



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGÍA

ESTUDIO ONTOGÉNICO DEL PÁNCREAS ENDOCRINO DE DORADA
(*Sparus aurata* L.)

MARÍA HERMINIA NAVARRO ANDREU

2012

A mis padres

A mis alumnos

Agradecimientos:

Quiero expresar mi mayor gratitud y admiración a mis dos Directoras de Tesis, Dra Blanca Agulleiro Díaz y Dra Teresa Lozano Parejo, por todo su esfuerzo, dedicación, atención y paciencia.

Al Centro Oceanográfico de Murcia (IEO), por proporcionar los ejemplares utilizados en este estudio.

Al Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Murcia, por su profesionalidad y excelente trabajo.

A todos los miembros del Departamento de Biología Celular por compartir su experiencia, su colaboración, sus palabras de ánimo y su amistad.

A toda la comunidad educativa del I.E.S. San Isidoro de Cartagena, en especial a su equipo directivo, por su comprensión, ayuda y cooperación.

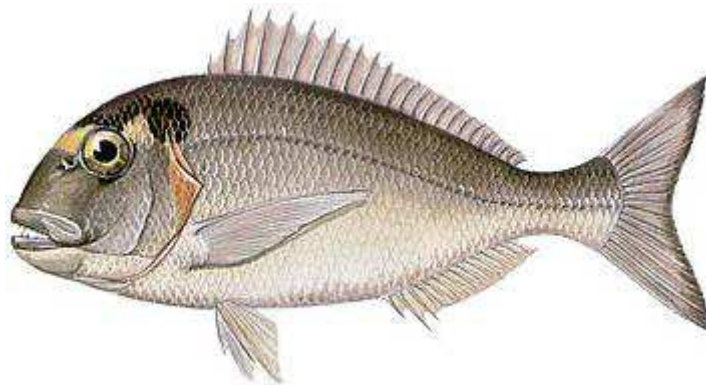
A mi familia y amigos por su cariño, apoyo e ilusión.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Revisión bibliográfica	
2.1 Histología del páncreas endocrino de teleósteos.....	5
2.2 Hormonas pancreáticas.....	7
2.3 Organización de las células endocrinas pancreáticas.....	26
2.4 Ontogenia del páncreas endocrino.....	29
2.5 Ultraestructura de las células endocrinas.....	33
3. Materiales y métodos	
3.1 Obtención de muestras.....	35
3.2 Procesado de muestras para microscopía óptica.....	35
Inmunocitoquímica peroxidasa- antiperoxidasa (PAP)	
Doble inmunofluorescencia	
Especificidad de las inmunorreacciones	
3.3 Procesado de muestras para microscopía electrónica.....	38
Microscopía electrónica convencional	
Inmunoglobulina-oro (IgG-oro)	
3.4 Digitalización de imágenes.....	39
4. Resultados	
4.1 Estudio microscópico óptico.....	40
4.2 Estudio microscópico electrónico.....	54
5. Discusión.....	115
6. Conclusiones.....	131
7. Bibliografía.....	133

1. INTRODUCCIÓN

La dorada, *Sparus aurata*, es un pez actinoptergio perciforme de la familia Sparidae cuyo cuerpo es ovoide y está comprimido lateralmente, con el dorso arqueado, su longitud puede llegar a tener 70 cm., peso de hasta 17 Kg. y edad que puede llegar a 11 años. El rostro y la frente son convexos y sin escamas. La mandíbula superior es ligeramente más larga que la inferior, con dientes puntiagudos, presenta 4 ó 6 colmillos en la parte anterior de cada mandíbula, dientes traseros más aplanados y molariformes que se disponen en 4 ó 5 filas en la mandíbula superior y 3 ó 4 en la inferior. Los labios son carnosos y gruesos. El opérculo y el preopérculo son lisos. Tiene una única aleta dorsal formada por 11 radios espinosos y 13-14 blandos; las aletas pectorales tienen 1 radio espinoso y 5 blandos, estando la aleta caudal fuertemente ahorquillada. Su coloración es azulada con brillo metálico, flancos plateados y el vientre es blanco o blanquecino, presenta una franja dorada muy patente que une ambos ojos por la frente y otras más difusas que recorren la parte superior del ojo hasta el preopérculo y desde el origen de la línea lateral a lo alto de la nuca, caracterizándose por una marca oscura al inicio de la línea lateral y otra de color negro bordeada de rojo en la parte alta del opérculo. La aleta caudal presenta un reborde negro (Lozano y Rey, 1952).



Los jóvenes frecuentan zonas litorales y lagunas costeras mientras que los adultos prefieren aguas más profundas, normalmente de 30 m de profundidad, aunque pueden llegar hasta los 150 m en época de reproducción. Se mueven entre las algas de zonas rocosas o superficies arenosas de los bajos fondos e incluso estuarios. Su alimentación es preferentemente carnívora; sobre todo moluscos, crustáceos y peces, aunque en ocasiones también come algas y plantas verdes marinas (Carbajo Vasco, 2005). Se encuentra ampliamente distribuida entre los paralelos 57° N y 43° S desde las Islas Británicas a Cabo Verde, incluyendo el Mar Mediterráneo, Mar Negro y Mar Menor.

