LB 2103 Berthold, con canales preseleccionados para I^{125} y Co^{57} , canal dual y uno seleccionable para contaje de mono isótopo (10-510keV).

Fig.6.

Está dotado de un microprocesador avanzado que incorpora varios métodos para el tratamiento de los datos. Puede almacenar hasta 60 protocolos. Dispone de un software con ROM de 40 Kbytes y RAM de 24 Kbytes (17 disponibles directamente por el usuario). Conexión a ordenador vía RS 232 interface.

-Centrífuga de mesa Selecta Centromix. mod. S-549.

-Agitador magnético Selecta Agimatic.

-Agitador de tubos. Mixo-tube mod. 30. Gricel.

Reactivos

Cada *kit* contiene reactivos suficientes para 100 tubos. Deben almacenarse entre 2-8°C.

Gastrina I^{125} . Reactivo liofilizado	1 vial.
Gastrina estándar	6 viales.
Antisuero anti-gastrina	1 vial.
Reactivo PR	1 vial.

-Gastrina I^{125} .- reactivo liofilizado.

Contiene un buffer, albúmina sérica bovina, y un colorante rojo. La radioactividad contenida en el frasco es aproximadamente de 37

kilobecquerels (< 1 microcurie) en la fecha de fabricación.

La gastrina utilizada para el marcaje es la gastrina I sintética.

-Gastrina estándar.- reactivo liofilizado.

Contiene buffer, albúmina sérica bovina, ázida de sodio y Gastrina I sintética.

La concentración exacta de gastrina está indicada en cada vial. Los valores varían de un lote a otro pero están próximos a 20-60-150-500-1500 $\mu\text{U/ml}$ MRC 68/439. (estándar internacional) ($1\mu\text{U MRC 68/439} = 1.05 \text{ pg MRC 68/439}$).

-Estándar 0.- reactivo liofilizado.

Contiene buffer, albúmina sérica bovina y ázida de sodio.

-Antisuero antigastrina (conejo).- reactivo liofilizado.

Contiene buffer, albúmina sérica bovina, mertiolato de sodio, suero normal de conejo y un colorante azul. Siguiendo el procedimiento recomendado, el antisuero se une al 40 o 50% de la dosis de gastrina marcada.

-Reactivo PR.- listo para su empleo (100 ml de suspensión).

Contiene buffer, polietilenglicol, ázida de sodio, un complejo insoluble formado por gammaglobulinas de cordero anti-conejo y gammaglobulinas de conejo no inmunizado.

3.4.3. MÉTODO DE RADIOINMUNOENSAYO.

La medida se realiza sobre suero o plasma sin heparina, oxalato o EDTA. Las muestras hemolizadas o lipémicas fueron desechadas. Las determinaciones se realizaron una y cuatro horas tras la extracción. Si la medida se efectúa en las 24 horas siguientes, las muestras pueden conservarse entre 2-8°C. En caso contrario es preferible dividir las muestras en partes alícuotas y conservarlas congeladas a -20°C.

Las muestras de sangre eran obtenidas cada 15 minutos durante un periodo de 2 horas mediante punción de la vena cefálica, dejándola fluir libremente de la aguja (goteo) sobre el tubo tipo vacutainer con gel de silicona para evitar cualquier grado de hemolisis. El suero limpio era depositado posteriormente en tubos Nunc y Eppendorf.

Los reactivos y muestras deben fueron llevados a temperatura ambiente (18-25°) antes de su empleo, e inmediatamente a las condiciones de almacenamiento una vez utilizados.

Cuando se esperan tasas elevadas de gastrina, la dilución se efectúa con el estándar 0.

1.-Reconstitución de los reactivos.

- Reconstitución del trazador(gastrina I¹²⁵) con 10 ml. de agua destilada.
- Reconstitución del estandar 0 con 5 ml. de agua destilada.
- Reconstitución de los otros estándares con 1 ml. de agua destilada.
- Reconstitución del antisuero con 30 ml. de agua destilada.
- Mezclar suavemente para homogeneizar, evitar la formación de espuma. Después de la reconstitución las soluciones pueden conservarse 8 días a 2-8°C.

2.-Preparación de los tubos.

La medida necesita los grupos de tubos siguientes:

- Grupo T** para la determinación de la actividad total.
- Grupos Estándar** para establecimiento de la curva de calibración.
- Grupos SX** para las muestras a estudiar.

Es aconsejable efectuar las pruebas por triplicado para los grupos T y Estándar y dobles para las muestras.

3.-Distribución de los reactivos e incubación.

La distribución de los reactivos en tubos se realiza a temperatura ambiente (18-25°C).

Después de la distribución, mezclar el contenido de cada tubo con un mezclador tipo Vortex e incubar. **Tabla 2.**

Grupos de tubos	Gastrina I ¹²⁵	Estándar/Muestra	Antisuero	Mezclar e Incubar 2h. a 18-25°C
T	100	--	--	
Estándares	100	100	300	
Sx	100	100	300	

Todos los volúmenes están expresados en microlitros (μl).

4.-Adicción del reactivo PR.

Antes de la distribución llevar el reactivo a temperatura ambiente y homogeneizar la solución mediante agitación manual.

Distribuir en todos los tubos (excepto los del grupo T) 1 ml. de reactivo PR.

Mezclar e incubar durante 15 minutos a 18-25°C.

5.-Centrifugación.

Decantar el sobrenadante.

Centrifugar todos los tubos (excepto los del grupo T) a 1500-2000 g durante 15 minutos.

Eliminar el sobrenadante. Se recomienda vaciar los tubos sobre un fregadero "activo" o en un recipiente apropiado para recoger soluciones radiactivas. Sacudir los tubos y dejarlos vueltos sobre un soporte absorbente. También puede aspirarse el sobrenadante con un dispositivo apropiado.

Lavar el inmunoprecipitado con 2 ml. de agua destilada, centrifugar a 1500-2000 g durante 15 minutos y aspirar de nuevo el sobrenadante.

Todos los tubos de un mismo ensayo deberán ser tratados idénticamente.

6.-Contaje.

Medir la radioactividad del precipitado (fracción terminal) con un contador gamma para medida de I¹²⁵.

El conteo de los impulsos provocados por la radiación sobre cristales de Ioduro de Sodio (centelleo), utilizados como detectores, se realizó en periodos de medio minuto. El tiempo puede aumentarse a uno o dos minutos según la sensibilidad del instrumento. Cuanto mayor conteo menor será la cantidad de gastrina presente en la muestra.

7.-Cálculo de los resultados.

Para cada grupo de tubos, sustraer el ruido de fondo, hacer la media de los conteos. Evaluar la capacidad de ligamiento del sistema (%):

$$(B_0/T)\% = \frac{\text{Std "0"}}{T} \times 100$$

El conteo neto de cada estándar y muestra deberá expresarse como un porcentaje del grupo estándar cero:

$$(B/B_0)\% = \frac{\text{Std ó Sx}}{\text{Std "0"}} \times 100$$

Construir la curva de calibración llevando los B/B₀ en función de las concentraciones.

Para la construcción de la curva estándar se realizó un trazado semi-logarítmico, aunque se pueden emplear otros métodos, por ejemplo llevando los cpm (centelleos

por minuto) en función de las concentraciones **Tabla 3.- Ejemplo:**

Grupos de tubos	cpm media	B/Bo %
T	14371	--
Estándar 0 pg/ml	6481	100
Estándar 20 "	5671	87,5
Estándar 60 "	4938	76,2
Estándar 150 "	3629	56
Estándar 500 "	1711	26,4
Estándar 1500 "	745	11,5
Muestra	2074	32

Los tubos **T** se emplean para la determinación de la actividad total. Contienen solamente gastrina marcada y por lo tanto darán el centelleo más alto.

Bo=Std 0. No contiene gastrina, luego todo el anticuerpo disponible se unirá a la gastrina marcada. Su lectura por tanto será más alta que la de los diversos estándares (Std) y muestras (Sx). Le adjudicamos el valor 100. Todas las demás medidas de los estándares y muestras la expresamos en porcentajes referidos a ese valor, como se ha hecho en el ejemplo anterior.

El límite de detección está evaluado en 10 μ U/ml o 10 pg/ml.

Los reactivos empleados en este kit contienen derivados de sangre humana, a pesar de los controles deben ser considerados potencialmente infecciosos, se recomienda manejar con medidas de seguridad biológica nivel 2. **Tabla 4**

ESQUEMA OPERATIVO

Tubos	Gastrina I ²⁵	Estándar/Muestra	Antisuero	Mezclar Incubar 2h a 18-25°C	Reactivo PR ml	Mezclar Incubar 15 min a 18-25°C Centrifugar 15 min
T	100	--	--		--	
Estándares	100	100	300		1	
Sx	100	100	300		1	

Las cantidades están expresadas en microlitros

Contaje

Tabla 4

3.4.4. MÉTODO ESTADÍSTICO.

Para el análisis de los datos se ha utilizado un ordenador personal tipo PC 486 versión con el programa de estadística descriptiva MICROSTAT, SIGMA y LOTUS. Las gráficas se realizaron en HARVARD GRAPHICS 3.0.

Se aplicó el test de la "t" de Student, normalmente empleado en muestras pequeñas y medianas, para comparación estadística de poblaciones y el coeficiente de correlación lineal de Pearson (Carrasco, 1986; Thrusfield, 1986).

La prueba t se utiliza para comprobar las diferencias estadísticamente significativas entre dos medias experimentales o entre una media experimental y un valor establecido (Kaplan y Pesce, 1986).

3.4.5. TABLAS DE COMPOSICIÓN DE DIETAS.

Nº1 SCIENCE DIET. Canine Performance. Hill's. USA.

ALIMENTO ENLATADO. Peso neto 440 g.

Ingredientes: Agua, pollo, hígado, maíz, arroz, sal yodada, óxido de hierro, zinc, manganeso, cloruro potásico, selenito sódico, vits. D₃ E, B₁, B₂, B₃, pantotenato cálcico, B₆, B₁₂, ácido fólico, biotina.

Análisis medio:

Proteína bruta	min. 7.5%
Grasa bruta.....	min. 7.5%
Fibra bruta.....	max. 1%
Humedad.....	max. 74%
Calcio.....	min. 0.2%
Fósforo.....	min. 0.1%

Nº2 PURINA PRO PLAN. Fórmula Performance.

ALIMENTO SECO. Peso neto 18,14 kg.

Ingredientes: Carne y derivados (con 22% de pollo), cereales (17% arroz), extractos de proteína vegetal, aceites y grasas, derivados de origen vegetal, huevos y ovoproductos, leche y derivados lácteos, minerales. Cobre (sulfato): 7mg/kg. Contiene antioxidante etoxiquin permitido por la CEE.

Análisis medio:

Sodio.....	0,4%
Calcio.....	1,2%
Fósforo.....	1,0%
Proteínas.....	31%
Grasa.....	21%
Fibra.....	2,5%
H. de Carbono.....	30.5%
Ceniza.....	6%
Humedad.....	9%

Vit.A..... 18000 UI/kg

Vit.D₃..... 1600 UI/kg

Vit.E..... 25 mg

Dosificación:

Según peso, edad, lactación y aptitud del animal. Las cantidades diarias recomendadas son las siguientes:

1-5kg.....25-125g

5-10kg.....125-200g

10-20kg.....200-335g

20-40kg.....335-575g

más de 40kg.....50g/5kg

Nº3 EUKANUBA REGULAR. The Iams Co. USA.

ALIMENTO SECO. Peso neto 140 g.

Ingredientes: Los mismos que EUKANUBA PREMIUM.

Análisis medio:

Proteína mínima.....26%

Grasa mínima.....16%

Ceniza máxima..... 8%

Fibra máxima..... 3%

Humedad máxima..... 8%

Vit.A.....14.000 UI/kg

Vit.D₃..... 1.200 UI/kg

Vit.E.....95 mg/kg

Calcio..... 1,4%

Fósforo..... 1%

Cobre.....32 mg/kg

ALIMENTACIÓN ESPECIAL

Nº4 CARNE MAGRA DE TERNERA. 1ªcat. Cruda, picada, exenta en lo posible de aponeurosis, grasa y fibras.

Cantidad administrada: 20g/kg de peso vivo.

Análisis medio tipo:

Agua.....	70%
Proteínas.....	19.5%
Lípidos.....	6%
Grasa.....	4%
Hidratos de carbono.....	0.5-1%
Sales minerales.....	1.2-1.3%
Potasio.....	301mg/100g
Vit.A.....	-
Vit.B ₁₂	2mcg/100g
Vit.C.....	-

Nº5 ARROZ (Oryza sativa). Sin cáscara ni cubiertas. Cocido.

Cantidad administrada: 25g/kg de peso vivo.

Análisis medio tipo:

Agua.....	8.5%
Proteínas.....	7%
Lípidos.....	1%
Hidratos de carbono..	78.7%
Vit.A.....	-
Vit.B ₁	0.08mg/100g
Vit.B ₂	0.03mg/100g
Vit.B ₆	0.15mg/100g
Vit.B ₁₂	-
Vit.C.....	-
Fósforo.....	221mg/100g

Calcio..... 10mg/100g
Magnesio.....119mg/100g

Nº6 CANINE MAINTENANCE. Hill's

ALIMENTO SECO. Sacos de 5 y 10 kg.

Ingredientes: Maíz, carne de pollo, harina de soja, grasa animal, huevo completo, arroz, aceite vegetal, sal yodada, cloruro de colina, carbonato de calcio, etoxiquin (antioxidante), sulfato de hierro, óxido de zinc, óxido de magnesio, óxido de cobre, carbonato de cobalto, etilendiamina dihidroyoduro, selenito sódico, vitamina A palmitato, Vit. D, E, B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂.

Análisis medio:

Humedad... 9.0%
Sustancia seca.91.0%
Proteína.....23.0%
Grasa.....14.5%
Hidratos de C.....45.9%
Ceniza..... 4.3%
Fibra..... 3.3%
Calcio..... 0.60%
Fósforo..... 0.60%
Sodio..... 0.26%
Potasio..... 0.14%

Dosificación: Las cantidades medias recomendadas son las siguientes:

1-5 kg..... 43-106 gr
5-9 kg.....106-149 gr
9-22 kg.....149-297 gr
22-36 kg.....297-425 gr
más de 36 kg.....425 gr más 43 gr por cada 5 kg

4. RESULTADOS

4.1. INMUNOCITOQUÍMICA EN MICROSCOPIA ÓPTICA.

4.1.1. LOCALIZACIÓN DE LAS CÉLULAS G EN EL PERRO.

Mediante las dos técnicas para inmunohistoquímica óptica empleadas hemos observado que la localización de las células productoras de gastrina inmunoreactiva, en el aparato digestivo del perro, es eminentemente pilórica. **Fig. 5 y 6.** Hemos encontrado algunas células positivas, pero de baja reactividad, en un tramo de aproximadamente 10 mm. de duodeno proximal, situándose la mayoría en las vellosidades, no en las glándulas. La región fúndica del estómago canino es negativa. **Fig. 7 y 8.** No se han puesto de manifiesto células G en ningún otro segmento del aparato digestivo: glándulas salivares, esófago, intestino delgado, hígado, ciego, colon y recto. **Fig. 9 y 10.**

El páncreas es negativo a la inmunotinción tanto en el recién nacido como en el perro adulto. Los resultados obtenidos han sido análogos, independientemente del sexo y edad, en todos los animales estudiados. No obstante, cabe señalar que en un caso se ha observado moderada positividad en células dispersas de los acinos y de los conductos pancreáticos principalmente.

Las células G se encuentran en una banda que ocupa, aproximadamente, el tercio medio de la mucosa antral; las glándulas más profundas, generalmente, dan tinción negativa a gastrina. Sin embargo, diversas células de las criptas y aún de las vellosidades son positivas, probablemente esto viene determinado por el propio proceso de especialización celular en virtud del principio de unidad cripta-vellosidad.

4.1.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS CÉLULAS G.

Las células productoras de gastrina en tejidos incluidos en parafina y teñidas con H-E. son indistinguibles morfológicamente de las células glandulares pilóricas entre las que se hallan. En cortes semifinos en resinas teñidos con azul de toluidina es posible identificarlas merced a la diaposición de su núcleo y ausencia de moco en su citoplasma



**Fig 5. Mucosa pilórica. Perro. Células positivas a gastrina (en rojo).
Estreptavidina-biotina -peroxidasa (SBP) x 400.**



**Fig 6. Mucosa pilórica. Perro. Células positivas a gastrina (en negro).
Inmuno-oro coloidal-plata (IgGS) x 200.**



Fig 7. Mucosa gástrica fúndica. Perro.
SBP x100.

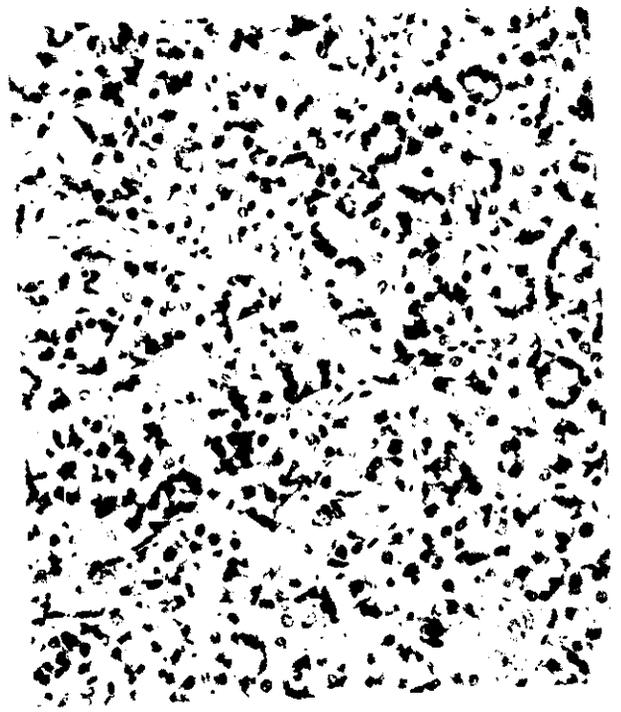


Fig 8. Mucosa gástrica fúndica. Perro.
IgGGS x200.

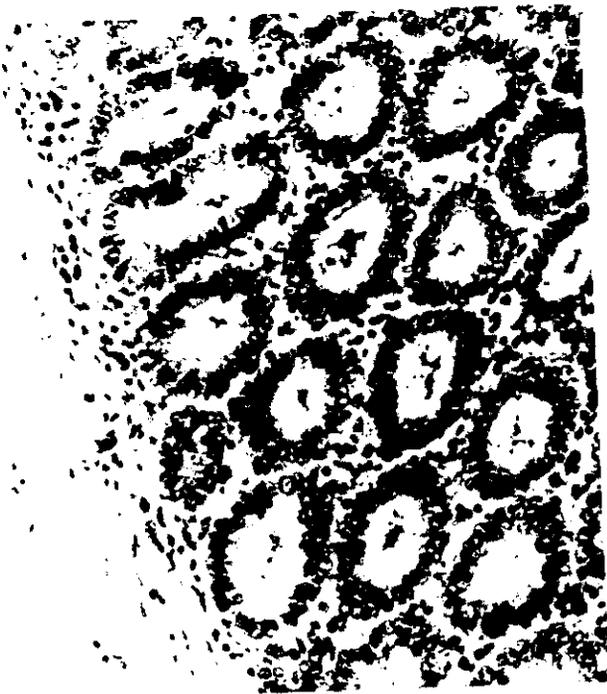


Fig 9. Duodeno proximal. Perro.
SBP x200.



Fig 10. Mucosa de duodeno próxima a la
desembocadura del primer conducto pancreático
SBP x200.

Fig. 11. No obstante, solamente la inmunotinción puede ponerlas de manifiesto de manera concluyente.

Hemos observado que las células G pueden comportarse como células endocrinas abiertas y cerradas. Aquellas células que se sitúan en niveles más superficiales, es decir, en las criptas de la mucosa del antro pilórico, o que alcanzan la luz glandular, la secreción de gastrina se efectuaría directamente en la luz gástrica (difusión local directa) **Fig.12**. En otros casos, que es lo más frecuente, la secreción tiene acceso a sus células diana por transporte a través de la circulación. **Fig.13**.

Por inmunocitoquímica óptica observamos un núcleo amplio, ovalado, en posición central, apareciendo inmunoreactividad (en rojo) en todo el citoplasma celular, es decir, no se observa polaridad al microscopio óptico en la localización intracelular de gastrina.

En el neonato, sin haber ingerido aún leche materna, las características morfológicas de las células G son las mismas que las observadas en el perro adulto, si bien la inmunoreactividad es menor.

Su naturaleza epitelial queda patente cuando empleamos inmunotinción de filamentos intermedios para citoqueratinas y vimentina. **Fig 14 y 15**. Los citoplasmas de las células G son positivos a las primeras no habiendo coexistencia con vimentina. No obstante, otras células endocrinas también pueden dar inmunotinción.

Las células mucosas circundantes son totalmente negativas a estas proteínas de citoesqueleto debido a la gran cantidad de mucus presente en sus citoplasmas.

Fig 11. Sección semifina de glándulas pilóricas del perro. : célula endocrina, probablemente productora de gastrina. Azul de toluidina x400.



Fig 12. Células G (en negro) inmunoreactividad en la luz de una foseta  IgGGS x600.



Fig 13. Células G (en rojo) en el tercio medio de la mucosa pilórica del perro. SBP x200.



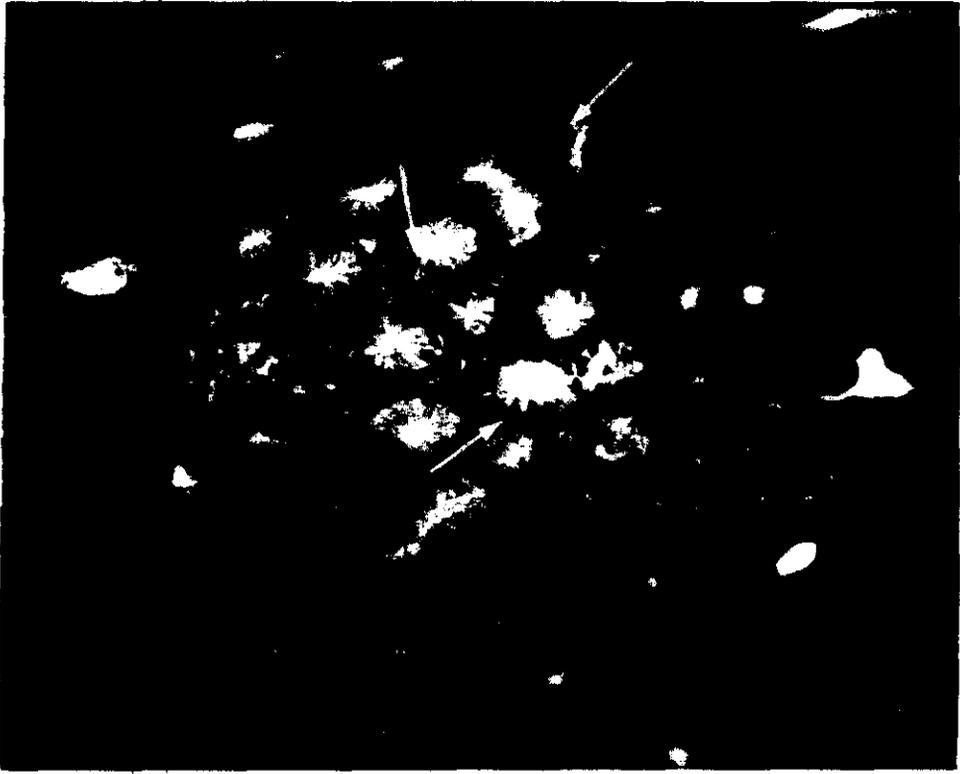


Fig 14. Mucosa pilórica del perro. Inmunotinción para citoqueratinas. ↗: células positivas, probablemente productoras de gastrina, entre las células mucosas glandulares. x200.



Fig 15. Mucosa pilórica del perro. Inmunotinción para vimentina. ↗: las células epiteliales de las vellosidades y de las glándulas son negativas.

4.1.3. DENSIDAD CELULAR EN LA MUCOSA PILÓRICA.

La disposición y concentración de las células G es bastante variable, por lo tanto, la densidad celular observada por campo de gran aumento presenta un amplio rango (5 - 21 céls). El número de células positivas a la inmunotinción en antro pilórico aumenta en dirección al esfínter.

Los valores medios obtenidos por nosotros con objetivo Plan Apocromático de 40x y ocular de 10x, correspondiente a un diámetro de campo real de 0.45 mm (0.16 mm^2), son los expresados en la **Tabla 5**.

Nombre	Campos	Media	STD	Mínimo	Máximo
cel/gas/campo	20	13,6	4,59	5	21

Tabla 5.

Según estos resultados, la densidad celular por unidad de superficie en relación a la media puede oscilar entre 8.5×10^3 y 1.2×10^4 células G por centímetro cuadrado.

El número de células G por cada sección de glándula pilórica difícilmente se ajusta a una distribución normal. En la **tabla 6** aparecen los valores obtenidos para cortes de 4 micras y sobre un total de 267 recuentos de secciones de glándulas que presentan al menos una célula positiva y contabilizando solo aquellas células en las que se observan núcleos.

7Nombre	Nº	Media	STD	Mínimo	Máximo
cel/gas/gland	267	3,86	1,6	1	7
			Acumulada		
Valor	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	
1	18	6,74	18	6,74	
2	36	13,48	54	20,22	
3	64	23,97	118	44,19	
4	62	23,22	180	67,42	
5	37	13,86	217	81,27	
6	33	12,36	250	93,63	
7	17	6,37	267	100	

Tabla 6

N.- número de secciones glandulares contabilizadas.

Se observa en la tabla que el número de células que aparecen con mayor frecuencia son 3 - 4 por sección glandular.

4.2. INMUNOCITOQUÍMICA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

4.2.1. ULTRAESTRUCTURA DE LA CÉLULA G.

La célula G es de forma piramidal u ovoide, su vértice superior es estrecho y presenta microvellosidades al igual que las células mucosas que la rodean. El núcleo es ovalado, grande y denso, con abundante cromatina en disposición parietal y no se encuentra desplazado hacia la base como en el caso de los mucocitos glandulares. **Fig.16.**

Se observan abundantes ribosomas libres, principalmente en la proximidad del núcleo -como corresponde a una célula que sintetiza proteínas- mitocondrias (células metabólicamente activas), filamentos del citoesqueleto (tinción positiva a citoqueratinas) y numerosos gránulos citoplasmáticos de mediana densidad electrónica. Es de señalar la frecuencia de desmosomas en estas células.

La membrana citoplasmática de la célula G presenta en todo su perímetro (excepto en la zona basal) largas y numerosas prolongaciones e invaginaciones de unos 80 nm de ancho, que se entrelazan con las células vecinas. Esta configuración es importante para permitir la adhesión de una célula a otra en los tejidos con sustancia intercelular muy escasa.

Las células mucosas pilóricas presentan también prolongaciones de la membrana citoplasmática que se entrelazan con las células circundantes - entre ellas las G- y una polaridad muy marcada. Los núcleos están confinados en la base de la célula y en ocasiones se observan nucleolos amplios. Los gránulos mucosos son grandes y limitados por membrana. Su contenido es pálido y de electrodensidad homogénea, en algunos puede observarse un núcleo electrodenso excéntrico. En el polo apical presentan gruesas microvellosidades que pueden ser restos citoplasmáticos tras la exocitosis. **Fig 17.**

No hemos observado células parietales en la proximidad de las células G -u otras células endocrinas- ni de las células mucosas.



Fig 16. Célula G. Perro. N: núcleo, g: gránulos de secreción, d: desmosomas, n: núcleo de un mucocito, / prolongaciones de la membrana, * gránulos mucosos.



Fig 17. Aspecto ultraestructural de una glándula pilórica del perro. M: mucocitos, nG: citoplasma de célula endocrina no secretora de gastrina, m: célula mioepitelial, L: luz glandular, ↗ prolongaciones del plasmalema formadas probablemente durante la excitosis de los gránulos mucosos. En la luz se observan estructuras laminares de incierto significado (↙). x5.600.

4.2.2. INMUNOMARCADO ULTRAESTRUCTURAL.

El estudio inmunocitoquímico ultraestructural con partículas de oro coloidal de 15 nm. presenta una buena señal de marcaje con muy poco color de fondo y sin agregación de las partículas. El control negativo (sin el Ac. primario) fue satisfactorio.

Las células G presentan diferente densidad electrónica de marcado que, independientemente de la dilución de los anticuerpos y de la puesta en evidencia del antígeno, puede reflejar diferencias en el grado de pérdida de contenido de los gránulos dentro del citoplasma durante el proceso de fijación. Este fenómeno pudiera estar relacionado con la acidez de la sustancia de los gránulos durante la maduración intragranular. (Fig. 18 y 19).

Aunque el marcaje no provoca amplificación de señal, al ser el anticuerpo primario policlonal pueden quedar señalados diferentes epitopos, por lo que no puede determinarse el número de moléculas de gastrina por unidad de superficie.

En la proximidad de las células G aparece otro tipo celular sin inmunomarcado, con gránulos muy electrodensos y heterogéneos, separados de sus membranas por un halo claro periférico y localizados en su gran mayoría en la base celular. El diámetro de estos gránulos oscila entre 100 y 250 nm, llegando los de forma ovalada a los 550 nm. Así mismo, estas células presenta grandes vesículas citoplasmáticas vacías de hasta más de 800 nm de diámetro. Es probable que este tipo celular segregue somatostatina. (Fig 20,21,22 y 23).

4.2.3. GRÁNULOS DE SECRECIÓN DE GASTRINA.

Los gránulos de secreción de las células G tienen unidad de membrana y son de tamaño relativamente heterogéneo. Sus dimensiones oscilan entre 160 y 375 nm. Suelen ser muy numerosos y de diferente electrodensidad, sin ser ésta, en cualquier caso, muy marcada y no presentan una clara tendencia a localizarse en la base celular. No hemos observado exocitosis por fusión del gránulo con la membrana plasmática.

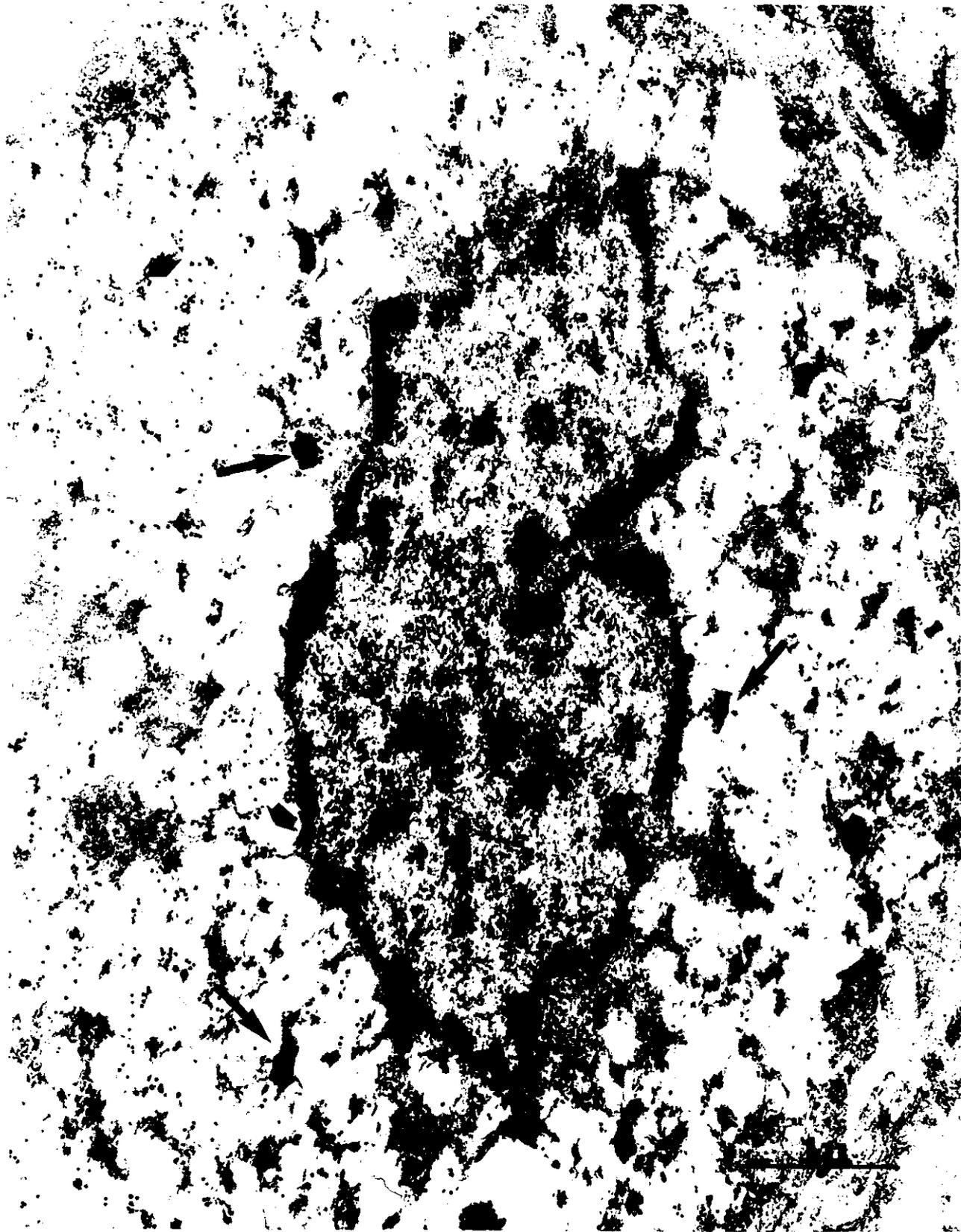


Fig 18. Inmunomarcado ultraestructural de una célula G de la mucosa pilórica del perro. Se observan algunos gránulos citoplasmáticos electrodensos intensamente positivos (↗) y gránulos electrolúcidos marcados en su periferia (↘).



Fig 19. Célula G. Perro. Inmunomarcado con partículas de oro de 15 nm. Se observa gran predominio de gránulos electrolúcidos. N: núcleo. Detalle: un gránulo electrodenso intensamente positivo.

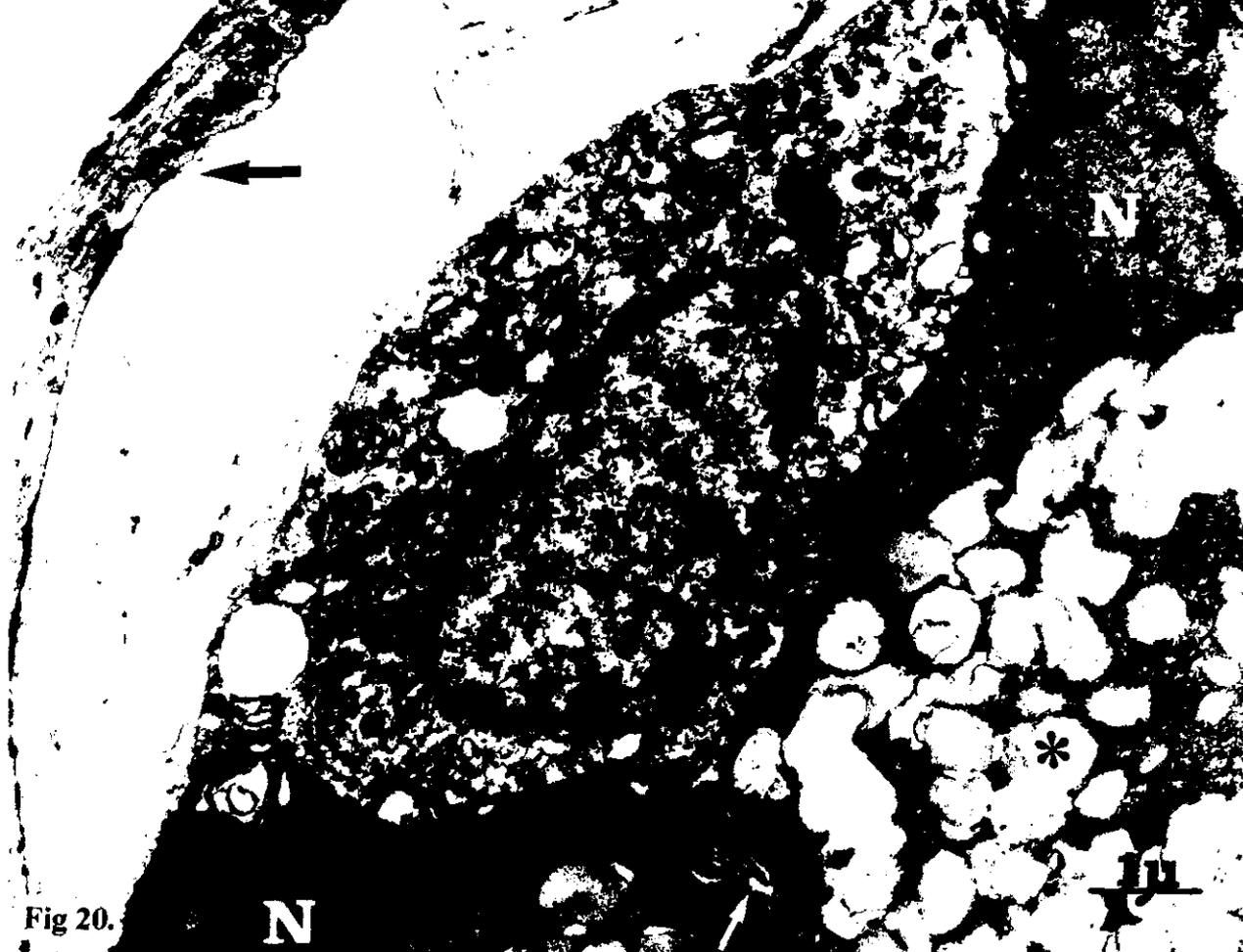


Fig 20.

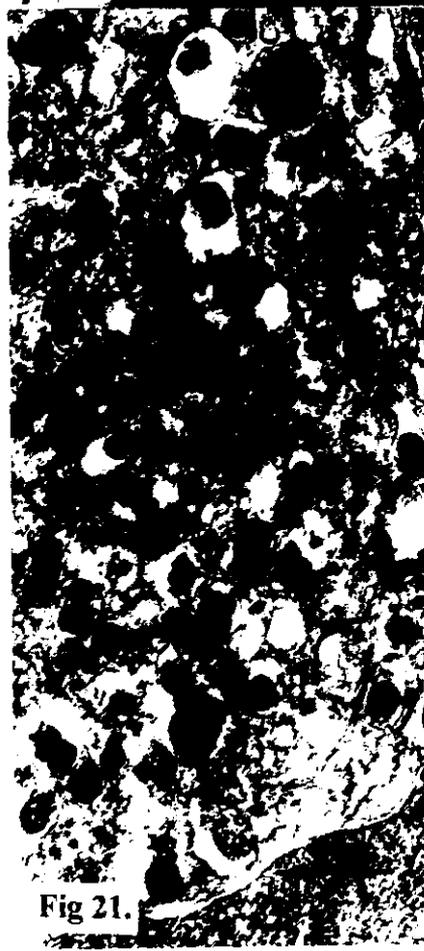


Fig 21.



Fig 22.