Es una especie hermafrodita que presenta inversión sexual protándrica; comportándose como machos hasta, aproximadamente, los tres años, edad a la cual la mayoría se convierten en hembras, aunque aparte de la edad influye el tamaño. Los machos no invertidos pueden hacerlo más adelante o bien continuar como machos todo su ciclo vital. Presentan fertilización externa sin protección de las puestas que se realizan de octubre a diciembre en las zonas cálidas (Carbajo Vasco, 2005).

Los adultos acostumbran a vivir en pequeños grupos en zonas profundas. Llegada la época de reproducción (entre otoño e invierno) abandonan al resto del banco. Las mayores capturas en redes se vienen produciendo en el último trimestre del año, coincidiendo con la última fase de la puesta. En cada puesta se generan alrededor de un millón de huevos. En los criaderos industriales se han llegado a producir puestas durante todo el año, alterando el fotoperiodo y la temperatura (Carbajo Vasco, 2005).

Aunque hoy en día sigue llegando a los puertos pesqueros españoles una cierta cantidad de dorada silvestre capturada por los barcos de pesca extractiva, su volumen permanece relativamente constante, mientras que la dorada de crianza supone ya más del 95% del total. En el año 2008 la Comunidad Valenciana ha encabezado, con el 40% del total, la producción de dorada de acuicultura en España, seguida por Murcia (23%), Canarias (20%), Andalucía (10%) y Cataluña (7%). Destaca especialmente el incremento de la producción en un 84% en la Región de Murcia, única Comunidad donde puede mantener su producción en 2010, ya que para el resto de comunidades se prevé un descenso en un 1,5%.

No solo se comercializan doradas adultas, también la producción de alevines de esta especie, aunque su producción sufrió una reducción del 29,8% en 2008 respecto de 2007 (Informe de APROMAR, 2009).

Dada la importancia económica de esta especie tanto en nuestra Comunidad Autónoma como en el mundo es conveniente un estudio fisiológico, endocrino y ontogénico pormenorizado. El estudio del desarrollo del páncreas endocrino en *S. aurata* es importante ya que las hormonas pancreáticas están relacionadas con la alimentación y con el desarrollo del aparato digestivo. También tienen influencia en hormonas segregadas por otros órganos.

El páncreas endocrino en teleósteos está compuesto generalmente por uno o unos pocos islotes grandes llamados islotes principales o cuerpos de Brockmann, acompañados por islotes más pequeños y aislados o células agrupadas.

En adultos de *S. aurata*, el páncreas endocrino consiste en uno o dos islotes ovales principales de desigual tamaño que varían entre 2 y 3 mm de diámetro y que se localizan sobre la parte superior de la vejiga natatoria y alrededor del ciego pilórico. También existen numerosos islotes accesorios más pequeños embebidos en el tejido exocrino. El islote principal está envuelto por una fina cápsula conectiva y rodeado por una delgada capa de tejido exocrino, en estos islotes penetran septos de tejido conectivo que contienen células acinares (Abad et al., 1986, 1987).

Se han localizado con técnicas inmunocitoquímicas cuatro tipos celulares utilizando sueros contra insulina (INS) de mamífero, glucagón (GLU) porcino, somatostatina (SS) y polipéptido pancreático (PP), las células descritas contienen INS, SS-14, SS-25, GLU y PP. Las células con GLU también reaccionan con suero anti-péptido inhibidor gástrico (GIP). Cuando los sueros anti-GIP y anti-GLU fueron saturados con GLU, no se observó inmunotinción, (Abad et al., 1986, 1988, 1990, 1992). Cada tipo de célula endocrina se encuentra distribuida en una zona específica del islote. Las células con GLU se encuentran en la periferia del islote, donde también se encuentran células con SS, describiéndose varios tipos morfológicos (Abad et al., 1990, 1992). Las células con PP se encuentran en el islote principal agrupadas en un área limitada y poco profunda. En los islotes más pequeños y en los islotes accesorios las células PP son más numerosas, estando localizadas por todo el área externa (Abad et al., 1986, 1988).

En los islotes pequeños, se ha encontrado una coexistencia completa entre células con PP y células con GLU. En los islotes intermedios, el número de células endocrinas que muestra esta coexistencia es variable de islote a islote, encontrándose islotes con completa a casi ninguna coexistencia, en este último caso, se ha observado más células con GLU que células con PP. En el islote principal, al contrario de los islotes pequeños y medianos, no se ha encontrado coexistencia entre células con GLU y células PP, siendo más numerosas las células con GLU (Abad et al., 1988).