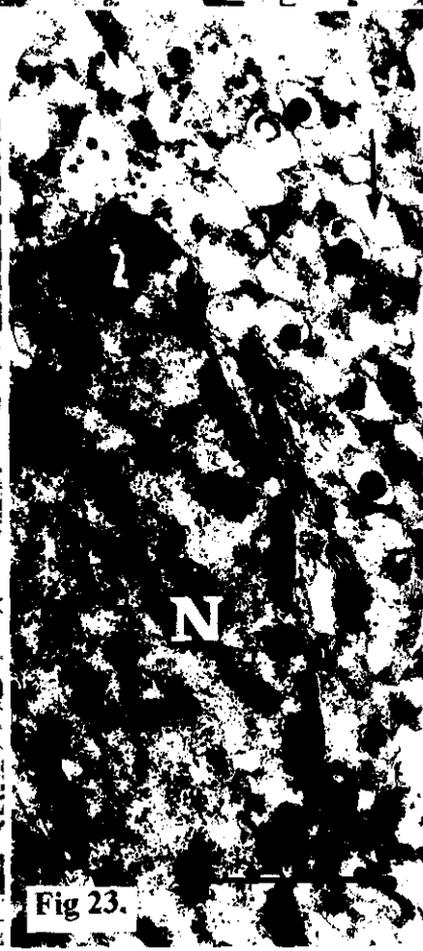


Fig 23.

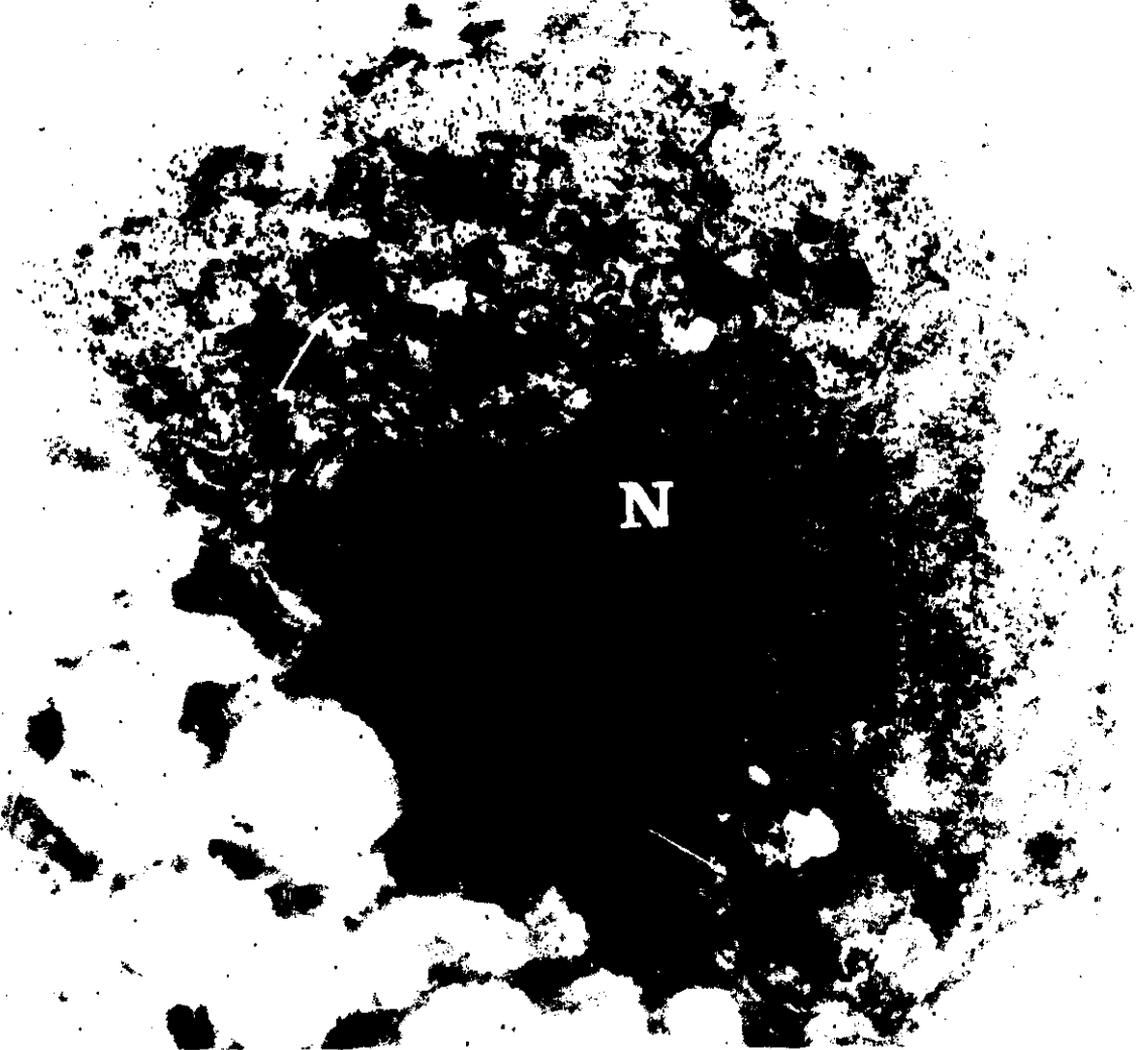


Fig 24. Célula productora de gastrina flanqueadas por células mucosas. N: núcleo. Flechas: gránulos de secreción electrodensos intensamente marcados. x22.400.

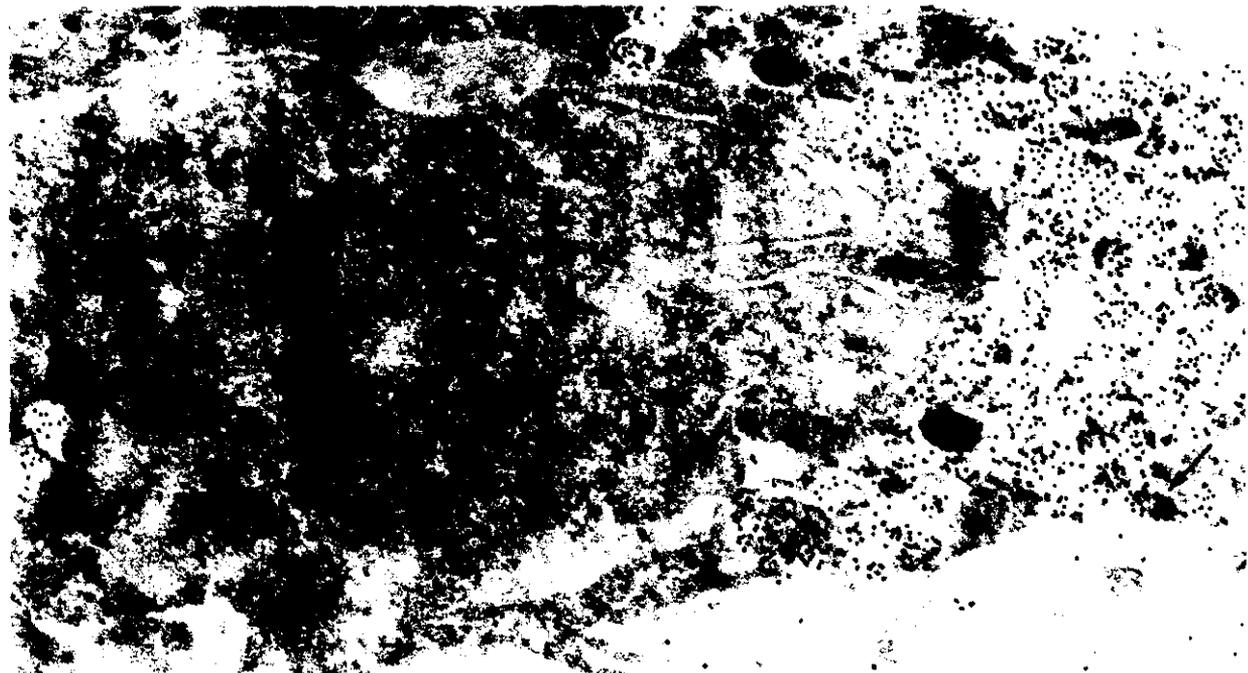


Fig 25. Célula G con gránulos de secreción electrodensos, uno de ellos en la escotadura del núcleo (N) x32.000.

Todos los tipos de gránulos presentan inmunoreactividad para gastrina, apareciendo más intensamente marcados los más electrodensos, confirmando así la naturaleza de la célula; sin embargo, también quedan depositadas partículas de oro en otros lugares del citoplasma y sólo en estas células (incluso empleando mayores diluciones del anticuerpo). La densidad de las partículas de oro oscila entre 12 y 35 por gránulo electrodenso.

La inmunocitoquímica electrónica revela que en las células después de la fijación a pH 7, la reactividad de gastrina se observa en su mayor parte en el citoplasma, en el interior de gránulos electrodensos e intermedios y en la periferia -pero no dentro- de los gránulos electrolúcidos.

Tras la fijación a pH 5, la inmunoreactividad de gastrina era visible principalmente en los centros de numerosos gránulos intermedios y muy escasa en el citoplasma. A este pH solo se observan algunos gránulos electrolúcidos.

4.3. RADIOINMUNOANÁLISIS DE GASTRINA.

4.3.1. CONCENTRACIONES BASALES DE GASTRINA SÉRICA.

Los valores de gastrina sérica basal obtenidos en perros, considerados sanos, de diferente edad, sexo y raza, en condiciones de ayuno de 24 horas se encuentran, en general, por debajo de 100 pg/ml.

Sobre 125 determinaciones basales de gastrina, sin considerar edad y sexo, se obtuvo una media de 46.74 pg/ml. \pm 22.92 con un valor mínimo de 11 y un máximo de 109 pg/ml, error de la media (SEM) 2.05. **Fig. 26.**

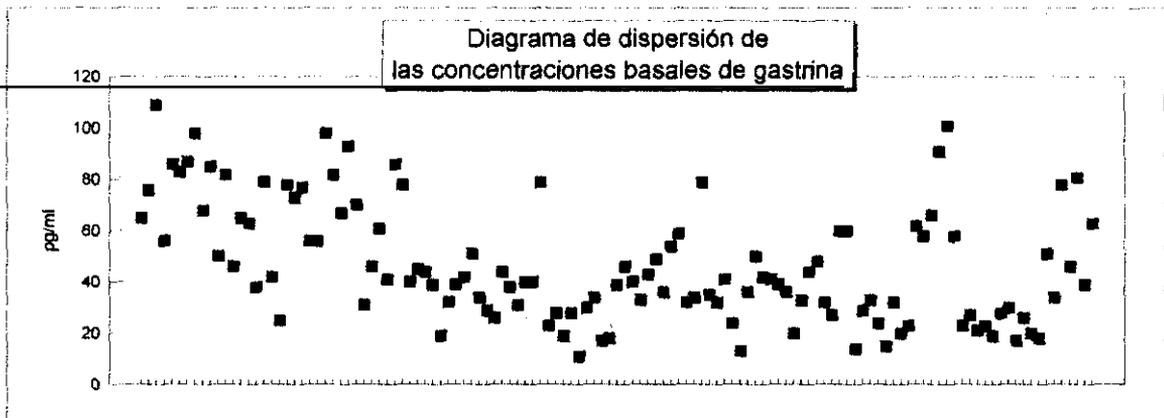


Fig 26

De estos sueros, tan sólo 2 (1.6%) presentaron una concentración basal de la hormona por encima de 100 pg/ml. y 21 (16.8%) por debajo de 25 pg/ml. Estos datos se recogen en la **Tabla 7**

TABLA 7
CONCENTRACIÓN BASAL DE GASTRINA EN EL PERRO

NUM.	SEXO	EDAD	RAZA	GASTRINA BASAL pg/ml
1	M	16	COLLIE	65
2	M	16	MASTIN	76
3	M	15	PASTOR ALEMAN	109
4	M	19	MESTIZO	56
5	M	11	MESTIZO	86
6	M	10	PASTOR ALEMAN	83
7	M	13	MESTIZO MASTIN	87
8	H	6	PASTOR ALEMAN	98
9	H	5	PASTOR ALEMAN	68
10	M	3	PASTOR ALEMAN	85
11	H	4	PASTOR ALEMAN	50
12	M	8	PASTOR ALEMAN	82
13	M	4	MESTIZO	46
14	M	4	PASTOR ALEMAN	65
15	H	6	BOXER	63
16	H	4	PASTOR ALEMAN	38
17	M	7	GALGO ESPAÑOL	79
18	M	6	PASTOR ALEMAN	42
19	M	5	PASTOR ALEMAN	25
20	M	7	GALGO ESPAÑOL	78
21	H	4	POINTER	73
22	M	5	SCHNAUZER GIGANTE	77
23	M	4	PASTOR ALEMAN	56
24	M	4	PASTOR ALEMAN	56
25	M	3	PASTOR ALEMAN	98
26	M	4	PASTOR ALEMAN	82
27	M	4	PASTOR ALEMAN	67
28	M	4	PASTOR ALEMAN	93
29	M	5	PASTOR ALEMAN	70
30	M	6	SETTER	31
31	M	3	PASTOR ALEMAN	46
32	M	3	PASTOR ALEMAN	61
33	M	1	MESTIZO	41
34	H	9	MASTIN	86
35	M	8	GALGO	78
36	M	4	MASTIN	40
37	M	7	PASTOR ALEMAN	45
38	H	6	MESTIZO	44
39	H	5	MESTIZO	39
40	M	1	PASTOR ALEMAN	19
41	M	1	MESTIZO MASTIN	32
42	H	2	TERRIER	39
43	H	2	TERRIER	42
44	H	10	TERRIER	51
45	M	9	MESTIZO	34
46	H	1	MESTIZO	29
47	H	6	MESTIZO	26
48	H	4	MASTIN	44
49	H	4	PASTOR ALEMAN	38
50	H	7	PASTOR ALEMAN	31
51	H	9	PASTOR ALEMAN	40
52	H	8	MASTIN	40
53	H	9	MESTIZO	79
54	H	1	MESTIZO	23
55	H	1	MESTIZO	28
56	H	2	MESTIZO	19
57	H	1	PASTOR ALEMAN	28
58	M	1	MESTIZO	11
59	H	3	MESTIZO	30

60	M	7	SETTER	34
61	H	1	MESTIZO	17
62	H	2	PASTOR ALEMAN	18
63	M	5	PASTOR ALEMAN	39
64	M	8	PASTOR ALEMAN	46
65	M	4	MASTIN	40
66	M	2	MESTIZO	33
67	M	9	MEST. P.ALEMAN	43
68	M	10	MESTIZO	49
69	M	3	PASTOR ALEMAN	36
70	M	4	PASTOR ALEMAN	54
71	M	2	PASTOR ALEMAN	59
72	M	2	MASTIN	32
73	M	9	MESTIZO	34
74	M	5	PASTOR ALEMAN	79
75	H	1	MASTIN	35
76	M	7	MESTIZO	32
77	M	9	PASTOR ALEMAN	41
78	M	2	MESTIZO	24
79	M	1	MESTIZO	13
80	M	3	MESTIZO	36
81	M	2	MESTIZO	50
82	M	1	MESTIZO	42
83	M	1	MESTIZO	41
84	M	1	PASTOR ALEMAN	39
85	H	1	PASTOR ALEMAN	36
86	H	1	PASTOR ALEMAN	20
87	M	1	PASTOR ALEMAN	33
88	H	1	MASTIN	44
89	M	1	PASTOR ALEMAN	48
90	M	1	MESTIZO MASTIN	32
91	H	1	PASTOR ALEMAN	27
92	H	1	COCKER	60
93	H	1	GRAN DANES	60
94	M	3	PASTOR ALEMAN	14
95	M	3	PASTOR ALEMAN	29
96	H	5	MESTIZO	33
97	H	7	MEST. P.BELGA	24
98	H	10	MESTIZO	15
99	H	5	MESTIZO	32
100	M	3	PASTOR ALEMAN	20
101	H	4	PASTOR ALEMAN	23
102	M	4	MASTIN	62
103	M	8	PASTOR ALEMAN	58
104	M	7	PASTOR ALEMAN	66
105	M	12	PASTOR ALEMAN	91
106	M	13	MESTIZO	101
107	M	1	SCHNAUZER GIG.	58
108	H	9	MESTIZO	23
109	H	11	COCKER	27
110	M	1	BEAGLE	21
111	M	1	BEAGLE	23
112	M	1	BEAGLE	19
113	H	1	BEAGLE	28
114	H	1	BEAGLE	30
115	H	1	BEAGLE	17
116	H	15	MESTIZO	26
117	M	1	PASTOR ALEMAN	20
118	M	1	PASTOR ALEMAN	18
119	M	1	PASTOR ALEMAN	51
120	M	1	PASTOR ALEMAN	34
121	M	10	PASTOR ALEMAN	78
122	M	9	MESTIZO	46
123	M	10	MEST. P.ALEMAN	81
124	H	9	MESTIZO MASTIN	39
125	H	10	MESTIZO MASTIN	63

4.3.2. CONCENTRACIONES BASALES DE GASTRINA SEGÚN EDAD Y SEXO.

RESPECTO A LA EDAD.

En el **grupo A**, formado por 34 perros menores de 1 año, la concentración media de gastrina inmunoreactiva en suero era de 31.68 pg/ml \pm 13.04, SEM 2.27, rango 49 y valores extremos 11 y 60 pgs.

En el **grupo B**, compuesto por 64 perros, se ha obtenido un valor medio de gastrina sérica de 49.33 pg/ml \pm 21.22, SEM 2.67, rango 84 y valores extremos de 14 y 98 pgs.

Para el **grupo C**, formado por 27 perros, la concentración media de gastrina fue de 59.59 pg/ml \pm 25.79, SEM 5.06, rango 94 y valores extremos de 15 y 109 pgs.

Aplicando la *t*-Student se observa que existen diferencias muy significativas entre la media aritmética de las concentraciones de gastrina del grupo A respecto a los grupos B y C ($p < 0.005$). Siendo $p = 0.054$ entre los dos últimos grupos. (Fig 27).

Existe una correlación lineal ($y = a + bx$) entre la edad y el nivel de gastrina en el perro ($r: 0.459$). (Fig. 28).

RESPECTO AL SEXO.

Grupo A: 19 machos y 15 hembras entre 0 y 1 año.

Perras: gastrina basal media: 32.13 pg/ml \pm 12.90, límites 17 y 60. SEM 3.44.

Perros: gastrina basal media: 31.31 pg/ml \pm 13.14, límites 11 y 58. SEM 3.09.

No existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ambas concentraciones medias de gastrina basal.

Grupo B: 42 machos y 22 hembras entre 2 y 8 años.

Perras: gastrina basal media: 41.45 pg/ml \pm 18.86, límites 18 y 98. SEM 4.11.

Perros: gastrina basal media: 53.45 pg/ml \pm 21.22, límites 14 y 98. SEM 3.31.

En este grupo sí existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones medias de gastrina sérica de ambos sexos. No siendo significativas las medias de edades (M: 4.5 ± 1.8 y H: 4.6 ± 1.7).

Grupo C: 17 machos y 10 hembras entre 9 y 19 años.

Perras: gastrina basal media: $47 \text{ pg/ml} \pm 23.40$, límites 15 y 86. SEM 7.69.

Perros: gastrina basal media: $66.18 \text{ pg/ml} \pm 22.45$, límites 34 y 109. SEM 5.8.

En este grupo los resultados están ligeramente por encima ($p = 0.06$) del límite de significación. Las medias de edades (M: 11.1 ± 3.9 , H: 10.1 ± 1.7) no son significativas.

Sin embargo, si comparamos el total de individuos de ambos sexos, 78 machos y 47 hembras, cuyas medias de edad no presentan diferencias significativas (H: 4.6 ± 3.5 , M: 5.2 ± 4.2), obtenemos los siguientes resultados. (Fig 29).