Son escasos los estudios que se han realizado sobre la ontogénesis del páncreas endocrino en teleósteos, centrándose sobre todo en la aplicación de técnicas histológicas convencionales y técnicas histoquímicas (Belsare, 1974; Rombout et al., 1979), técnicas inmunocitoquímicas (Beccaria et al., 1990; Berwert et al., 1995; García Hernández y Agulleiro, 1992; Guyot et al., 1998; Kurokawa et al., 2000; Morrison et al., 2001, 2004; Pack et al., 1996; Rombout y Taverne-Thiele, 1982), hibridación *in situ* para detectar algunas hormonas pancreáticas (Devos et al., 2002; Kurokawa y Suzuki, 2002;

Milewsky et al., 1998), e inmunocitoquímica e hibridación *in situ* para estudiar la expresión de las hormonas pancreáticas y factores de la transcripción involucrados en el desarrollo del páncreas (Argenton et al., 1999; Assouline et al., 2002; Biemar et al., 2001). También se han llevado a cabo algunos estudios a nivel microscópico electrónico (Agulleiro et al., 1994; Beccaria et al., 1990; García Hernández et al., 1994; Guyot et al., 1998).

Anteriores a este trabajo, sólo se han realizado dos estudios parciales en relación con las células endocrinas pancreáticas de dorada *S. aurata*, uno sobre células con INS, SS, y GLU desde la eclosión hasta los 30 días (Sarasquete et al., 1993) y el otro en células con INS desde eclosión hasta 24 días (Guyot et al., 1998). Estos trabajos se han realizado en algunas etapas puntuales y con algunas hormonas, pero nunca durante todo el desarrollo, por lo que no existe un estudio ontogénico completo.

El objetivo de este trabajo es estudiar el desarrollo del páncreas endocrino de esta especie de pez desde la eclosión a las fases juveniles, usando técnicas inmunocitoquímicas de microscopía óptica y electrónica, prestando especial atención a la disposición de los distintos tipos de células endocrinas diferentes y su secuencia de aparición, también a la posible coexistencia de distintas hormonas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTOLOGÍA DEL PÁNCREAS ENDOCRINO DE TELEÓSTEOS

Se han manejado diferentes términos para referirse al páncreas endocrino de peces, como tejido del islote, órgano del islote, islotes de Langerhans, cuerpos de Brockmann e islote principal (Youson y Al-Mahrouki, 1999; Youson et al., 2006). “Órgano del islote” se utiliza como el homólogo endocrino pancreático de una especie de pez, independientemente de la distribución o de la forma. “Islote principal” es una gran acumulación de tejido endocrino rodeado por una delgada capa de tejido exocrino. “Cuerpo de Brockmann” es una mayor concentración de islotes pancreáticos, algunos de los cuales pueden ser islotes principales que se encuentran entre las vísceras del pez. Si un cuerpo de Brockmann contiene un único islote principal, entonces los términos se pueden utilizar como sinónimos (Youson y Al-Mahrouki, 1999).

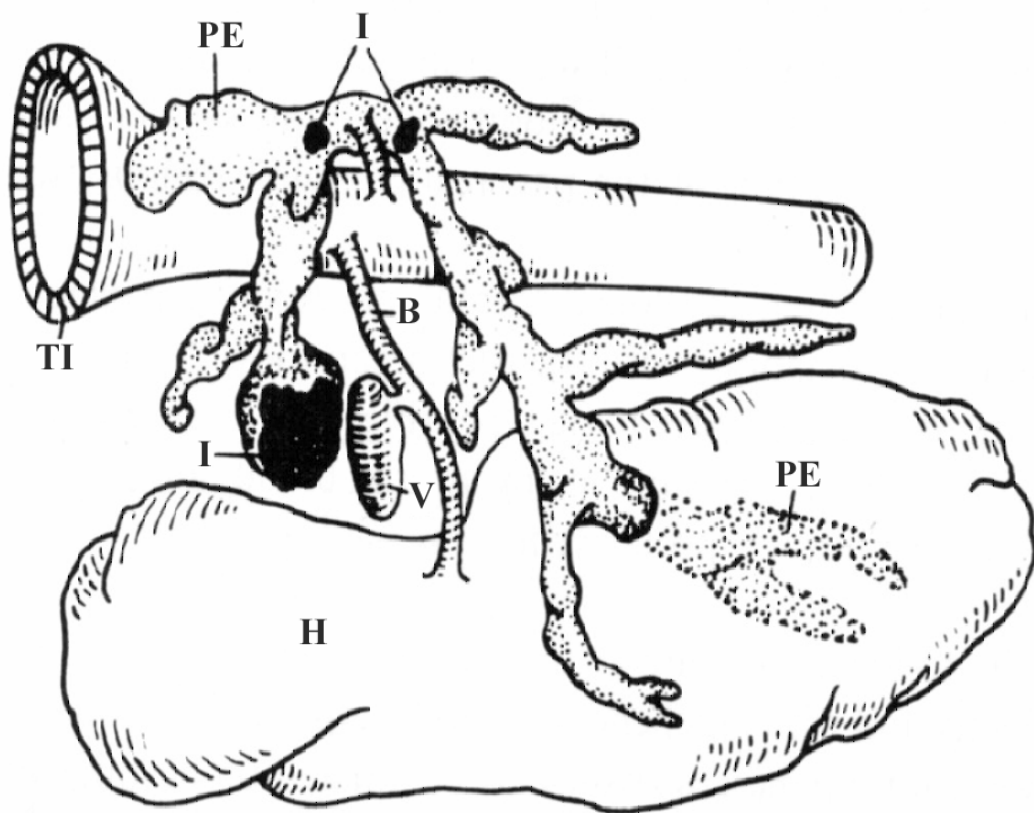
Los peces óseos presentan un páncreas exocrino difuso de acinos serosos que se extiende entre los conductos biliares, vasos sanguíneos abdominales, tracto gastrointestinal, vejiga natatoria e hígado. Concentraciones intrahepáticas de tejido exocrino son comunes entre los teleósteos (Epple y Brinn, 1987). El tejido del islote se puede encontrar en cualquier lugar dentro de estas áreas, excepto en lugares intrahepáticos, pero se encuentra comúnmente concentrado próximo a la zona donde los conductos biliares extrahepáticos penetran en el intestino, en la unión del estómago, intestino y ciego intestinal (Epple y Brinn, 1987; Youson y Al-Mahrouki, 1999) (Esquema 1).