HEMBRAS	MACHOS
media arit. 39.21	media arit. 51.28
desv.std. 18.93	desv.std. 23.77
min. 15	min. 11
max. 98	max. 109
error std. 2.79	error std. 2.71

En consecuencia, los machos presentan concentraciones significativamente mayores de gastrina basal que las hembras ($p < 0.005$) Fig 30.

Además en los machos existe una correlación estrecha entre la edad y el incremento de gastrina en sangre (coef.cor.0.55; $p < 0.01$). Esta correlación, sin embargo, no se observa en las hembras (coef.cor.0.21).

CONCENTRACION BASAL DE GASTRINA EN RELACION CON LA EDAD

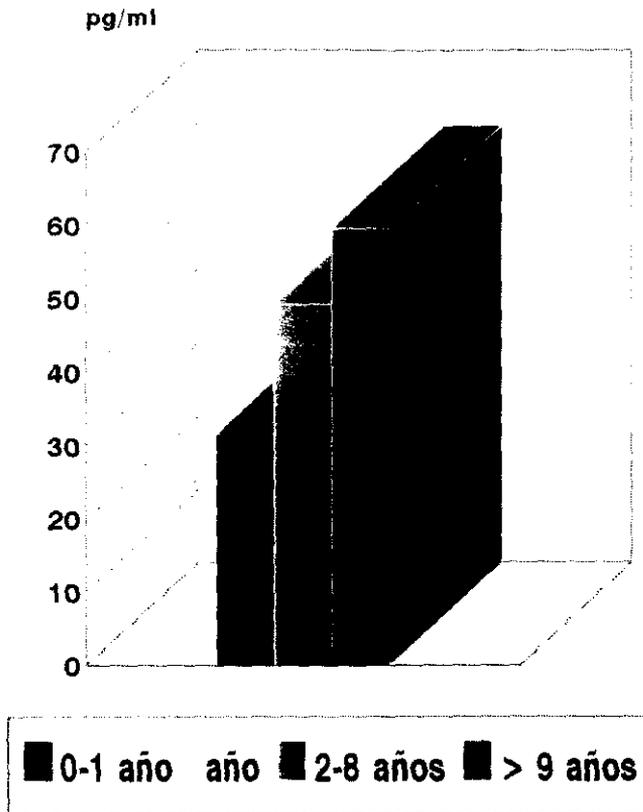


Fig 27

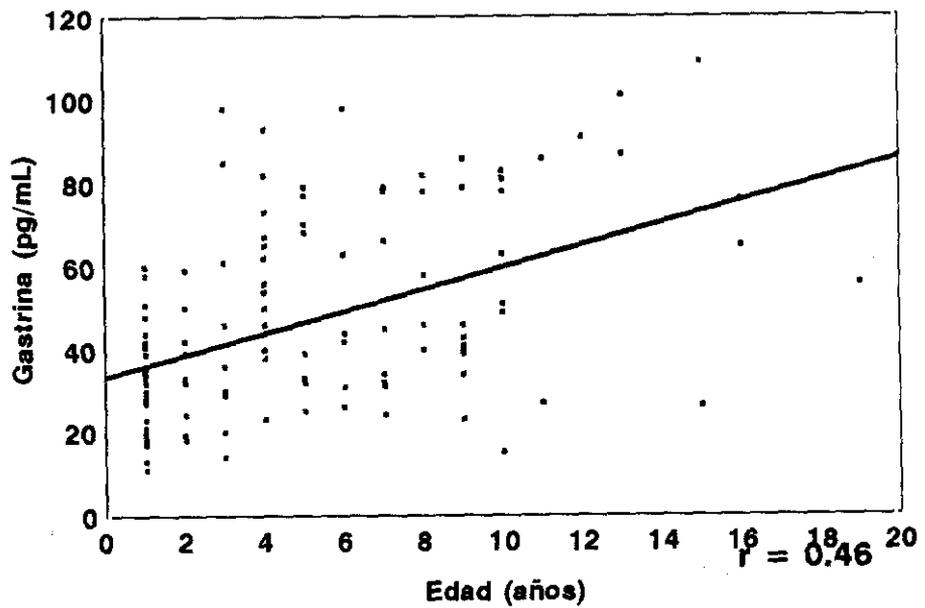


Fig 28

**CONCENTRACIÓN BASAL MEDIA
DE GASTRINA EN RELACIÓN CON EL SEXO**

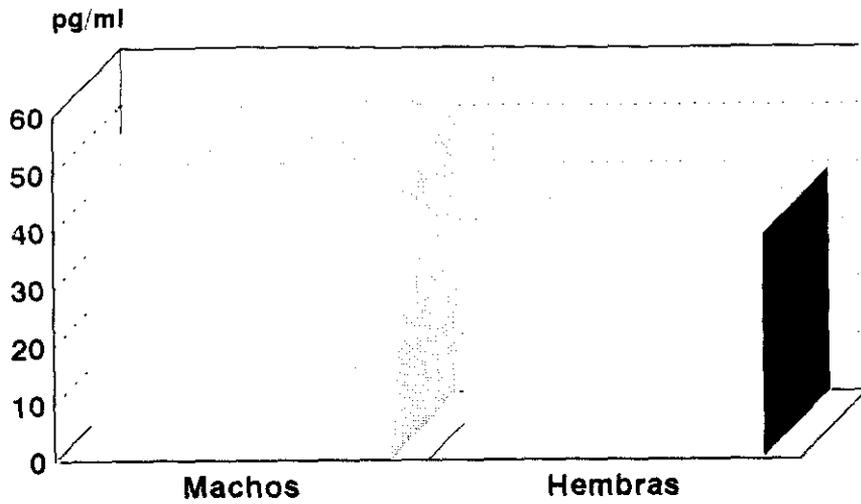


Fig 29

**CONCENTRACIÓN MEDIA DE GASTRINA BASAL
EN RELACIÓN CON LA EDAD Y EL SEXO**

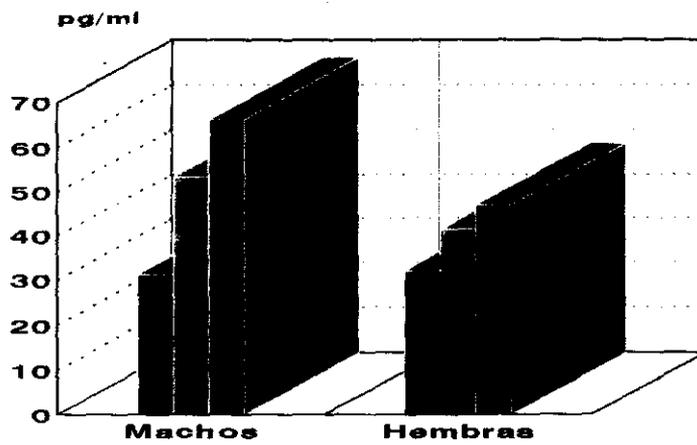


Fig 30

0-1 AÑO
 2-8 AÑOS
 MÁS DE 9 AÑOS

ESTIMULACIÓN DE GASTRINA CON DIFERENTES ALIMENTOS
Total muestra (n=30)

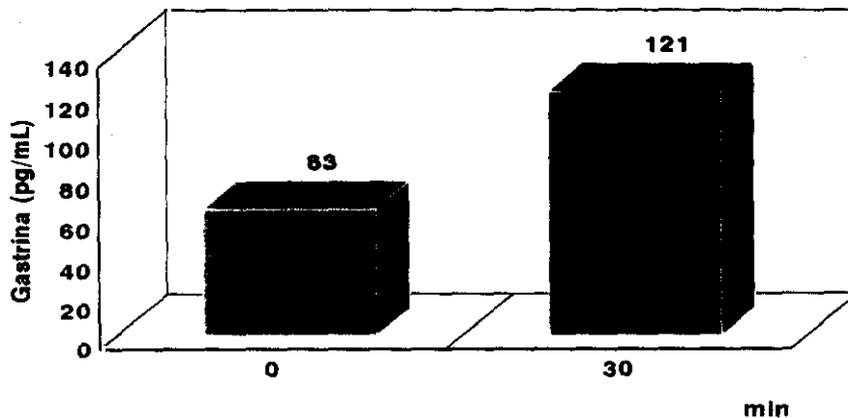


Fig 31

4.3.3. VALORES DE GASTRINA A LOS 30 MIN. DE LA INGESTA.

En la **Tabla 8** se expresan los resultados obtenidos en 30 perros de ambos sexos y diferentes razas, con edades comprendidas entre 5 y 10 años, a los que se suministraron diferentes dietas.

N	SEXO	EDAD	RAZA	DIETA	G.BAS	G.30'	INCRE
1	H	6	POINTER	1	77	107	30
2	M	8	SETTER	1	31	61	30
3	M	8	PASTOR ALEMAN	1	42	120	78
4	M	6	PASTOR ALEMAN	1	56	138	82
5	M	6	PASTOR ALEMAN	1	56	124	68
6	M	5	PASTOR ALEMAN	1	98	128	30
7	M	6	PASTOR ALEMAN	1	82	95	13
8	H	8	PASTOR ALEMAN	2	98	129	31
9	H	7	PASTOR ALEMAN	2	68	103	35
10	M	5	PASTOR ALEMAN	2	85	101	16
11	M	6	MASTIN	2	26	102	74
12	H	9	MASTIN	2	66	145	79
13	M	10	PASTOR ALEMAN	2	83	201	118
14	M	9	PASTOR ALEMAN	2	44	62	18
15	H	6	PASTOR ALEMAN	2	50	75	25
16	M	8	MESTIZO	2	61	129	68
17	M	10	PASTOR ALEMAN	3	82	98	16
18	M	6	PASTOR ALEMAN	3	67	89	22
19	M	9	MESTIZO	3	40	78	38
20	M	8	PASTOR ALEMAN	3	35	50	15
21	M	9	PASTOR ALEMAN	3	93	108	15
22	M	7	MESTIZO	3	46	66	20
23	H	6	PASTOR ALEMAN	3	32	120	88

24	M	7	PASTOR ALEMAN	3	41	63	22
25	M	10	MESTIZO	4	98	263	165
26	M	8	MESTIZO	4	75	209	134
27	M	10	GALGO	4	78	216	138
28	H	8	MASTIN	4	79	152	73
29	M	8	PASTOR ALEMAN	4	45	153	108
30	M	6	MESTIZO MASTIN	4	62	147	85

NOMBRE	N	MEDIA	STD	SEM	MINIMO	MAXIMO
GASTR. BASAL	30	63.2	21.8	3.9	26	98
GASTRINA 30 min.	30	121	50.2	9.1	50	263

Tabla 8

Aplicando el test de comparación de dos medias para datos apareados, se obtiene un incremento muy significativo ($p < 0.001$) de la gastrina a los 30 minutos tras la ingesta sobre la basal (**Fig 31**). Estos incrementos también son significativos para cada una de las dietas (**Fig 32**).

También se observa (aplicando el coeficiente de correlación lineal de Pearson) una relación directa entre la edad y el incremento de la hormona tras la comida.

Estos resultados suponen un incremento medio de gastrina en suero tras la ingesta de 57.8 pg/ml. a los 30 minutos, sin embargo se observan grandes diferencias según el alimento suministrado, que oscilan entre 13 y 165 pg/ml.

Con las dietas nº 1, 2, 3 y 4 se obtuvieron unos incrementos medios de las concentraciones de gastrina de 47.28 ± 27.8 , 51.55 ± 34.8 , 29.50 ± 24.7 y 117.17 ± 34.86 pg/ml. respectivamente, siendo significativas las diferencias observadas entre la dieta nº 4 y las otras tres ($p < 0.005$) (**Fig 33**). Hay que señalar que existe una fuerte variabilidad individual en la respuesta.

PRUEBA DE ESTIMULACION DE GASTRINA CON DIFERENTES ALIMENTOS

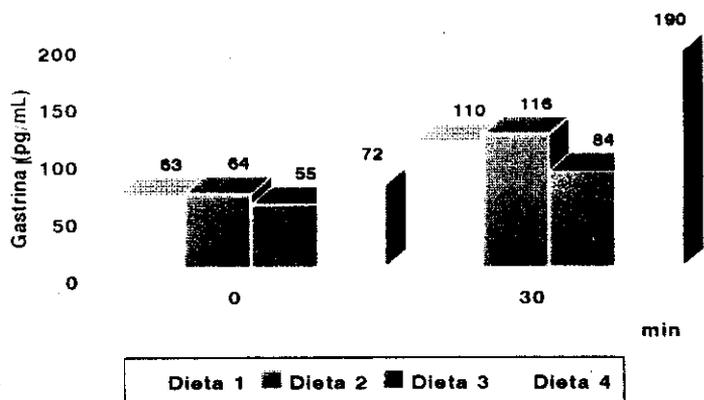


Fig 32

INCREMENTO DE RESPUESTA DE LA GASTRINA A DIFERENTES ALIMENTOS (30 minutos)

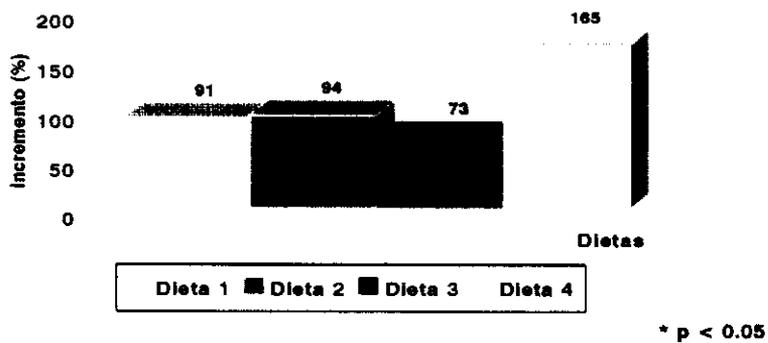


Fig 33

4.3.4. CURVAS DE GASTRINA SEGÚN TIPO DE ALIMENTACIÓN.

En las **tablas 9, 10, 11, y 12** se representan los valores de gastrina para diferentes dietas.

DIETA 2. PIENSO SECO. EP										
Nº de animales: 2										
Nº	SEXO	BASAL	15'	30'	45'	60'	75'	90'	105'	120'
1	M	66	134	145	152	169	100	97	80	61
1*	M	44	48	62	70	64	23	21	17	19
2	M	26	66	100	161	197	114	81	62	48

MEDIA	46	100	122	156	183	107	89	71	54
DES.EST.	28	48	31	6	19	10	11	13	9
SEM	20	34	22	4	14	7	8	9	6

Tabla 9.

* Se administró solamente el 25% de la cantidad anterior, considerada normal, (estos valores no se han tenido en cuenta para el cálculo estadístico). (Fig. 34).

Por simplificar, solo se reflejan valores enteros en los parámetros considerados:

DIETA 3. PIENSO SECO. ER										
Nº de animales: 2										
Nº	SEXO	BASAL	15'	30'	45'	60'	75'	90'	105'	120'
3	M	12	52	73	89	101	59	38	30	29
4	M	32	68	120	151	140	93	90	81	62

MEDIA	22	60	96	120	120	76	64	55	45
DES.EST.	14	11	33	43	27	24	36	36	23

SEM	10	8	23	31	19	17	26	25	16
------------	----	---	----	----	----	----	----	----	----

Tabla 10.

DIETA 4: CARNE PICADA CRUDA.										
N° de animales: 4										
N°	SEXO	BASAL	15'	30'	45'	60'	75'	90'	105'	120'
2	M	62	81	147	118	103	94	86	81	70
3	M	24	45	54	54	161	57	50	48	44
4	M	35	46	50	139	59	58	55	56	50
5	H	58	144	117	98	74	66	61	59	53

MEDIA	44	79	92	102	99	68	63	61	54
DES. EST.	18	46	47	36	45	17	15	14	11
SEM	9	23	23	18	22	9	8	7	5

Tabla 11

DIETA 5. ARROZ COCIDO.										
N° de animales: 4										
N°	SEXO	BASAL	15'	30'	45'	60'	75'	90'	105'	120'
3	M	16	18	18	21	88	28	17	17	18
4	M	25	28	30	33	39	49	45	44	37
5	H	45	57	62	66	75	100	83	61	56
6	M	26	34	54	63	68	70	56	26	21

MEDIA	28	34	41	45	67	61	50	37	33
DES. EST.	12	16	20	22	20	30	27	19	17
SEM	6	8	10	11	10	15	13	9	8

Tabla 12

En la **Fig. 35** se representan las curvas de respuesta de gastrina a las dietas números 3, 4 y 5.

CURVAS DE GASTRINA TRAS DIFERENTE CANTIDAD DE ALIMENTO
Dieta 2: PIENSO SECO

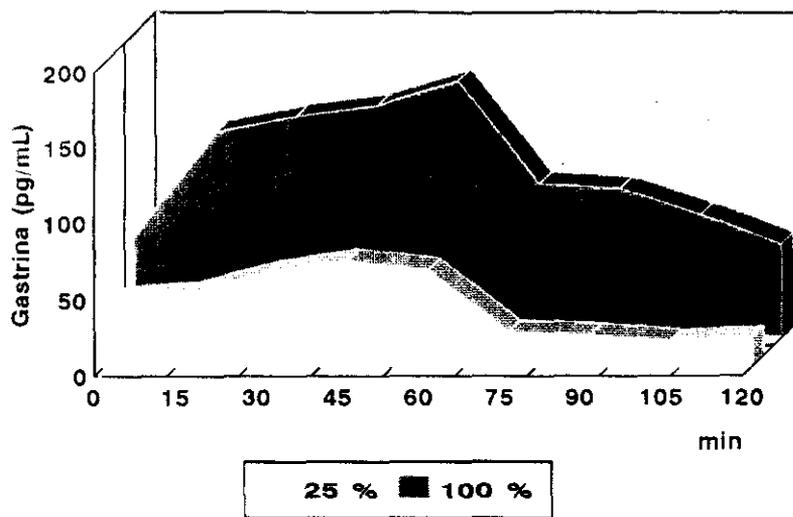


Fig. 34

Respuesta de gastrina a un test de comida

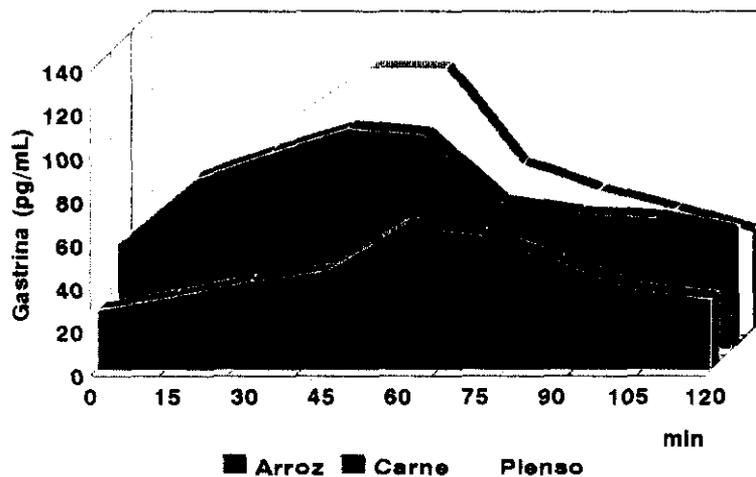


Fig. 35

5. DISCUSIÓN.

5.1. VALORACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE TRABAJO.

5.1.1. TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS.

a.- Inmunohistoquímica enzimática en microscopía óptica.

Como procedimientos eficaces para la identificación de moléculas biológicas específicas se han utilizado sistemas basados en la detección por anticuerpos, que presentan diversas ventajas, quizás las más significativas son su potencial especificidad y sensibilidad.

Los métodos de marcaje indirectos producen menor color de fondo y son capaces de una mayor amplificación de señal. Cada anticuerpo se une a su antígeno diana y presenta múltiples blancos para el reactivo secundario. El método utilizado en este trabajo es básicamente el publicado por Polak en 1987.