El tejido endocrino del islote, muy vascularizado, está formado por agrupaciones de células glandulares endocrinas, que se encuentran separadas del acino exocrino por pequeñas cantidades de tejido conectivo, aunque generalmente no están confinadas en una cápsula verdadera. Los agregados endocrinos se tiñen ligeramente con hematoxilina y eosina, comparados con las células acinares, las cuales tienen grandes gránulos acidófilos. Los islotes son de tamaño variable y las células se agrupan formando cordones o lóbulos.

En adultos de *S. aurata*, el páncreas endocrino consiste en uno o dos islotes ovales principales de desigual tamaño que varían entre 2 y 3 mm de diámetro y que se localizan sobre la parte superior de la vejiga natatoria y alrededor del ciego pilórico (Abad et al., 1986, 1987). También existen numerosos islotes accesorios más pequeños embebidos en el tejido exocrino. El islote principal está envuelto por una fina cápsula

conectiva y rodeado por una delgada capa de tejido exocrino, en estos islotes penetran septos de tejido conectivo acompañados de células acinares (Abad et al., 1986, 1987).

Esquema 1. Páncreas de actinopterio, en la mayor parte de los grupos, el páncreas es bastante difuso y a menudo se mezcla con tejido del hígado. En la mayoría de los taxones, el tejido del islote aparece como una ó dos acumulaciones más grandes llamadas islotes principales, además de numerosos islotes “accesorios” más pequeños. **H**, hígado; **PE**, páncreas exocrino; **I**, tejido del islote; **V**, vesícula biliar; **B**, conducto biliar; **TI**, tracto intestinal (Epple y Brinn, 1987).



2.2 HORMONAS PANCREÁTICAS

INSULINA

La insulina (INS) se sintetiza en las células β de los islotes pancreáticos como un precursor, la preproinsulina, que tras dos divisiones proteolíticas, terminarán formando un péptido de INS funcional, contenido en gránulos de secreción que son liberados al flujo sanguíneo por exocitosis de los mismos (Chan y Steiner, 2000; Nelson y Sheridan, 2006).

Las células con INS son las más numerosas que se encuentran en los islotes pancreáticos de peces y principalmente se ubican en las regiones centrales (Youson et al., 2006). También se puede encontrar INS en el cerebro de salmónidos, aunque se cree que esta INS debe ser producida en el islote y luego transportada al cerebro vía flujo de sangre o el fluido cerebroespinal (Plisetskaya y Duguay, 1993).

La molécula de INS está formada por dos cadenas peptídicas (A y B) que presentan puentes disulfuro intercatenarios, la cadena A consta aproximadamente de 21 aminoácidos y la cadena B de 30 (Duguay y Mommsen, 1994) (Tablas 1a, b). Mediante análisis de rayos X se sabe que la estructura cristalina de la cadena A presenta dos segmentos en α -hélice y la cadena B puede adoptar dos conformaciones distintas, el estado T y el estado R, en ambos estados, esta cadena B muestra una conformación β extendida. Se han observado variaciones en las longitudes de las cadenas A y B (Conlon, 2001).

Además de las cisteínas que son invariantes, sólo 10 aminoácidos (GlyA1, IleA2, ValA3, TyrA19, LeuB6, GlyB8, LeuB11, ValB12, GlyB23 y PheB24) se conservan durante toda la evolución de los vertebrados, cinco de ellos se piensa que interactúan directamente con el receptor y los otros cinco son importantes para mantener la conformación de la unión con el receptor (Conlon, 2001). Se han descrito múltiples formas moleculares de INS en especies de mamíferos, anfibios y peces teleósteos. Para explicar tal heterogeneidad estructural se han propuesto dos procesos diferentes, polimorfismo de un único gen de INS como ocurre en el pez *Verasper moseri*, o bien por dos genes separados no alélicos como ocurre con *Ictalurus punctata*, *Oncorhynchus keta*, *Danio rerio* o *Oncorhynchus mykiss* (Caruso et al., 2008).

En peces, al igual que en otros vertebrados, la acción principal de la INS es promover un cambio metabólico desde procesos catabólicos a anabólicos. En general, el tratamiento con INS estimula la síntesis glucogénica, activa la lipogénesis, incrementa

la síntesis de proteína por los músculos y puede estimular o impedir la gluconeogénesis, dependiendo de la situación (Nelson y Sheridan, 2006; Planas et al., 2000; Plisetskaya y Duguay, 1993). En consecuencia, las inyecciones de anti-INS de salmón reducen los niveles de INS del plasma, cambiando apropiadamente los procesos metabólicos para incrementar la glucosa del plasma y reducir el contenido de glucógeno de hígado (Plisetskaya et al., 1988).

La INS es uno de los reguladores endocrinos más importantes del metabolismo de lípidos en peces ya que reduce los niveles de ácidos grasos de plasma y aumenta los lípidos almacenados tanto en hígado como en tejido adiposo (Nelson y Sheridan, 2006). La INS en hígado actuaría sobre la enzima que moviliza lípidos, la triacilglicerol lipasa (TG), regulando estados de fosforilación, y por lo tanto estados catalíticos de la lipasa TG hepática (Harmon et al., 1993; Harmon y Sheridan, 1992). Curiosamente, la INS no afecta a la lipólisis en los adipocitos de *S. aurata* excepto en peces alimentados con una dieta de proteínas de plantas (Albalat et al., 2005). La diferencia en la respuesta a la INS podría resultar de diferencias específicas en los niveles de dosis/receptor de hormona, historia nutricional, y/o patrones del ciclo vital (Nelson y Sheridan, 2006).

La secreción de INS tanto en peces como en otros animales está estimulada por nutrientes y regulada por hormonas y neurotransmisores, pero para la mayoría de peces, los aminoácidos son más efectivos como secretagogos que los carbohidratos (Duguay y Mommsen, 1994). Se ha comprobado que incrementos de glucosa y arginina administradas simultáneamente producen incrementos dependientes de secreción de INS y son más efectivas como activadoras de la secreción de INS que su administración de forma independiente (Hrytsenko et al., 2008).

Además, la INS ha demostrado ser un poderoso agente promotor del crecimiento en peces, algo menos efectivo que las acciones de aumento de crecimiento del factor de crecimiento semejante a insulina-I (IGF-I) (Planas et al., 2000).

Tabla 1a. Cadena A de INS de distintos vertebrados. Comparación con la INS humana de las estructuras primarias de las INS de especies de actinopterigios, condrictios y agnatos (Conlon, 2001).

	<u>A-Chain</u>				
	GIVEQ	CCTSI	CSLYQ	LENYC	N
Human					
Carp	-----	--HKP	--IFE	-Q---	-
Pacu	-----	--HKP	--IFD	-Q---	-
Flounder	-----	--HKP	-NIFD	-Q---	-
Tilapia	-----E	--HKP	-TIFD	-Q---	-
Anglerfish	-----	--HRP	-NIFD	-Q---	-
Cod	---D-	--HRP	-DIFD	-Q---	-
Toadfish I	-----	--HRP	-DIFD	-QS--	-
Toadfish II	-----	--HRP	-DKFD	-QS--	-
Sculpin	-----	--HRP	-NIRV	-----	-
Salmon	-----	--HKP	-NIFD	-Q---	-
Elephantnose	-----	--HHP	-NIFD	-NQ--	-
Eel	-----	--HKP	--IFD	-Q---	-
Bowfin	-----	--LKP	-TI-E	M-K--	-
Gar	-----	--HKP	-TI-E	-----	-
Paddlefish I	-----	--H-P	-----H	-----	-
Paddlefish II	-----	--H-P	-----D	-----	-
Sturgeon	-----	--H-P	-----D	-----	-
Bichir	-----	--DTP	-----D	-----	-
Ratfish	-----	--HNT	---AN	--G--	-
Rabbitfish	-----	--HNT	---AN	--G--	-
Elephantfish	-----	--HNT	---VN	--G--	-
Electric ray	----H	--HNT	---FD	--G--	-Q
Spiny dogfish	----H	--HNT	----D	--G--	-Q
Spotted dogfish	---DH	--RNT	----D	--G--	-Q
Hammerhead shark	---DH	--RNT	----D	--G--	-Q
Sea lamprey	-----	--HRK	--I-D	M----	-
River lamprey	-----	--HRK	--I-D	M----	-
<i>Geotria australis</i>	----K	--HNR	--I--	M-S--	-
<i>Mordacia mordax</i>	-----	--HRK	--I-D	M----	-
Atlantic hagfish	-----	--HKR	----D	-----	-

Tabla 1b. Cadena B de INS de distintos vertebrados. Comparación con la INS humana de las estructuras primarias de las INS de especies de actinopterigios, condrictios y agnatos (Conlon, 2001).