Aunque la alta afinidad entre la avidina, una proteína de la clara del huevo de pm. 68000 y la vitamina biotina no está plenamente aclarada, esta interacción era aprovechada por primera vez al principio de la década de los sesenta.

La biotina puede unirse a una variedad de sustancias como son inmunoglobulinas, toxinas, hormonas o ácidos nucleicos. La sustancia marcada con biotina es visualizada después por la avidina conjugada con fluoresceína, ferritina o peroxidasa de rábano.

Sin embargo, la utilidad del sistema basado en biotina-avidina está limitado por dos inconvenientes principales asociados con la estructura química y propiedades de la avidina (Chaiet y Wolf 1964):

1) La avidina tiene un punto isoeléctrico de aproximadamente diez y tiene por tanto una carga positiva alta a pH neutro. Como resultado, se une de una manera no específica a moléculas cargadas negativamente como son ácidos nucleicos o fosfolípidos originando un marcado color de fondo.

2) Esta forma de avidina es una glicoproteína y puede reaccionar con otras moléculas biológicas como son las lecitinas, por medio de su contenido en carbohidratos (7%).

Mediante estudios de electroforesis en columna con gel de poliacrilamida Chaiet y Wolf (1964) llegaron a determinar que hasta cuatro moléculas de biotina podían unirse a cada molécula de la proteína de 60.000 daltons (estreptavidina), frente a las tres que se han reconocido en avidina.

La ventaja del empleo de estreptavidina es la eliminación de las propiedades de unión no específicas inherentes a la avidina. La estreptavidina tiene un punto isoeléctrico de 6.5 y no tiene carbohidratos por lo que presenta un menor color de fondo y una mayor señal que la avidina.

La amplificación de la señal en el sistema estreptavidina-biotina se logra aprovechando la habilidad del anticuerpo secundario para no reconocer más que un lugar del anticuerpo primario y por biotilación del primero en múltiples lugares.

Por ello, el sistema estreptavidina-biotina proporciona una sensibilidad superior a la del complejo avidina-biotina convencional (ABC). Esta técnica también es ventajosa frente al método peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) ya que emplea un único reactivo universal marcado (estreptavidina conjugada a enzima), en lugar de diferentes complejos PAP para cada sistema animal.

La estreptavidina puede unirse a fluoresceína, rojo Texas, peroxidasa, fosfatasa alcalina, beta-galactoxidasa y oro coloidal.

Las ventajas de la técnica de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (S.B.P.) frente a la técnica de Inmunofluorescencia son principalmente las siguientes (Polak, 1987):

-Visualiza la morfología tisular (mediante el empleo de tinción de contraste).

- Larga duración de las preparaciones (semi-permanentes o permanentes).
- Empleo del microscopio óptico convencional.
- Es, al menos, tan sensible como los métodos de inmunofluorescencia (DeLellis, 1981).

Las desventajas son:

- El empleo de un mayor número de pasos que en inmunofluorescencia.
- El uso de sustancias cromógenas presumiblemente cancerígenas: DAB (diaminobenzidina), AEC (amino-etil-carbazol).

b.- Inmunohistoquímica con partículas de metales pesados (oro coloidal y plata) en microscopía óptica.

El empleo práctico de estas técnicas es reciente. Fueron introducidas primeramente por Faulk y Taylor (1971) cuando absorbieron partículas de oro en un anticuerpo de conejo anti-salmonela.

A mediados de la pasada década comenzó a emplearse el oro coloidal en inmunohistoquímica y desde comienzo de los 90 el "realzado" o intensificado con plata (*Silver Enhancing*), método que ha provisto de una alta especificidad y sensibilidad a las técnicas para la visualización de antígenos en microscopía óptica.

Un conjugado de oro coloidal consiste en una suspensión de partículas de oro unidas a una proteína o macromolécula seleccionada que actúa como anticuerpo. El tamaño de la partícula de oro oscila desde 1 a 100 nm.

La conjugación de las proteínas seleccionadas a las partículas de oro depende de al menos tres fenómenos físicos:

- Atracción de la carga negativa de la partícula de oro a la proteína cargada

positivamente.

-Absorción hidrofóbica de la proteína en la superficie de la partícula de oro.

-Ligamiento del oro a sulfuro (ligamiento dativo), cuando éste pueda existir en la estructura de la macromolécula.

El oro puede conjugarse con una amplia variedad de macromoléculas incluyendo proteínas, carbohidratos, polisacáridos, enzimas y ácidos nucleicos.

El oro conjugado puede emplearse para demostración directa o indirecta de antígenos. El método directo es el más simple; sin embargo, en el método indirecto es necesario un anticuerpo secundario para detectar el primario. De este modo se produce una amplificación de la señal que puede ser de hasta 8 veces comparado con el método directo.

Los conjugados de anticuerpo-oro son absorbidos en gammaglobulinas, de determinada especie animal, mezclada con un dializado de etilenglicol, dejando la mezcla en reposo y a temperatura ambiente durante 15 min. y centrifugando después a 5°C a 30,000 rev/min. (Faulk y Taylor, 1971).

Para microscopía óptica pueden emplearse partículas de oro de un diámetro de 1nm ó 5nm.

El tipo de fijador a emplear es importante. El formaldehído respeta más el antígeno que el glutaraldehído, sin embargo este último conserva mejor las estructuras. Puede ser conveniente el empleo de ambos fijadores.

Se debe evitar el empleo de adhesivos que contienen elementos metálicos como aluminio, cromo, etc, ya que pueden causar precipitación de la plata sobre el porta; o poli-L-lisina que puede causar atracción de las partículas de oro al portaobjetos. Puede

reforzarse la adherencia de las secciones mediante el calentamiento de las muestras a 60°C durante 5 minutos antes de desparafinar.

Las partículas más pequeñas tienen mayor afinidad que las grandes ya que la partícula de 1 nm es menor que la molécula anticuerpo (inmunoglobulina) y tiene mayor poder de penetración en las células y tejidos sin necesidad de aumentar la permeabilización mediante detergentes que pueden causar daños y pérdidas de constituyentes intracelulares.

El oro metálico cataliza la reducción de los iones de plata (lactato de plata, muy sensible a la luz) a plata metálica en presencia de un agente reductor como es la hidroquinona (Danscher y Nørgaard, 1983).

La diferencia de este sistema con el revelado fotográfico (químico) normal es la fuente de los iones de plata. En el revelado químico solo se aporta la sustancia reductora; los iones de plata se originan de la disolución de los cristales de bromuro de plata de la emulsión fotográfica por exposición a la luz y pasan posteriormente a plata metálica por acción del agente reductor.

El revelado inmunohistoquímico contiene al mismo tiempo los iones de plata y la sustancia reductora.

El empleo de plata para aumentar la señal del oro en las preparaciones observadas con microscopio óptico, hace crecer las partículas hasta aproximadamente 200nm. al cabo de unos 10-15 minutos, haciendo evidente una coloración pardo/negra sobre la muestra.

Ventajas:

Este procedimiento es simple y puede seguirse el desarrollo de la reacción observándola al microscopio con luz epipolarizada (aumenta la sensibilidad) o en campo claro y deteniéndola en el momento más adecuado, mediante inmersión en agua destilada

o PBS.

En esta técnica no hay interferencia con actividad enzimática endógena y su sensibilidad es muy alta. Los límites de mínima detección pueden determinarse por *immunoblotting*. Los test de control de calidad requieren que todos los conjugados de IgG detecten al menos 10 pg de proteína (IgG de conejo o ratón), aunque el límite normalmente alcanza la región de 1 pg.

Las altas diluciones de los conjugados de oro reducen la posibilidad de uniones no específicas a componentes altamente cargados de la matriz del tejido (ácidos nucleicos, componentes del estroma, células necróticas, etc.).

La técnica de tinción con inmuno-oro-plata de antígenos celulares y tisulares es sensible, rápida y de muy alta resolución, permitiendo el empleo del Ac. primario a mayores diluciones. Puede emplearse en secciones de parafina, resina y criostato. La reacción es visible a los 5-15 minutos, tiempo en el que la partícula alcanza un tamaño de 250 nm.

Los materiales empleados en el marcaje con oro no son de manejo peligroso y el procedimiento de incubación comprende simplemente dos pasos, produciendo una tinción más intensa que la técnica de peroxidasa. La morfología del tejido queda perfectamente visualizada mediante el empleo de Hematoxilina-Eosina, coloración tricrómica, etc.

La inmunotinción mediante oro-plata presenta mayor intensidad, a las mismas diluciones, que la técnica PAP -frente a la que también es ventajosa la técnica de SBP empleada por nosotros- principalmente en la demostración de neurofilamentos, calcitonina, gastrina y CCK. Springall y cols. (1984), recomiendan este método para el estudio de células endocrinas.

c.- Inmunocitoquímica en microscopía electrónica.

La inmunocitoquímica electrónica nació hace tres décadas cuando S.J. Singer introdujo la proteína ferritina conteniendo hierro como una partícula marcada que podía conjugarse con anticuerpos y visualizarse en el microscopio electrónico. Es un método que combina la alta resolución y la especificidad y sensibilidad de la inmunocitoquímica.

La inmunocitoquímica ultraestructural ya fue considerada como una técnica más sensible que el radioinmunoensayo (Moriarty y cols. 1973). Para estos estudios en principio se utilizó la ferritina conjugada a inmunoglobulina. Teóricamente, ahora es posible localizar, con aproximación de nanómetro, un amplio rango de moléculas biológicas.

La técnica de marcaje, mediante oro coloidal hace posible el desarrollo de la inmunohistoquímica de alta resolución mediante el empleo del microscopio electrónico. Básicamente hemos empleado la técnica descrita por Merighi (Polak y Priestley, 1992), originalmente introducida por Larsson, en la cual existe una buena relación señal-fondo (*signal-to-noise*).

Cuando se requiere alta resolución (superior a 100 nm), doble unión o cuantificación, la tinción post-inclusión es probablemente el método de elección (Polak y Priestley, 1992). El inconveniente, sin embargo, radica en que el antígeno y la antigenicidad se pierde siempre durante la inclusión y por ello, si un antígeno está presente a baja concentración, es lábil o sensible a la deshidratación e inclusión, puede hacerse necesario el empleo del procedimiento de tinción previa a la inclusión.

Respecto a los fijadores, es necesario aclarar que es muy difícil una comparación entre los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigadores porque los efectos de la fijación varían no solo con diferentes antígenos y tejidos, sino también cuando se emplean diferentes antisueros para tefir el mismo antígeno (Polak y Priestley, 1992).

Una buena fijación en inmunocitoquímica se debate entre retener el antígeno y mantener la estructura. La primera meta de la microscopía inmunoelectrónica es la

correlación de estructura y función. Mortensen y Morris (1977), observaron que las condiciones de fijación tienen efecto sobre la apariencia ultraestructural de los gránulos de gastrina en la rata.

En general, el paraformaldehído entre 1 - 4% no tiene efectos adversos sobre la antigenicidad de muchas moléculas biológicas que pueden localizarse por inmunotinción.

El glutaraldehído tiene una molécula bastante mayor que el anterior fijador, por lo cual su poder de penetración en el tejido es más bajo. Sin embargo, es un reactivo bifuncional y se entrelaza con las proteínas tisulares más eficazmente que el paraformaldehído.

Grandes antígenos proteicos pueden destruirse a concentraciones superiores a 0.5% de glutaraldehído. Los péptidos y pequeñas proteínas pueden fijarse con concentraciones de 0.5 a 2%, y antígenos muy pequeños como aminoácidos, pueden fijarse a altas concentraciones (5%) (Polak y Priestley, 1992).

La fijación con ácido tánico evidencia mejor las membranas celulares y los procesos de exocitosis (Mizuhira y Futaesaku, 1972).

En nuestra experiencia la mejor fijación y ultraestructura se obtuvo con el fijador nº2, es decir, con Glutaraldehído al 0.5% y Paraformaldehído al 4% durante 3 horas.

Un aspecto muy importante en la técnica inmunoelectrónica es el empleo de una resina adecuada y un procedimiento óptimo en el proceso de inclusión. Las resinas para inclusión utilizadas en microscopía electrónica pueden ser:

-Resinas Epoxi (ej. Araldita, Epon, Spurr y resinas poliésteres como el Vestopal) son hidrofóbicas, no polares, rechazan el agua y pueden producir un incremento en la atracción hidrofóbica inespecífica.

Según nuestra experiencia las resinas epoxi dan muy buena señal, pero aumentan el ruido de fondo y se pierde bastante ultraestructura.

-Resinas Acrílicas (ej. LR White, LR Gold, Lowicryl K4M, Historesin -antes Technovit 7100- Bioacryl...) son hidrofílicas, humedecen bien la superficie de la sección con lo cual se reduce las uniones no específicas de la resina, sin embargo la naturaleza no cíclica de la resina no conserva totalmente la integridad estructural del tejido y las muestras son menos estables a la emisión de electrones.

Nosotros hemos empleado una resina epoxi: Araldita, y dos resinas acrílicas: Historesin y Bioacryl (Unicryl), esta última es una nueva resina acrílica polar, muy hidrofílica, derivada del GMA (glicol-metacrilato) (Manara y cols. 1993; González y cols. 1994). Está constituida por ésteres de acrilato en un 94% y monómero de estireno en un 4%. Ambos compuestos son tóxicos y han sido reconocidos como cancerígenos en animales de laboratorio y también pueden causar efectos mutágenos y teratógenos. La resina debe ser manipulada con precaución y empleando medidas de protección.

Esta resina presenta importantes ventajas en su empleo y es la que nos ha dado mejores resultados en inmunocitoquímica electrónica, que podemos resumir en una mejor preservación del antígeno, una menor tinción de fondo (aunque la señal es también menor), buena estabilidad y un amplio rango de polimerización. En consecuencia, las imágenes que se obtienen en el microscopio electrónico de transmisión muestran una mejor ultraestructura que la obtenida mediante el uso de otros medios de inclusión, siendo mínima, además, la retracción celular y tisular.

La inclusión en Unicryl puede realizarse por calor aplicado sobre bloques pequeños (1 ml.) según la **Tabla 13**.

TEMPERATURA	TIEMPO DE POLIMERIZACIÓN
50°C	2-3 días
60°C	1-2 días
70°C	1 día

Tabla 13

Hay que tener presente que durante el proceso de polimerización se origina calor por la reacción exotérmica que tiene lugar. Esta temperatura puede dañar el antígeno si es demasiado alta. Los bloques de mayor tamaño polimerizan más rápidamente, precisamente por originarse una mayor reacción.

La polimerización por radiación ultravioleta se utiliza en tejidos que son sensibles a la temperatura. La luz ultravioleta, en esta resina, puede emplearse en un rango de -10°C a +20°C. Como procedimiento de referencia, empleando dos lámparas ultravioletas de longitud de onda de 360 nm y de 8w de potencia a una distancia de 15 cm. y a una temperatura de 4°C, el proceso dura de 2 a 3 días.

La resina también puede polimerizar por disminución progresiva de la temperatura hasta -30°C durante 8-10 horas, mientras se realiza la deshidratación por alcoholes a concentraciones crecientes hasta el absoluto (1 hora en cada uno). El alcohol etílico absoluto, al igual que la resina, permanece líquido a -50°C.

Los problemas planteados en el empleo de estas resinas están contemplados por diversos autores (Scala y cols. 1992; Polak y Priestley, 1992; González y cols. 1994).

Cuando está bien polimerizada la resina Unicryl presenta una mayor superficie de corte en secciones menores de 0.1 - 0.2 μm de manera que se produce una mayor exposición del antígeno tisular, aumentando por tanto su reactividad. Las partículas de oro no deben quedar arracimadas en las preparaciones, no debiendo quedar más de tres partículas juntas.

Nosotros hemos empleado para la polimerización el procedimiento de incubación de las piezas a 55° durante 2 días, obteniendo buenos resultados, ya que la hormona en estudio es bastante resistente a esta temperatura.

La perfusión "in vivo" con ácido tánico al 1%, en un animal bajo anestesia, puede detener la exocitosis de los gránulos de la célula secretora, o hacerla más lenta, de este modo puede visualizarse en las preparaciones (Newman y cols. 1991). No obstante, la perfusión vascular presenta problemas prácticos en su aplicación, fundamentalmente en lo referente a la presión aplicada y al tiempo de perfusión. La presión debe ser, aproximadamente, el equivalente de la sistólica del animal, que en la rata es de 180 mmHg. Esto es muy importante ya que una presión baja produce una perfusión inadecuada y una presión alta provoca cambios en la ultraestructura del tejido (Polak y Priestley, 1992).

En cuanto al tiempo de perfusión, ha sido determinado para la rata y viene a ser de 450 ml. de fijativo en 45 minutos (10 ml/min). Después, las muestras se seccionan en pequeños bloques y se incluyen durante dos horas en el mismo fijador.

En nuestro caso, hemos optado por el procedimiento de inmersión postmortem del tejido en ácido tánico (Buma y cols. 1984), obteniéndose una mejor observación de las membranas celulares, sin embargo, no hemos podido observar procesos claros de exocitosis. Debe transcurrir poco tiempo entre la obtención de la muestra y la fijación.

Con la inmunotinción única puede realizarse un conteo del número de partículas de oro por área de tejido. Con el sistema de doble marcado no puede realizarse la cuantificación por problemas de naturaleza química y/o diferencias en la eficacia del marcado con diferentes tamaños de partículas (solapamiento).

Los procedimientos directos de marcado son más sensibles y convenientes para inmunoelectrónica que los indirectos (adición de un sustrato-cromógeno) (Polak y Priestley, 1992).

El empleo de criosecciones es también una alternativa en microscopía electrónica. La técnica de *freeze-etching* o congelación-sublimación mediante alto vacío, cubriendo posteriormente la superficie de fractura con platino y carbono, evita la fijación, deshidratación e inclusión, reduciendo al mínimo los artefactos dando imágenes que se admiten como muy próximas a la realidad. No se ha realizado en este trabajo por los problemas prácticos que plantea sobre todo en lo referente a las modificaciones del ultramicrotomo de rutina, la crioprotección del tejido y la dificultad del marcaje con partículas de oro de 15 o incluso de 30 nm.

5.1.2. TÉCNICA DE RADIOINMUNOENSAYO.

El radioinmunoensayo (RIA) se basa en reacciones de unión competitiva (Piroird y Lombard, 1980). La concentración del anticuerpo es normalmente suficiente para fijar entre 30 y 80% del material marcado. El marcaje radiactivo con isótopo I^{125} radica sobre los residuos de tirosina de la sustancia a medir, no obstante, en ocasiones se marca el propio anticuerpo (IgG) para evitar ciertos inconvenientes (Kaplan y Pesce, 1986).

Esta técnica no presenta amplificación de la señal en contraposición al enzimoímmunoanálisis con inmunoabsorbentes (ELISA), sin embargo, el límite de detección es sensiblemente superior a otros ensayos de unión competitiva y además puede utilizarse con moléculas de bajo y alto peso molecular.

La técnica de radioinmunoensayo, empleada por nosotros, ha demostrado ser válida para la determinación de gastrina sérica en el perro.

Solo tenemos una referencia de la utilización de este mismo *kit* comercial en el perro; se trata de un estudio sobre el papel del intestino delgado en los niveles de gastrina sérica (Catambrone y cols, 1980).

Sin embargo, algunos autores han empleado también equipos de

de diferentes marcas comerciales basados en el empleo de gastrina G-17 humana (Becton Dickinson: Gabbert y cols. 1984. Cambridge Med. Diag., Inc.; Fox y cols. 1990).

5.1.2.a. Coeficientes de variación intra e inter-ensayo.

Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo con respecto al valor medio de seis y cinco sueros respectivamente, medidos N veces, quedan reflejados en las siguientes tablas:

SUEROS	N	VALOR MEDIO pg/ml	COEF. DE VARIACIÓN.%
A	3	18	0
B	3	88.6	0.56
C	3	16.5	9.09
D	3	18.3	1.60
E	3	28	3.57
F	3	30	3.33

Media C.V.% 3.02

Tabla 14.

SUEROS	N	VALOR MEDIO pg/ml	COEF.DE VARIACIÓN %
A	3	12.6	12
B	3	32	7.9
C	3	10.6	14.2
D	3	20.3	16.9
E	3	20	7.7

Media C.V.% 11.75

Tabla 15

Las lecturas de las alícuotas de cada suero se realizaron a los 0, 7, y 14 días de la obtención de la muestra, siendo mantenidas entre tanto a -20°C .

5.2. VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS

5.2.1. INMUNOHISTOQUÍMICA ÓPTICA.

No se ha reconocido actividad de gastrina en páncreas del perro neonato ni en el adulto, como ya han señalado Stanley y cols. (1976), Hawkins y cols. (1987), Rollan (1994). Bardram y cols. (1990), encuentran indicios de progastrina en el páncreas del perro, sin embargo, no hay inmunoreactividad. Kobe y cols. (1976) observaron áreas de fluorescencia inespecífica, especialmente alrededor de los conductos de este órgano. Estos autores tampoco encontraron células positivas a gastrina en glándulas salivares, esófago, intestino delgado y colon del perro.

El hallazgo de Nilsson y Yalow, trabajando con extractos pancreáticos por radioinmunoensayo, de pequeñas cantidades de la hormona en tramos posteriores de duodeno, yeyuno, páncreas y otros lugares en el perro puede deberse, como estos mismos autores admiten, a probable reactividad cruzada con colecistoquinina-pancreozimina (CCK-P) y big-gastrina. Estos autores utilizan extractos de gastrina de cerdo no demasiado puros.

Creemos de interés señalar que en el perro, una vez superado el esfínter pilórico prácticamente dejan de observarse células G. Realmente es rara la coexistencia de este tipo celular con el caliciforme duodenal.

El análogo estructural de gastrina (CCK), es una sustancia de 33 aminoácidos, ancestro de la gastrina en vertebrados inferiores; es secretada por las células argirófilas del intestino delgado, produce contracción de la vesícula biliar ante la presencia de grasa en el intestino (De Groot, 1989). Sin embargo, no hemos observado reactividad cruzada para este péptido.

Los tumores productores de gastrina en el páncreas procederían de células de los islotes capaces de expresar el gen-gastrina (Bardram y cols. 1990), posiblemente por

mecanismos de represión enzimática; en este sentido, hay evidencias de que la somatostatina puede deprimir la expresión del gen (Karnik y cols. 1989, Varro y cols. 1990). En muy raras ocasiones, tumores secretores de gastrina se forman a partir de células APUD situadas fuera del tracto gastrointestinal (Smith, 1991).

En el hombre, sin embargo, las células D de los islotes pancreáticos del feto y neonato producen gastrina, pero están ausentes en poblaciones celulares maduras (Hawkins y cols. 1987). Sobre este punto existió controversia anteriormente (Stanley y cols. 1976). Larsson y cols. (1975) no encontraron células positivas a gastrina, por inmunofluorescencia, en los islotes pancreáticos del hombre adulto. Estas células aparecían en la mucosa antral del feto después de las 19 semanas de gestación y solo ocasionalmente. Sin embargo, la inmunoreactividad de la mucosa duodenal era más temprana (11 semanas). En estos hallazgos pueden influir las condiciones de fijación y/o el empleo de secciones en congelación.

La mucosa duodenal es también un importante lugar de producción en el hombre adulto (Larsson y cols. 1975; Kobe y cols. 1976; Morrison y cols. 1984; Bauer y cols. 1986). En determinadas condiciones patológicas pueden aparecer centros gástricos extragástricos por estimulación hipofisaria (Accary y Bonfils, 1973).

La polaridad de los gránulos de secreción, como han señalado algunos autores para las células endocrinas (Kaplan y cols. 1986, De Groot, 1989), solo queda patente, en cierto grado, en el estudio ultraestructural de la célula de gastrina, ya que mediante inmunocitoquímica óptica hemos observado tinción en todo el citoplasma celular por los dos métodos empleados. Estos resultados están de acuerdo con lo comunicado por otros investigadores en roedores (Kapur, 1982).

La mayor intensidad de tinción en la porción subnuclear de células de gastrina y enterocromafines, observada por algunos autores (Kapur, 1982) mediante técnica de inmunofluorescencia, puede deberse a la sección de corte, dado que la porción

supranuclear de estas células es angosta y bastante más estrecha que la porción basal.

El número de células de gastrina en la mucosa pilórica del perro, por campo de 400x, es similar al comunicado por Pawlikowski y cols. (1992) en la rata, y ligeramente superior a la frecuencia comunicada por Kitamura y cols. (1982) en el gato; sin embargo, en esta especie también existe inmunoreactividad a gastrina en tramos posteriores del duodeno. Según nuestra experiencia, el número de células de gastrina por sección glandular de mucosa de estómago canino está un punto por debajo de la obtenida en el hombre por Graham y cols.(1993). Así mismo, el número de células G por centímetro cuadrado de mucosa pilórica es sensiblemente menor que el comunicado por Fawcett (1989).

La frecuencia de células inmunoreactivas a gastrina, observada en nuestro estudio, es similar a la comunicada por Kitamura y cols. (1984) en la mucosa pilórica del caballo. En ambos trabajos se ha utilizado el mismo criterio de recuento.

5.2.2. INMUNOCITOQUÍMICA ELECTRÓNICA.

Las primeras inclusiones en Araldita dieron poca señal, posiblemente por exceso de bloqueo. La ultraestructura era sensiblemente inferior a la obtenida con Bioacryl. Posteriormente obtuvimos un fuerte marcaje con la primera resina.

La célula productora de gastrina en el perro presenta unas características ultraestructurales que no difieren en general de los otros tipos celulares del sistema endocrino difuso. No obstante, hemos observado determinadas peculiaridades que describimos a continuación.

Las largas prolongaciones citoplasmáticas que presentan estas células aumentan la superficie de contacto con las células mucosas, y endocrinas y pensamos que la hace más sensible a los estímulos mecánicos y nerviosos que influyen decisivamente en la secreción hormonal, facilitando además el intercambio celular (función paracrina).

En estudios previos se ha demostrado que las glándulas pilóricas de diferentes especies, incluido el hombre, presentan tres tipos celulares: mucosas, endocrinas y parietales (Tominaga, 1975; Krause y cols. 1977). En algunas otras especies, como el ratón, las glándulas pilóricas presentan además células de zimógeno (Helander, 1962; 1964). Nosotros no hemos observado células de zimógeno en las glándulas pilóricas del perro, como también ha sido comunicado previamente (Grossman y Marks, 1960).

Las células mucosa pilóricas del perro presentan grandes gránulos secretores limitados por membrana y de densidad electrónica bastante homogénea; sin embargo, en algunas células pueden observarse gránulos mucosos con un área electrodensa en situación excéntrica, más pequeños y menos frecuentes que los observados en el hombre (próxima a la membrana limitante y de tamaño muy variable) (Krause y cols. 1977). Las glándulas pilóricas del ratón y los elementos mucosos de las glándulas duodenales de mamíferos monotremas también presentan este tipo de gránulos (Kao y Lichtenberger, 1991).

No hemos observado células parietales, probablemente sea debido al área concreta estudiada en nuestro caso, ya que se ha comunicado que las células parietales de las glándulas pilóricas humanas son más abundantes en la zona más próxima a la unión con las glándulas fúndicas pero se vuelven muy escasas en la proximidad de la unión gastrointestinal (Grossman, 1960).

Los gránulos de secreción de gastrina más electrodensos presentaban un buen marcaje con partículas de oro de 15 nm. obteniéndose muy poco marcado de fondo. Muchos gránulos aparecían claros, depositándose las partículas en la periferia. En principio pensamos que esto pudiera deberse al metaperyodato sódico utilizado para eliminar el osmio; sin embargo, tras repetidas pruebas, creemos que este fenómeno está relacionado con el pH del fijador empleado y el correspondiente a los gránulos según el momento fisiológico del estómago y el estado de maduración en que se encuentran (Rahier y cols. 1987), lo cual reafirmaría los resultados obtenidos por Oomori y cols. (1993).

Estudios inmunocitoquímicos previos (Rahier y cols. 1987) han demostrado que los diferentes tipos de gránulos de las células G son inmunopositivos a gastrina, aunque los gránulos electrolúcidos son menos fuertemente positivos que los electrodensos, como también se observa en nuestros resultados.

Los gránulos electrodensos serían inmaduros y se situarían en posición subnuclear principalmente. A medida que maduran los gránulos se vuelven electrolúcidos apareciendo gastrina en la periferia de éstos y en el citoplasma celular. Esta es la imagen dominante que hemos obtenido con fijación a pH 7. Tras la fijación a pH 5 son más numerosos los gránulos electrodensos.

Se admite que la configuración molecular y solubilidad son dependientes del pH, siendo óptimas en condiciones alcalinas. La hormona es menos soluble, y por lo tanto osmóticamente inactiva, cuando está almacenada en gránulos secretorios con pH ácido (Dial y cols. 1991).

En algunos estudios sobre gránulos de gastrina aislados, aparece una relación entre la liberación de gastrina y el pH del gránulo y se ha demostrado que diferentes metabolitos, que estimulan a los gránulos de gastrina a liberar su contenido, tienden a alcalinizar su interior (Dial y cols. 1991).

Según lo señalado anteriormente, proponemos una hipótesis sobre el mecanismo de secreción de gastrina, en el sentido de que ésta no se efectúe por exocitosis tradicional con fusión total del gránulo, sino por difusión directa de las moléculas de gastrina a través de la membrana celular o por liberación parcial sin destrucción del gránulo mediante un poro transitorio, como ha sido propuesto recientemente para la liberación de aminas de las células cebadas o enterocromafines (Alvarez de Toledo y cols. 1993; Neher, 1993; Dunant, 1994).

Nosotros consideramos que el almacenamiento de gastrina en gránulos secretorios

específicos se requiere, no para la exocitosis con fusión total de membranas, sino para otras funciones como el procesamiento postranslacional de gastrina, como recientes estudios han sugerido (Dickinson y cols. 1993). El cambio de pH del gránulo de ácido a ligeramente superior a 7 puede activar la enzima requerida para la conversión de progastrina a gastrina biológicamente activa (peptidil-glicina-alfa-monooxigenasa), cuyo pH óptimo se encuentra entre 6.5 y 7, más alto que el del interior del gránulo (Conway y col. 1985; Eipper y cols. 1985; Dickinson y cols. 1986).

Anteriores estudios inmunocitoquímicos parecen confirmar esta hipótesis, ya que han encontrado progastrina intacta en los gránulos electrodensos inmaduros y muestras de inmunotinción de productos procesados de progastrina en los gránulos electrolúcidos e intermedios (Rahier y cols. 1987).

La fijación de las glándulas pilóricas con soluciones de diferentes pH, puede representar un modelo experimental del mecanismo real de liberación de gastrina; la hipótesis propuesta podría explicar el mecanismo de *feed-back* de inhibición de la liberación de gastrina por el ácido gástrico y los incrementos en la concentración de gastrina por la acción de drogas que inhiben la secreción de ácido.

No obstante, permanece sin aclarar cual es el transductor entre un cambio de pH en la mucosa antral y la señal que induce la liberación de gastrina. Se podría considerar que el transductor se localizaría sobre la membrana plasmática en una porción de la célula G en contacto con el lumen glandular.

5.2.3. RADIOINMUNOENSAYO.

Este estudio ha demostrado que el radioinmunoensayo con gastrina sintética humana (Gask-PR), que hemos utilizado, es un método suficientemente sensible para la medida de la concentración basal de gastrina sérica canina y de sus variaciones fisiológicas por estimulación del alimento.

Los datos aportados por la casa suministradora (Cis-BioInternacional) son que la especificidad del anticuerpo utilizado es del 100% para gastrina 17 humana y muy baja (1.9-3.1) para colecistoquinina-pancreozimina.

Los coeficientes de variación observados en nuestro método son inferiores -en el caso del coeficiente intra-ensayo- a los referidos por Gabbert y cols. (1984) sobre 8 determinaciones; siendo el coeficiente inter-ensayo muy similar al obtenido por estos autores.

La concentración media basal obtenida en este trabajo sobre 125 perros de diferente edad y sexo es de $46.7 \text{ pg/ml} \pm 22.9$, SEM 2.0 y valores extremos de 11 y 109 pg. Este resultado está por debajo del publicado por Happe y Gaag (1980) sobre 17 perros sanos (70.9 , SEM 5.1) y Fox y cols.(1990) en 10 perros con una media de edad de 10 años ($146.3 \pm 16.6 \text{ pg/ml.}$), que nos parecen muy elevadas.

Lewin y Wyllie (1977) señalaron problemas en la distinción de gastrina y productos de degradación por RIA.

Nuestros resultados son coincidentes con los de Catrambone y cols.(1980) que en 8 perros con edades entre 2 y 10 años, obtuvo valores extremos de 25 y 85 pg/ml. Y están por encima del obtenido por Straus y Johnson (1977): 40 pg/ml. SEM 5. Gabbert y cols. (1984) obtuvieron una media de gastrina basal en 12 perros de ambos sexos de $65 \text{ pg/ml} \pm 17$.

Dado el considerable número de animales empleados en nuestro estudio es de esperar un rango más amplio en los valores obtenidos por nosotros. En el hombre, los valores normales varían según los diferentes autores (McGuigan y Trudeau, 1973; Walsh, 1975) y con la edad de los individuos (Accary y Bonfils, 1973), siendo semejantes a los observados en el perro.

Para las determinaciones basales de gastrina consideramos suficiente un ayuno previo de 24 horas dado que los valores post-ingesta vuelven a la normalidad al cabo de unas 2 horas.

Valores tras la ingesta incluso superiores a 200 pg/ml, pueden ser considerados normales en el perro adulto. La concentración de gastrina aumenta progresivamente tras la ingestión de alimento, existiendo grandes variaciones individuales. Los picos máximos se alcanzan entre los 30 y 60 minutos post-ingesta. Los resultados de Gabbert y cols. (1984) en 12 curvas de gastrina los sitúa entre los 15 y 30 minutos; sin embargo, en algunos casos la respuesta máxima la hemos obtenido a los 15 minutos.

En nuestro estudio, la concentración media de gastrina a los 30 min. tras la ingesta determinada sobre 30 perros de diferente sexo ha sido de $121 \text{ pg/ml} \pm 50$. Gabbert y cols. (1984) obtuvieron sobre 12 perros una media de $118 \pm 37 \text{ pg/ml}$.

Existen diferencias significativas en la concentración media de gastrina en los grupos A, B y C ($p=0.05$). Según estos resultados, los niveles de gastrina sérica en el perro aumentan con la edad.

No se han encontrado diferencias significativas ($p=0.05$) entre las medias obtenidas para cada grupo (68.7 ± 20.3 en machos y 57.2 ± 22.8 en hembras).

Si reunimos ambos grupos, es decir, si comparamos machos y hembras con edades comprendidas entre 0 y 8 años (33 machos y 28 hembras) las diferencias tampoco son significativas.

El tipo de alimento suministrado influye de modo importante en la respuesta. En nuestro caso, el máximo alcanzado fue de 197 pg. a los 60 minutos con la dieta nº2. (ver tablas). Las proteínas son los principios inmediatos que provocan un mayor estímulo en la liberación de gastrina. Por el contrario, los hidratos de carbono inducen una respuesta de

mucha menor intensidad y mas tardía.

Valores basales en el perro por encima de 150 pg. son raros y suelen relacionarse con hiperplasia de células G (un caso pudimos comprobarlo en necropsia) y con insuficiencia renal principalmente.

En suma, creemos que el diagnóstico no invasivo del síndrome de Zollinger-Ellison y otros desórdenes que cursen con elevaciones de la gastrinemia en el perro, puede realizarse mediante un *kit* comercial de radioinmunoensayo para gastrina y esta especie animal -dada la similitud de valores basales y de respuesta- puede ser un modelo potencial de la enfermedad en el hombre.

Si las concentraciones de gastrina basal, tras 24 horas de ayuno, son superiores a 120 pg/ml, deberá determinarse el origen de la hipergastrinemia.

Con la utilización de un *kit* comercial para gastrina se incrementa la capacidad para el diagnóstico no invasivo del gastrinoma o síndrome de Zollinger-Ellison en el perro. La concentración de gastrina en sangre se incrementa en la hipercalcemia, hiperplasia de células G, tratamientos prolongados con cimetidina y omeprazol, gastritis atrófica y fallo renal.

6. CONCLUSIONES

1.- La localización de las células G inmunoreactivas en el perro es eminentemente pilórica. La porción de duodeno próxima al esfínter puede presentar algunas células positivas, sobre todo en las vellosidades. No existe actividad de gastrina en el páncreas del perro neonato y adulto, en condiciones normales, ni en otros tramos del aparato digestivo.

2.- Las células G se distribuyen principalmente en la profundidad de las criptas y en las glándulas pilóricas más superficiales, en número de 1 a 7 células por sección glandular. En el animal recién nacido que no ha ingerido alimento, el número y distribución de estas células es prácticamente igual que en el perro adulto, aunque la inmunoreactividad es menor.

3.- Los gránulos de secreción de las células G son de diferente electrodensidad, según el grado de maduración y el pH de fijación. La inmunocitoquímica electrónica marca la presencia de la hormona en toda la superficie de los gránulos electrodensos y solo en la periferia de los gránulos electrolúcidos.

4.- La membrana celular de la célula G presenta frecuentes desmosomas y largas prolongaciones que se entrelazan con las de las células circundantes, excepto en la porción basal. Esta disposición puede suponer una mayor sensibilidad de la célula a estímulos mecánicos y nerviosos.

5.- Los niveles de gastrina sérica basal en el perro presentan un amplio rango. La concentración basal media obtenida por nosotros sobre 125 determinaciones se sitúa en 46.7 ± 22.9 pg/ml.

6.- Se ha observado un aumento de los niveles de gastrina en el perro en relación directa con la edad. Respecto al sexo, hemos observado unas concentraciones de gastrina significativamente más altas en los machos que en las hembras, en animales entre 2 y 8 años de edad.

7.- Las concentraciones de gastrina aumentan significativa y progresivamente tras la ingestión de alimento. Este incremento también está relacionado con la edad. En general, los picos máximos se alcanzan entre los 30 y 60 minutos post-ingesta; posteriormente los niveles disminuyen hasta alcanzar los valores basales aproximadamente al cabo de dos horas.

8.- La respuesta depende de factores individuales y del tipo de alimento. El valor máximo obtenido ha sido de 197 pg/ml. a los 60 minutos de ingerir pienso seco muy rico en proteínas. Las dietas con alto contenido en hidratos de carbono inducen una respuesta mucho menor y mas tardía.

7. RESUMEN

En nuestro trabajo hemos estudiado, mediante dos técnicas inmunocitoquímicas de alta sensibilidad para microscopía óptica (estreptavidina-biotina-peroxidasa y oro coloidal-plata), la localización de las células G en el aparato digestivo del perro. Así mismo, mediante el empleo de partículas de oro coloidal de 15 nm conjugadas con inmunoglobulinas, hemos realizado una técnica de marcaje para microscopía electrónica con objeto de, una vez identificadas las células productoras de la hormona, estudiar sus características ultraestructurales diferenciándolas de otras células endocrinas que puedan hallarse en igual localización. En todas estas técnicas hemos utilizado un anticuerpo policlonal obtenido en conejo blanco de Nueva Zelanda frente a gastrina G-17 humana sintética.