	<u>B-Chain</u>						
Human.	FVNQH	LCGSH	LVEAL	YLVCG	ERGFF	YTPKT	
Carp	NA GAP--	-----	-D--	-----	PT---	-N--	
Pacu	NA GAP--	-----	-D--	-----	PS---	-N--	
Flounder	V VPP--	---A-	-D--	-----	-----	-NT-	
Tilapia	V GGP--	-----	-D--	-----	D----	-N-R	
Anglerfish	V APA--	-----	-D--	-----	D----	-N--	
Cod	M APP--	-----	-D--	-----	D----	-N--	
Toadfish I	M APP--	-----	-D--	-----	D----	-N--	
Toadfish II	M APP--	-----	-D--	-----	D----	-NS-	
Sculpin	ADP--	-----	-D--	-----	D----	-N--	
Coho salmon	AAA--	-----	-D--	-----	-K----	-N--	
Elephantnose	APA--	-----	-----	F----	-----	FN-DT	
Eel	AST--	-----	-----	-----	SN---	FN--D	
Gar	AA--	-----	-----	-----	-K----	-N-NK	V
Bowfin	AAS--	-----	-----	F----	-S----	-N-NK	S
Paddlefish I	AA--	-----	-----	-----	-----	---NK	V
Paddlefish II	AA--	-----	-----	-----	-----	---NK	V
Sturgeon	AA--	-----	-----	-----	-----	---NK	V
Bichir	AA-R-	-----	-----	-----	N----	-I-SK	M
Ratfish	VPT-R	-----	-D--	-F----	-----	-S--P	IRELEPLL
Rabbitfish	VPT-R	-----	-D--	-F----	-----	-S--P	IRELEPLL
Elephantfish	VPT-R	-----	-D--	-F----	-----	-S--Q	I
Electric ray	LPS--	-----	-----	-F----	PK--Y	-L--A	
Spiny dogfish	LPS--	-----	-----	-F----	PK--Y	-L--X	XV
Spotted dogfish	LPS--	-----	---T-	-F----	QK--Y	-V--V	
Hammerhead shark	LPS--	-----	---T-	-F----	QK--Y	-V--I	
Sea lamprey	SALTG AGGT-	-----	-----	-V----	D----	---SK	T
River lamprey	SALTG AGGT-	-----	-----	-V----	D----	---SK	T
<i>G. australis</i>	SALTG SGGNY	----Y	--D--	--A--	P----	--STP	V
<i>M. mordax</i>	SALMG TGGT-	-----	-----	-V----	Q----	---SK	G
Atlantic hagfish	RTTG-	---KD	--N--	-IA--	V----	-D-TK	M

FAMILIA DEL GLUCAGÓN (GLUCAGÓN, GLP-1 Y GLP-2)

El glucagón (GLU) es un péptido que tiene generalmente 29 aminoácidos y que es producido principalmente en las células A de los islotes pancreáticos y en las células L del intestino de peces y en neuronas del cerebro de mamíferos (Duguay y Mommsen, 1994; Keiffer y Habener, 1999; Plisetskaya y Mommsen, 1996).

El GLU se sintetiza a partir de una gran molécula precursora, el preproglucagón, codificada por un único gen que origina múltiples péptidos, estos se expresan en diferentes tejidos a medida que las condiciones metabólicas varían (Plisetskaya y Mommsen, 1996) (Esquema 2). En peces, el procesamiento del preproglucagón en los islotes pancreáticos da lugar a GLU y GLP-1, mientras que en el intestino forma GLP-1 y GLP-2 además de oxintomodulina (Irwin y Wong, 2005; Plisetskaya y Mommsen, 1996; Zhou e Irwin, 2004) (Tabla 2).

En animales homeotermos, el GLU es esencial para el mantenimiento de la homeostasis del azúcar en sangre, función que realiza en estrecha cooperación, a modo de antagonista, con la INS (Hazelwood, 1984; Unger y Orci, 1981a y b; Unger, 1983). Los efectos metabólicos del GLU en peces también son antagonistas a los de la INS ya que el GLU promueve la producción de glucosa celular y eleva la glucosa plasmática (Albalat et al., 2005; Jiang y Zhang, 2003; Plisetskaya y Mommsen, 1996). Estas acciones parecen el resultado de la activación de enzimas específicos que involucran a la glucogenolisis, glucolisis y gluconeogénesis tanto en hígado como en cerebro (Magnoni et al., 2001; Moon, 2004). El uso de anticuerpos antiglucagón para reducir los niveles de GLU circulante provocan niveles elevados de glucógeno en hígado y también provocan hipoglucemia en salmón (Plisetskaya et al., 1989). Efectos similares a los descritos se producen en mamíferos (Tan et al., 1985). La cantidad de GLU circulante parece ser dependiente de la dieta del pez, ya que elevados niveles de glucosa impiden la secreción de GLU (Novoa et al., 2004). El efecto hiperglucémico del GLU, sin embargo, no es uniforme ya que la glucosa plasmática no es afectada por la concentración de GLU en anguilas (Ince y Thorpe, 1977).

El GLU generalmente moviliza los lípidos almacenados y eleva los niveles de ácido graso en plasma (Sheridan, 1994). Harmon y Sheridan (1992) demostraron que la incubación con GLU estimulaba directamente la movilización de lípidos hepáticos en trucha arco iris por estimulación de la actividad TG lipasa. Tales acciones del GLU sobre la movilización de lípidos, incluyen la secreción de ácidos grasos y glicerina, proporcionando los esqueletos carbonados que se necesitan para la gluconeogénesis,

que también es promovida por el GLU. La lipasa hepática TG estimulada por el GLU procede de la fosforilación del enzima (Harmon et al., 1993). Curiosamente, ayuno y niveles de glucosa elevados estimulan la movilización de lípidos hepáticos (Harmon y Sheridan, 1992). GLU también estimula lipólisis en adipocitos de trucha arcoiris *O. mykiss* y *S. aurata* (Albalat et al., 2005a y b); sin embargo, GLU no parece afectar a la lipólisis en tejido adiposo de *Hoplias malabaricus* (Migliorini et al., 1992).

El GLU interactúa con numerosos factores gasteroenteropancreáticos (GEP), aunque no parece tener un efecto directo sobre la secreción de INS ya que elevados niveles de GLU han sido observados con niveles muy bajos de INS (Harmon et al., 1993; Novoa et al., 2004; Plisetskaya y Mommsen, 1996). El GLU estimula la secreción de somatostatina (SS) y este efecto depende de la concentración de glucosa (Eilertson et al., 1995). Además, el GLU estimula la síntesis y expresión del factor de crecimiento relacionado con la INS-I (IGF-I) y a las proteínas de unión a IGF (IGFBPs) (Kachra et al., 1991).

En mamíferos, GLP-1 es una hormona estimulante que actúa potenciando la secreción de INS de las células B pancreáticas (Drucker, 2001, 2002) de forma que la INS actuaría bajando los niveles de glucosa sanguínea. Sin embargo, en peces, la actividad del GLP-1 es opuesta a la de mamíferos actuando de forma muy similar a como el GLU lo hace sobre el hígado, incrementando los niveles de glucosa en sangre (Duguay y Mommsen, 1994; Plisetskaya y Mommsen, 1996). Recientes análisis del genoma del pez globo *Takifugu rubripes* y de *D. rerio* han demostrado que, aunque los receptores para el GLU y para GLP-1 y GLP-2 se originaron antes de la divergencia entre peces y mamíferos, los peces han perdido la clase GLP-1 de receptores (Irwin y Wong, 2005). Esta característica, y una duplicación del gen del receptor del proglucagón de peces, justifican a estos autores una explicación de la acción común de GLP-1 y glucagones en peces, opuesta a sus funciones diferentes en mamíferos. (Irwin y Wong, 2005; Zhou e Irwin, 2004).

Tanto el GLU como el GLP-1 reducen el apetito cuando se administran exógenamente a ratas y seres humanos (Woods et al, 2006). En peces gato, GLP-1 tiene un efecto inhibitor sobre el consumo de comida después de inyecciones intracerebroventriculares e inyecciones con concentraciones altas de GLP-1 incrementan la movilidad gastrointestinal y reducen la ingesta de comida haciendo que el animal enferme (Silverstein et al., 2001). Efectos paralelos también se observaron en mamíferos (Nelson y Sheridan, 2006).

Esquema 2. Comparación entre preproglucagón de mamíferos y de teleósteos (Plisetskaya, 1990c).