El estudio se ha realizado en 17 perros de diferente edad, sexo y raza, que no presentaban patología gastrointestinal ni renal.

Nuestros resultados indican que las células G en el perro tienen una localización casi exclusivamente pilórica, existiendo algunas células positivas en el primer tramo de duodeno próximo al esfínter y situadas principalmente en las vellosidades. En el antro, estas células se encuentran en el tercio medio de la mucosa, en la profundidad de las criptas, entre los mucocitos de las glándulas pilóricas y algunas en las propias vellosidades.

La observación ultraestructural de la célula G revela que estas células endocrinas poseen un núcleo ovalado, amplio, rodeado de gránulos secretores citoplasmáticos medianamente electrodensos, limitados por membranas, de 160 a 375 nm de diámetro. También se observan abundantes ribosomas libres y mitocondrias. La membrana celular presenta frecuentes desmosomas y numerosas prolongaciones que se entrelazan con las de las células circundantes.

Para la técnica inmunocitoquímica electrónica con oro hemos empleado una nueva resina acrílica con buenos resultados de marcaje. Este procedimiento permite diferenciar

las células G de otras células endocrinas que se sitúan en la misma localización (enterocromafines y productoras de somatostatina). Estas últimas tienen gránulos basales muy electrodensos y heterogéneos, así como grandes vacuolas vacías y no presentan inmunoreactividad para gastrina.

Hemos observado que el pH de fijación influye en la densidad electrónica de los gránulos y en su marcaje. Este fenómeno también puede estar relacionado con diferencias en el grado de pérdida de contenido de los gránulos en el citoplasma y con la acidez de la sustancia intragranular durante la maduración. Se ha demostrado que después de la fijación a pH ácido muchos gránulos citoplasmáticos son electrodensos e inmunopositivos a gastrina, sin embargo, tras la fijación a pH neutro muchos aparecen desgranulados encontrándose reacción positiva en el citoplasma. Esto nos sugiere la hipótesis de que la gastrina no es secretada por exocitosis con fusión total sino que puede ser liberada mediante difusión directa o mediante la formación de un poro transitorio en la membrana citoplasmática.

Otro aspecto de nuestro trabajo ha sido la determinación de la concentración de gastrina sérica en el perro en condiciones fisiológicas. Para ello se ha determinado la gastrinemia en 125 perros en ayunas de ambos sexos, de diferente raza y edad, mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA). En este estudio solo se han incluido perros con función renal normal.

Para la técnica de RIA se utilizó un kit comercial para determinación de gastrina humana, no modificado, que emplea gastrina G17 marcada con I^{125} .

En relación con la edad y el sexo se han utilizado diferentes grupos de perros en los que se determinó los niveles basales de gastrina para relacionarlos estadísticamente con dichos parámetros. En un lote de 30 perros se estudió la respuesta de gastrina a la ingestión de diferentes alimentos, determinando la concentración basal de la hormona y a los 30 minutos de la ingesta.

Por último, se realizaron 15 curvas de gastrinemia en 8 perros a los que se les suministraron diferentes tipos de alimentos. Para ello se efectuaron extracciones seriadas de sangre cada 15 minutos, tras la ingesta, durante un periodo de dos horas.

Según nuestros resultados, la tasa media basal de gastrina sérica inmunoreactiva en el perro se sitúa en $46.74 \text{ pg/ml} \pm 22.9$, con un amplio rango de valores (11-109 pg). La concentración media a los 30 minutos de la ingestión de alimento, en animales con edades comprendidas entre 3 y 8 años, alcanza los $121 \text{ pg/ml} \pm 50.2$.

Respecto a la edad, hemos observado un incremento de la gastrina basal en el perro, existiendo una correlación lineal entre ambos parámetros. Respecto al sexo, a partir de los dos años, los machos presentan concentraciones de gastrina significativamente mayores que las hembras.

Finalmente, la respuesta a la ingestión de alimentos depende de factores individuales y de las propias características del alimento. El pico se alcanza entre los 15 y 60 minutos. En general, el aumento de la hormona en sangre es progresivo, pero en ocasiones aparece bruscamente. El valor máximo observado en este trabajo ha sido de 197 pg/ml a los 60 minutos de ingerir pienso seco muy rico en proteínas. Valores incluso superiores a 200 pg/ml. post-ingesta pueden considerarse normales en el perro adulto. Los menores incrementos se obtuvieron tras la administración de alimentos con alto contenido en hidratos de carbono, alcanzándose la concentración máxima con lentitud a los 75 minutos.

8. SUMMARY

In our work we have studied by two high sensibility immunocytochemical methods for light microscopy (streptavidin-biotin-peroxidase and immunogold-silver), the location of G cells on digestive system in the dog.

Using particles of 15 nm colloidal gold immunoglobulin conjugate, we have realized a technique marking for electron microscopy whereby once knowed cells which made, to study your ultrastructural characteristics to be different of other endocrine cells which can be found in same place.

In all these techniques we have utilized a polyclonal antibody attained in New Zeland white rabbit before human synthetic gastrin G-17.

It is accomplished 17 necropsy in dogs of diferent age, sex and breed, which did not showed gastrointestinal pathology. They were euthanased by a intravenous injection of 20% penthotal sodic.

Our results show that the gastric antrum is the main site for gastrin cells in the dog, some positive cells exist in the first section of duodenum near to the sphincter and situated on villi.

In the antrum, these cells are found in mild third of the mucosa, in the cripts, among mucocytes of piloryc glands and few on the same mucosal villi. Gastrin cells at pancreas of the neonatal and adult dog have not been made evidence, by any techniques used.

The ultrastructural observation of G cells shows that these endocrine cells have an oval, large nucleus around of mild electro-dense membrane-bound secretory cytoplasmatic granules of size 160 at 375 nm. It is too observed many free ribosomes and mitochondria.

The cellular membrane presents frequent desmosomes and numerous prolongations

which interlace with those surrounding cells.

For immunocytochemistry ultrastructural technique we used a new acrylic resin with can right on immunostained. This method differentiate gastrin cells from another endocrine cells which are situated in the same location (enterochromaffin or somatostatin cells). These last cells containing granules with an electro-dense core a thin halo and membrane as soon large empty vesicles.

We have marked that pH fixation affect on the electro-density granules and immunomarked, besides the primary antibody dilution and conjugated. This phenomenon may be also related with differences in the degree of the leakage of contents from granules into the cytoplasm during fixation or with acidity intra-granular substances during maduration.

It was demonstrated that after fixation at low pH (acid solutions) most of the granules are electron-dense and are immunopositive to gastrin, while fixation at neutral pH results in most of de gastrin granules with their content degranulated into the cytoplasm, and the immunopositive reaction found in the citoplasm. This immunoreactivity leads us to suggest the hypothesis that gastrin is not secreted by exocytosis with full fusion, otherwise this gastrin-release may be mediated either by its diffusion or by a plasmalemmal device (mediatophore).

The other sight of our work has been the quantitative measurement of gastrin in canine serum in fisiologicals condition. Wherefore has been determinated the gastrinemia in 125 fasting dogs both sex and different breed and age, for radioimmunoassay technique (RIA). Only dogs with normal renal function were included in the study.

For the radioimmunoassay probe we tried a commercial kit for measurement of human gastrin, without modification, containing synthetic gastrin I G-17 labelled iodine 125.

The response of gastrin to ingestion of food was determined on a group of 30 dogs, knowing the values hormone at 30 minutes after eating.

In relation with age and sex we are confronted diferents groups of dogs which the basal gastrin levels was determined to establish a stadistic relationship.

Lastly, 15 curves of gastrin response were drawn for 8 dogs, they received differents class of diet. Whereby so that were accomplished blood extractions serially every 15 minutes for two hours.

According to own results, averaged found by us of immunoreactive serum gastrin was $46.74 \text{ pg/ml} \pm 22.9$ with a wide range of 11 - 109 pg. Mean concentration at 30 minutes to eat in dogs with age between 3 and 9 years came up $121 \text{ pg/ml} \pm 50.2$.

With the age exist a tendency to increase of basal levels of gastrinemia in the dog, this fact is significative in males. Males have also a greater basal gastrin concentrations than females ($p < 0.05$). However, in the first year of life is not observed differences on both parameters.

At last, we saw that the response after eating rest individual factors and own characteristic of food. The top arrive between 15 and 60 minutes. Generally, the increment of the hormone in blood is progressive, but at times appears rudely.

The highest value observed in this work has been 197 pg/ml at 60 minutes after they were fed with dry fodder abounding in protein. Low increments were obtained after feeding with a elevated content in carbohydrates; the maximum gastrin response occurred slowly at 75 minutes.

If base-line gastrin concentrations (after 24-hours fast) are greater than 120 pg/ml, the source of the hypergastrinemia should be evaluated.

With the availability of a commercial gastrin radioimmunoassay kit the diagnostic capabilities for non invasive diagnosis of gastrinomas or Zollinger-Ellison syndrome should be enhanced.

9. BIBLIOGRAFIA

ACCARY, J.P. et BONFILS, S. (1973). Apport du dosage radio-immunologique de la gastrine en pathologie digestive. La Nouv. Presse Méd., 6 Janvier, 2, n°1; 41-43.

ALISON, B.C. (1989). The distribution and ontogeny of gastrin/CCK-somatostatin- and neurotensin-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the chicken. *Histol Histopath.* 4; 55-62.

ALVAREZ de TOLEDO, G., FERNANDEZ-CHACON, R., FERNANDEZ J.M. (1993). Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature* 363; 554-558.

ARNAL, C., GALLEGOS, M., BADIOLA, J.J., BASCUAS, J. A. (1986). Identificación inmunocitoquímica y ultraestructural de las células productoras de secretina y de gastrina en el yeyuno e íleon de la oveja. *Acta Microscópica.* Vol.9, n°3; 337-344

BANKS, W.J. (1993). *Applied Veterinary Histology.* 3ª ed. Mosby Year Book; 339, 425-426.

BARDAM, L., HILSTED, L., REHFELD, J.F. (1990). Progastrin expression in mammalian pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA;* Jan; 87(1); 298-302.

BAUER, J.D. (1986). *Análisis Clínicos. Métodos e interpretación.* Ed. Reverté; 864-865.

BECTON DICKINSON and Co. (1991). Gastrin (¹²⁵I) Radioimmunoassay Kit. 13 Mountain View Avenue. Orangeburg, New York 10962-1294; 1-12.

BESLEY, J.E. (1989). *Colloidal Gold: A new perspective for cytochemical marking.* Royal Microscopical Society. Oxford Science Publications; 7-47.

BELL, F.R. (1978). The relevance of the new knowledge of gastrointestinal hormones to veterinary science. *Veterinary Science Communications.* 71,(2), 305-314. En: BRUGERE,

H. (1983). L'intestin: données morphologiques et corrélations fonctionnelles. Recl Méd. Vét.numéro spécial. Mars; 135-140.

BENDAYAN, M., NANCI, A. and KAN, F.W.K. (1987). Effect of tissue processing on colloidal gold cytochemistry. *J.Histochem.Cytochem.* 35; 983-996.

BERNER, A. and NESLAND, J.M. (1991). Endocrine profile in gastric carcinomas. An immunohistochemical study. *Histol Histopath.* 6; 317-323.

BRENT, D.J.(1986). Canine and Feline Gastroenterology. . W.B. Saunders Co; 105-108.

BRUCE SAVAGE. (1986). The Biotin-Streptavidin amplification system. *International Clinical Product Review.* May-June; 23-25.

BUCHAN, M.J. POLAK, J.M. (1979). Localisation of intestinal gastrin in a distinct endocrine cell type. *Nature* Vol.277 11 January; 138-140.

BULLOCK, G and PETRUSZ, P. (1989). Techniques in Immunocytochemistry. Vol.4. Academic Press; 89-104.

BUMA, P., ROUBOS, E.W., BUIJS, R.M. (1984). Ultrastructural demonstration of exocytosis of neural, neuroendocrinal, and endocrinal secretions with an in vitro tannic acid (tari) method. *Histochem.*, 80; 247-256.

BURCK, H-CH. (1969). Técnica histológica. Editorial Paz Montalvo (edición española). Madrid. 61-67.

BURRELL, M.A., VILLARO, A.C., SESMA, P. (1992). Evidence for the colocalization of gastrin/CCK and PYY/PP immunoreactive substances in the lizard *Podarcis hispanica*: immunocytochemical and ultrastructural study. *Gen.Comp.Endocrinol.* Oct. 88(1); 40-49.

CANBERK, Y. (1992). Ultrastructural observations on the gastrin (G) and enterochromaffin (EC) cells of the gastric mucosa. Electron Microscopy. Volume 3. EUREM 92, Granada, Spain.

CARLEI, F., BARSOTTI, P., CRESCENZI, A., BOLOGNA, M., MUZI, P., SCHIETROMA, M., LOMANTO, D., LeZOCHE, E., SIMI, M., SPERANZA, M.S. (1993). Neuroendocrine epithelial cells of the main pancreatic ducts and ampulla. Ital. J. Gastroenterol. May. 25(4); 171-173.

CARRASCAL, E., MARTIN, J.M., MERCHAN, J. (1980). Estudio con ácido tánico del sarcolema de fibras musculares cardiacas. Morf. Norm. Patol., 4; 205-212.

CARRASCO, J.L. (1986). El Método Estadístico en la Investigación Médica. Editorial Ciencia 3 S.A; 165-166, 530.

CATRAMBONE, G., GHEZZI, R., FERRIGNO, S., PASSALACQUA, C. (1980). Dosaggio radioimmunologico della gastrina dopo resezione dell'intestino tenue. Minerva Chirurgica. Vol.35.N 18; Settembre; 1367-1370.

CIS BIO INTERNATIONAL. (1990). Dosage radioimmunologique de la gastrine. Réf.: Gask-PR. F91192 Gif-Sur-Yvette Cedex. France; 3-11.

CONWAY, R.G., TSAI, B.S., BUTCHKO, G.M., BAUER, R.F., RADZIALOWSKI, F.M. (1985). Peptidyl-glycine alpha amidation monooxygenases: comparison of stomach and pituitary enzymes. Federation Proc; 44; 1217.

CHAIET, L. and WOLF, F.J. (1964). The Properties of Streptavidin, a Biotin-Binding protein produced by *Streptomyces*. Archives of Biochemistry and Biophysics 106; 1-5.

DAHME, E., WEISS, E. (1989). Anatomía Patológica Especial Veterinaria. Ed. Acribia; 149.

DANSCHER, G., NÖRGAARD, J.R. (1983). Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. Vol.31, N°12; 1394-1398.

DEBAS, H.T., WALSH, J.H., GROSSMAN, M.I. (1975). Evidence for oxynto-pyloric reflex for release of antral gastrin. *Gastroenterology* 68; 687.

DeGROOT, L.J. (1989). *Endocrinology*. 2ª ed. Vol.3. W.B. Saunders Company; 2741-2761.

DeLELLIS, R.A. (1981). Basic techniques of immunohistochemistry. *Diagnostic Immunohistochemistry*, ed. Masson Publishing USA, Inc., New York; 7-16.

DELLMANN, H.D. (1971). *Veterinary Histology*. Lea and Febiger. Philadelphia; 155-169.

DELLMANN, H.D., BROWN, E.M. (1980). *Histología Veterinaria*. Ed. Acribia. Zaragoza; 246-253.

DELLMANN, H.D. (1993). *Textbook of Veterinary Histology*. 4ª ed. Lea and Febiger. Philadelphia; 170-172.

De ROBERTIS, E., NOWINSKI, W., SAEZ, F. (1968). *Biología Celular*. 7ª ed. Editorial "El Ateneo". Buenos Aires; 203-210.

DIAL, E.J., COOPER, L.C., LICHTENBERGER, L.M. (1991). Amino acid-and amine-induced gastrin release from isolated rat endocrine granules. *The American Physiological*

Society. G175-G181.

DICKINSON, C.J., TAKEUCHI, T., GUO Y-J., STADLER, B.T., YAMADA, T. (1986). Expression and processing of prohormones in nonendocrine cells. *Am.J.Physiol*; 264; 553-560.

Di FIORE, M.S. (1986). Diagnóstico Histológico. Vol.I, 9ª ed. Editorial "El Ateneo". Buenos Aires; 104-111.

DOBBINS, W., AUSTIN, L. (1991). Electron microscopic definition of intestinal endocrine cells: immunogold localization and review. *Ultrastruct. Pathol.* Jan-Feb. 15(1). 15-39.

DOUGLAS, A.J., WALKER, B., JOHNSTON, C.F., MURPHY, R.F. (1990). *Int.J.Pept.Protein.Res*; Apr; 35(4); 306-309.

DRAZNER, F.H. (1981). Canine Gastrinoma: A condition analogous to the Zollinger-Ellison Syndrome in man. *California Veterinarian* 11; 6-11.

DUNANT, Y.(1994)Hormones and neurotransmitters release: four mechanisms of secretion. *Cell Biology International*, Vol.18, N°5; 327-336.

EIPPER, B.A., MYERS, A.C., MAINS, R.E. (1985). Peptidyl-glycine alpha-amidation activity in tissues and serum of the adult rat. *Endocrinology*, 116; 2497-2504.

ETTINGER, S.J. (1989). Textbook of Veterinary Internal Medicine.3ª ed.Vol.1. W.B. Saunders Company; 1240-1242.

FACER, P., BISHOP, A.E., COLE, G.A., AITCHISON, M., KENDALL, C.H., van ASWEGEN, G., PENKETH, R.J., RODEK, C.H., McKEEVER, P., POLAK, J.M.

(1989). Developmental profile of chromogranin, hormonal peptides, and 5-hydroxytryptamine in gastrointestinal endocrine cells. *Gastroenterology*. Jul. 97(1); 48-57.

FAULK, W., TAYLOR, G. (1971). An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* 8; 1081-1083.

FAWCETT, D.W. (1989). *Tratado de Histología*. Bloom-Fawcett. 11ª ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill; 636-638, 654.

FERNANDEZ-TRESGUERRES, J.A. (1989). *Fisiología endocrina*. Editorial Eudema S.A; 533-535, 566.

FOX, L.E., ROSENTHAL, R.C., TWEDT, D.C., DUBIELZIG, R.R., MacEWEN, E.G., GRAUER, G.F. (1990). Plasma histamine and gastrin concentrations in 17 dogs with mast cell tumors. *J-Vet-Intern-Med*; Sep-Oct; 242-246.

FRANCO, A., REGODON, S., GAZQUEZ, A., MASOT, A.J., REDONDO, E. (1993). Ontogeny and distribution of gastrin cells in the gastrointestinal tract of the sheep. *Eur. J. Histochem.* 37(1); 83-90.

FUNATA, N., FUKAYAMA, M., SUGANO, K., KOITE, M. (1989). Intracellular topography of glycine-extended pro-gastrin-processing intermediates in human antral mucosa: a electron-microscopic immunocytochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* Mar. 37(3); 287-292.

GABBERT, N.H., NACHREINER, R.H., HOLMES-WOOD, P., KIVELA, J.H. (1984). Serum immunoreactive gastrin concentrations in the dog: Basal and postprandial values measured by radioimmunoassay. *Am.J. Vet.Res.* 45; 2351-2353.

GALAN, J.A., GONZALEZ, J.L., MORATINOS, P., GUTIERREZ, C. GOMEZ, J.L.,

SERRANO, A. (1993). Ubicación de las células G productoras de gastrina inmunoreactiva en el perro. V Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria. UAB Barcelona 2,3 y 4 de junio.

GALAN, J.A., LLORCA, A., GONZALEZ, R., TOLEDO, M.V., MARTINEZ, F.J., MARTINEZ, G. (1995). Ph dependent gastrin secretion mechanism. An immunocytochemical study. Aceptado en: Microscopy and Microanalysis '95. The Microscopy Society of America and The Histochemical Society. August 13-17, 1995. 361. Kansas City. Missouri.

GANTZ, L., TAKEUCHI, T., YAMADA, T. (1990). Cloning of canine gastrin cDNA's encoding variant amino acid sequences. Digestion; 46 Suppl 2; 99-104.

GAZQUEZ, A. (1989). La necropsia en los mamíferos domésticos. Interamericana. McGraw. Hill; 10-34.

GONZALEZ, R., TOLEDO, M.V., MARTINEZ, F.J. MARTINEZ, G. (1994). Results about the use of Unicryl for the embedding of embryos, light and electron microscopy studies. In Electron Microscopy 1994. Proceeding of the 13th International Congress on Electron Microscopy. Paris. Vol 3B; 951-952.

GRAHAM, D. Y., LEW, G.M., LECHAGO., J. (1993). Antral G-cell and D-cell numbers in *Helicobacter pylori* infection: effect of *H. pylori* eradication. Gastroenterology. Jun; 104(6): 1655-1660.

GRAU, H., WALTER, P. (1975). Histología y anatomía microscópica comparada de los mamíferos domésticos. Ed. Labor; 99-111.

GREIDER, M.H., STEINBERG, V., McGUIGAN, J.E. (1972). Electron microscopic identification of the gastrin cells of the human antral mucosa by means of

immunocytochemistry. *Gastroenterology*; 34; 1159-1162.

GROSS, T.L., O'BRIEN, T.D., DAVIES, A. P., LONG, R.E. (1990). Glugagon-producing pancreatic endocrine tumors in two dogs with superficial necrolytic dermatitis. *JAVMA*, Vol.197, N° 12, December 15; 1619-1622.

GROSSMAN, M.I. (1960). The pyloric gland area of the stomach: a brief summary. *Gastroenterology*; 38; 1-6.

GROSSMAN, M.I., MARKS, LN. (1960). Secretion of pepsinogen by the pyloric glands of the dog, with some observations on the histology of the gastric mucosa. *Gastroenterology*; 38; 343-352.

HACKER, G.W., BERNATZKY, G., GRAF, A.H., HOLBLING, N., STILIANU, L., PAYREDER, M.H., MILLER, K., THURNER, J., ADAM, H. (1990). Gastrin -and somatostatin-immunoreactive cells of the antral mucosa in patients with duodenal or gastric ulcers. An immunocytochemical study. *Pathol Res Pract*. Dec. 186(6); 723-731.

HANSKY, J., STERN, A.I., KORMAN, M.G. (1979). Serum gastrin after 12 months continuous cimetidine therapy for duodenal ulcer. *Aust. NZ J. Med*. 9; 637-639.

HAPPE, R.P., van der GAAG, I. (1980). Zollinger-Ellison Syndrome in three dogs. *Vet. Pathol*. 17; 177-186.

HARRISON. (1991). *Principios de Medicina Interna*. 12ª ed. Interamericana-McGraw Hill; 1422-1429.

HASHIMOTO, T., LLUIS, F., GOMEZ, G., HILL, F.L., GREELEY, G.H., THOMPSON, J.C. (1991). Intracolonic fat inhibits gastric acid secretion independent of gastrin release in the dog. *Dig Dis Sci*; Jul; 36(7); 888-892.

HAWKINS, K.L., SUMMERS, B.A., KUHAJDA, F.P., SMITH, C.A. (1987). Immunocytochemistry of normal pancreatic islets and spontaneous islet cell tumors in dogs. *Vet. Pathol.* 24; 170-179.

HAYAT, M. (1989). Colloidal Gold Principles, Methods and Applications. Vol.1 y 2. Academic Press. 42-66.

HELANDER, H.F. (1962). Ultrastructure of the fundus glands of the mouse gastric mucosa. *J.Ultrastruct.Res;* 4 suppl: 7-123.

HELANDER H.F. (1964). Ultrastructure of secretory cells in the pyloric gland area of the mouse gastric mucosa. *J.Ultrastruct.Res.* 10; 154-159.

HIRAI, M. (1993). Gastrinoma hepático. *Cancer* 72/5; Aichi Prefectural Owari Hospital. Yamato-cho. Japón; 1547-1550.

HSU, S-M., RAINE, L. (1984). The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in diagnostic and research pathology. *advances in Immunochemistry*, R.A. DeLellis, ed., Mason Publishing USA, Inc.,New York; 31-42.

ITO, H., YAMADA, J., YAMASHITA, T., HASHIMOTO, Y., KUDO, N. (1987). An immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the pig. *Jpn.J.Vet.Sci.* 49; 105-114.

JAMIESON, J.D. and PALADE, G.E. (1967). Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. I. Role of the peripheral elements of the Golgi complex. *J.Cell Biol.* 34; 577.

JUBB, K.V., KENNEDY, P.C., PALMER, N. (1993). Pathology of Domestic Animals.

Vol.2. 4^a ed. Academic Press, Inc; 52-53.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. (1987). Histología Básica. 3^a ed. Salvat Editores S.A; 266-276.

KAO, Y-C. J., LICHTENBERGER, L.M. (1991). Phospholipid- and neutral lipid - containing organelles of rat gastroduodenal mucous cells. Gastroenterology; Vol. 101, N°1; 7-21.

KAPLAN, L.A., PESCE, A.J. (1986). Química Clínica. Ed. médica Panamericana; 920-923.

KAPUR, S.P. (1982)a. A study of two enteroendocrine cells in the duodenum of the Gerbil-*Meriones unguiculatus*. Acta Anat. 112; 97-104.

KAPUR, S.P. (1982)b. An ultrastructural and cytochemical study of enteroendocrine cells of the pyloric antrum in the Gerbil, *Meriones unguiculatus*. Acta Anat. 112; 220-232.

KARNIK, P.S., MONAHAN, S.J., WOFFE, M.M. (1989). Inhibition of gastrin gene expression by somatostatin. J.Clin.Invest. 83; 367-372.

KITAMURA, N., YAMADA, J., YAMASHITA, T., YANAIHARA, N. (1982). Endocrine cells in the gastrointestinal tract of the cat. Biomed. Res. 3; 612-622.

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

KITAMURA, N., YAMADA, J., WATANABE, T., YAMASHITA, T. (1990). An immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal

tract of the musk shrew, *Suncus murinus*. *Histol Histopath.* 5; 83-88.

KRAUSE, W.J., IVEY, K.J., BASKIN, W.N., MacKERCHER. (1977). Ultrastructure of the human pyloric glands with emphasis on the mucous cell component. Part.I. *Acta Anat.* 99; 1-10.

LAMERS, C.B. (1992). Gastric secretory abnormalities in duodenal ulcer: primary or secondary to *Helicobacter pylori* infection?. *Scand.J.Gastroenterol.Suppl.* 194; 99-103.

LARSSON, L.I., HÄKANSON, R., SJÖBERG, N.O., SUNDLER, F. (1975). Fluorescence histochemistry of the gastrin cell in fetal and adult man. *Gastroenterology*, 68; 1152-1159.

LARSSON, L.I., HOUGGAARD, D.M. (1994). Evidence for paracrine somatostatinergic regulation of gastrin gene expression by double-staining cytochemistry and quantitation. *J.Histochem.Cytochem. Jan.* 42(1); 37-40.

LAU, J.L., RICHTER, H.M., FOWLER, J.E., BHATTI, R., RAY, V. (1990). Suppression of canine antral gastrin secretion by urine. *J-Urol; Feb;* 143(2); 402-406.

LEHNINGER, A.L. (1980). *Bioquímica.* 2ª ed. Ediciones Omega; 76-123.

LEWIN, M.R., WYLLIE, J.H. (1977). Bioassay and radioimmunoassay of gastrin and significance of gastrin degradation products. *Eur. surg. Res.* 9; 166-172.

MANARA, G.C. PREDA, P., PASQUINELLI, G., FERRARI, C., DE PANFILIS, G., SCALA, C. (1993). The use of new hydrophilic resin Bioacryl in dermatological investigations. *Eur. J. Dermatol.*,3; 235-238.

MARTINEZ de la COLINA, E., MEDIN, J., CARRILLO, S. (1993). Adenoma de hipófisis. Tratamiento médico y discordancia radiológica perimétrica. *Medicina Militar*. Vol.49; N°3; 297-301.

McGUIGAN, J.E., TRUDEAU, W.L. (1973). Serum and tissue gastrin concentrations in patients with carcinoma of the stomach. *Gastroenterology*. Vol.64. N°1; 22-25

MILLER'S. EVANS, H.E., CHRISTENSEN, G.C. (1979). *Anatomy of the dog*. 2ª Ed. W.B. Saunders Company.

MILLER, A.S., FURNESS, J.B., COSTA, M. (1989). The relationship between gastrin cells and bombesin-like immunoreactive nerve fibres in the gastric antral mucosa of guinea-pig, rat, dog and man. *Cell.Tissue.Res*; 257(1); 171-8.

MIZUHIRA, V., FUTAESAKU, Y. (1972). New fixation for biological membranes using tannic acid. *Acta Histochem. Cytochem.* 5; 233-235.

MORIARTY, G.G., MORIARTY, C.M., STERNBERGER, L.A. (1973). Ultrastructural immunocytochemistry by unlabeled antibodies and the peroxidase complex (PAP). A technique more sensitive than radioimmunoassay. *J.Histochem.Cytochem.* 21; 825-833.

MORRISON, W.B. (1984). The clinical relevance of APUD cells. *Comp. Cont. Ed.*6; 884-890.

MORTENSEN, N.J., MORRIS, J.F. (1977). The effect of fixation conditions on the ultrastructural appearance of gastrin cell granules in the rat gastric pyloric antrum. *Cell Tissue Res.* 176; 251-263.

MOSSI, S., MEYER-Wyss, B.,RENNER, E.L. (1993). Influence of *Helicobacter pylori*,

sex, and age on serum gastrin and pepsinogen concentrations in subjects without symptoms and patients with duodenal ulcers. *Gut*. Jun; 34(6); 752-756.

MULHOLLAND, G., ARDILL, J.E., FILLMORE, D., CHITTAJALLU, R.S., FULLARTON, G.M., McCOLL, K.E. (1993). *Helicobacter pylori* related hypergastrinaemia is the result of a selective increase in gastrin 17. *Gut*. Jun; 34(6); 757-761.

NEHER, E. (1993). Secretion without full fusion. *Nature* 363; 497-498.

NEWMAN, T.M., SEVERS, N.J., SKEPPER, J.N. (1991). The Pathway of atrial natriuretic peptide release from cell to plasma. *Cardioscience* Vol. 2, N° 4, December; 263-72.

NIETO, J.M. (1987). Estudio inmunohistoquímico y ultraestructural de las células C de los équidos. *Med. Vet.* 9; 421-425.

NILSSON, G., YALOW, R.S., BERSON, S.A. (1973). Distribution of gastrin in the gastrointestinal tract of human, dog, cat and hog. In *Proceedings of Nobel Symposium XVI*, S. Anderson Ed. Stockholm, Almquist and Wiksel; 95-101.

NILSSON, G., BRODIN, K. (1977). Increase in gastrin concentration in the duodenal mucosa of dogs following resection of the gastric antrum. *Acta Physiol.Scand.*,99; 510.

OOMORI, Y., TANAKA, H., IUCHI, H., ISHIKAWA, K., SATOH, Y., ONO,K. (1993). Effect of fixation conditions on the granule morphology of rat antral gastrin cells: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Acta Histochem.* Feb, 94(1); 25-31.

PAREKH, D., LAWSON, H.H., van der WALT, L.A. (1988). The effect of chronic acidification of the canine duodenum on gastrin release from the antrum transplanted into

the colon. *Surgery*, May; 103(5); 597-602.

PAWLIKOWSKI, M., KARBOWNIK, M., LEWINSKI, A., PISAREK, H., WAJS, E., SZKUDLINSKI, M. (1992). Effects of omeprazole on the number of immunoreactive gastrin- and somatostatin -cells in the rat gastric mucosa. *Histol Histopath.* 7; 153-156.

PIROIRD, R., LOMBARD, M. (1980). Les méthodes immuno-enzymatiques et leurs applications sérologiques. *Revue Méd. vét.*, 131, 1;25-42.

POLAK, J.M. (1987). *Immunohistology*. Vol.3; 129-134.

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

PONTER, A., DUVAUX-PONTER, Ch. (1993). Contrôle hormonal de la fonction digestive. *Recl.Méd.Vét.* 169 (11/12); 871-884.

RAHIER, J., PAUWELS, S., DOCKRAY, G.J. (1987). Biosynthesis of gastrin: localization of the precursor and peptide products using electron microscopic-immunogold methods. *Gastroenterology*, 92; 1146-1152.

REYNOLDS, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17; 208-212.

ROLLAN, E. (1994). Estudio anatomopatológico del páncreas en la leishmaniosis natural y experimental canina. Tesis doctoral. Dpto. Patología Animal II. Fac. de Vet. de Madrid; 92

RYBERG, B., MATTSON, H., CARLSSON, E. (1988). Effects of omeprazole and ranitidine on gastric acid secretion, blood gastrin levels and [^3H]-Thymidine incorporation

in the oxyntic mucosa from dogs and rats. *Digestion*; 39(2); 91-99.

SANCHEZ, A., FERNANDEZ SURRIBAS, J., von LAWZEWITSCH, I. (1985). Lecciones de Histología Veterinaria. Vol. 9. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires; 53-56.

SANCHEZ, J., BERNABE, A., NAVARRO, J.A., GOMEZ, M.A., GOMEZ, J. (1992). Immunogold identification of prolactin cells of goats in anoestrus, pregnancy and milk production: Ultrastructural variations. *Acta Anat.* 143; 118-126.

SANDRITTER, W., THOMAS, C. (1979). *Histopatología*. 3ª ed. esp. Ed. Científico-médica; 209.

SCÀLA, C., CENACCHI, G., FERRARI, C., PASQUINELLI, G., PREDÀ, P., MANARA, G.C. (1992). A new acrylic resin formulation: A useful tool for histological, ultrastructural, and immunocytochemical investigations. *J.Histochem.Cytochem.* Vol.40, N°11; 1799-1804.

SCHALLING, M., PERSSON, H., PELTO-HUIKKO, M., ÖDUM, L., EKMAN, P., GOTTLIEB, CH., HÖKFELT, T., REHFEJD, J.F. (1990). Expression and localization of gastrin messenger RNA and peptide in spermatogenic cells. *J.Clin.Invest.* Vol.86, August; 660-669.

SCHEPP, W., CHAN, C. B. (1994). Effects of prostaglandins on gastrin release from canine antral mucosal cells in primary culture. *Am.Physiol.Society.* G-194.

SHAW, D.H. (1988). Gastrinoma (Zollinger-Ellison Syndrome) in the dog and cat. *Can Vet J* Vol.29, May; 448-452.

SISSON, S., GROSSMAN, J.D. (1973). *Anatomía de los Animales Domésticos*. 4ª ed. rev. Salvat Editores S.A; 485-496.

SKARDA, J., HONICK, A., GIBBINS, C., JOSSELSO, A., RISHI, M. (1994). Papillary-cistic tumor of the pancreas in a young woman: fine-needle aspiration cytology, ultrastructure and DNA analysis. *Diagnostic Cytopathology*. Vol.10, N°1; 20-24.

SMITH, A.C., PRICE, A.B. (1991). Diccionario Ilustrado de Gastroenterologia. HTF; 146-147.

SOBHANI, I., ELOUAER-BLANC, L., LEHY, T., RAHIER, J., PAUWELS, S., MIGNON, M., BONFILS, S., LEWIN, J.M. (1989). Immunohistochemical characterization of gastrinomas with antibodies specific to different fragments of progastrin. *Gastroenterol.Clin.Biol.*, 13; 865-72.

SPRINGALL, D.R., HACKER, G.W., GRIMELIUS, L., POLAK, J.M. (1984). The potential of the immunogold-silver staining method for paraffin sections. *Histochemistry* 81; 603-608.

STANLEY, L.E., ORION, D.H., PARSONS, J.A., McEVOY, R.C., ELDE, R.P. (1976). Pancreatic islet cell hormones distribution of cell types in the islet and evidence for the presence of somatostatin and gastrin within the D cell. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. Vol.24. N°7; 883-897.

STRAUS, E., JOHNSON, G.F., YALOW, R.S. (1977). Canine Zollinger-Ellison syndrome. *Gastroenterology* 72; 380-381.

STROMBECK, D.R., GUILFORD, W.G. (1991). *Small Animal Gastroenterology*. 2ª ed. Wolfe Publishing Limited; 91-92, 178-181

STRUNZ, U.T., WALSH, I.H., GROSSMAN, M.I. (1978). Removal of gastrin by various organs in dogs. *Gastroenterology*; 74; 32-33.

- THRUSFIELD, M. (1986).** Veterinary epidemiology. Butterworth and Co. Ltd; 235-237.
- TIELEMANS, Y., HAKANSON, R., SUNDLER, F., WILLEMS, G. (1989).** Proliferation of enterochromaffinlike cells in omeprazole-treated hypergastrinemic rats. *Gastroenterology* 96; 723-729.
- TOBE, T., CHEN, S-T., HENMI, K., FUKUCHI, K. (1976).** Distribution of gastrin in canine, cat, and human digestive organs. *Am.J.Surg.* 132; 581-582.
- TODD-SANFORD-DAVIDSOHN. (1984).** Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 7ª ed. Tomo 1. Salvat Editores; 762-763.
- TODOROVIC, V., KOKO, V., VARAGIC, V., LACKOVIC, V., VUZEVSKI and MILIN, J. (1993).** Effects of chronic ethanol administration on the serotonin-producing cells in rat gastric antral and duodenal mucosa. *Histol Histopath* 8; 285-296.
- TOMINAGA, K. (1975).** Distribution of parietal cells in the antral mucosa of human stomachs. *Gastroenterology.* 69; 1201-1207.
- TSANADIS, G., KOTOULAS, O., LOLLIS, D. (1995).** Hepatocyte-like cells in the pancreatic islets: study of the human foetal pancreas and experimental models. *Histol Histopathol.* 10; 1-10.
- VARNDELL, I.M., HARRIS, A., TAPIA, F.J. (1983).** Intracellular topography of immunoreactive gastrin demonstrated using electron immunocytochemistry. *Experientia.* 39; 713-717.
- VARRO, A., NEMETH, J., JACQUI BRIDSON, J., LONOVICS, J., DOCKRAY. (1990).** Modulation of posttranslational processing of gastrin precursor in dogs. *Am.Physiol.Society;* 904-909.

WALSH, J.H. (1975). Clinical significance of gastrin radioimmunoassay. *Seminars in Nuclear Medicine*. Vol.5. N°3. Jul. Grune and Stratton, Inc; 247-254.

WALSH, J.H. (1988). Peptides as regulators of gastric acid secretion. *Ann.Rev.Physiol.* 50; 41-63.

WALSH, J.H. (1993). Gastrointestinal hormones: past, present, and future. *Gastroenterology*; 104; 653-657.

WILLARD, M.D., TUEDTEN, H., TURNWALD, G.H. (1993). Diagnóstico Clinicopatológico práctico en los animales pequeños. Ed. Inter-médica. 222-223.

YALOW, R.S., BERSON, S.A. (1972). And now, "Big-big" gastrin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol.48. N°2. Academic Press, Inc; 391-395.

YU, J.H., XIN, Y., ENG, J., YALOW, R.S. (1991). Rhesus monkey gastroenteropancreatic hormones: relationship to human sequences. *Regul-Pept*; Jan 1; 32(1); 39-45.

ZHANG, Z.B., ZHANG, X.Y., CHEN, X.T., DENG, J.L., MOU, Z.X., HU, J.L. (1990). Studies on gastrin in duodenal ulcer. *Chin.Med.J. (Engl)*. Jan. 103(1); 45-49.