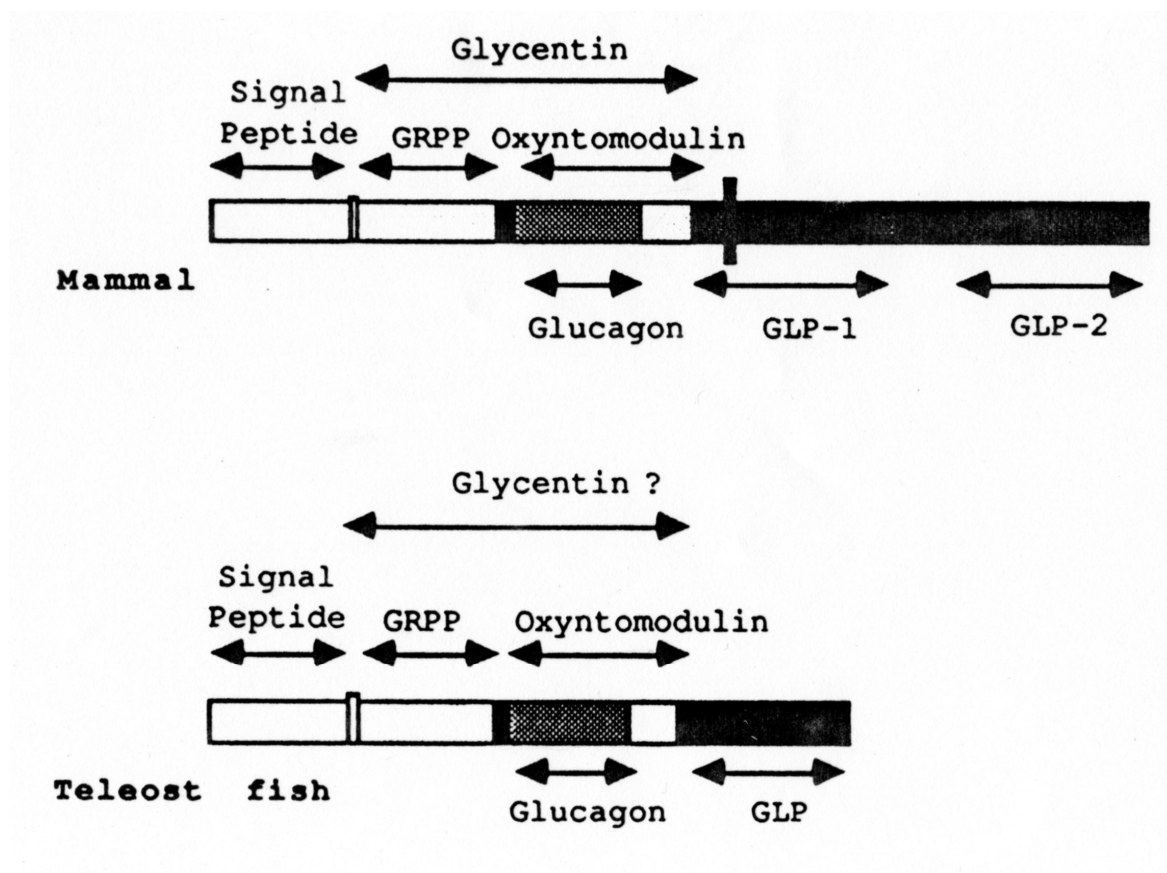


Tabla 2. Secuencias de proglucagón en peces. Los guiones representan espacios que se han insertado para mejorar el alineamiento. Los puntos indican espacios N ó C-terminal en la secuencia. **IP1** e **IP2** indican péptidos intermedios. Los lugares que potencialmente indican procesos proteolíticos se muestran en negrita (Zhou e Irwin, 2004).

	Signal Peptide	GRPP
Pufferfish 1	..MRSSLAGILLLLGFIONSWQ	VPLLETGDSSSSLAADDTLQDDSRSLNSM
Zebrafish 1	MKGAQYLAS-LLLLLFVHKCIC	VPLQG--DSTSTETADSFLARAPGLTMM
Zebrafish 2	MVRIYAFI-GLLLLLILIQSSLQ	IPLQDTEENGSLMSEDLVFNDPREVNMT
Pufferfish 2	MNSAYSLAG-LLLFITIQSSWQ	FPEQ--DRNSMLLNENSVLTEPSELNSM
Anglerfish 1	MKRIHSLAGILLVLGLIQSSCR	VLMQEADPSSSLEADSTLKDPEPRELSNM
Anglerfish 2	MTSLHSLAG-LLLLMLIQSSWQ	MPDQDPRNSMLLNENSMLTEPIEPLNM
Trout 1	MFGIHSLAG-VLLLVIVQRQLA	SPLQEAEDNSSLETTDPLLEDLMGVSNV
Trout 2	MFGIHSLAG-VLLLVIVQSQLA	SPLQEAEDNSSLETADSLLEDLRGVPNM
Goldfish	MKGAQYLAG-LLLLLVQNSIC	VPLQ--DYHTSTETVEGLLARGQGFTTA
Bass		
	Glucagon	IP1GLP-1
Pufferfish 1	KR HSEGTFSNDYSKYLEDRKAQDFVRWLMNN	KR SGTAE KR HADGTFTSDV
Zebrafish 1	KR HSEGTFSNDYSKYLETRRAQDFVQWLMNA	KR NGGSV KR HAEGTYTSDV
Zebrafish 2	KR HSEGTFSNDYSKYLETRRAQDFVQWLMNS	KR SGVPT KR HADGTYTSDV
Pufferfish 2	KR HSEGTFSNDYSKYLETRRAQDFVQWLKNS	KR NGSLF RR HADGTYTSDV
Anglerfish 1	KR HSEGTFSNDYSKYLEDRKAQEFVRWLMNN	KR SGVAE KR HADGTFTSDV
Anglerfish 2	KR HSEGTFSNDYSKYLETRRAQDFVQWLKNS	KR NG-LF RR HADGTYTSDV
Trout 1	KR HSEGTFSNDYSKYQEERMAQDFVQWLMNS	KR SGAPS KR HADGTYTSDV
Trout 2	KR QSEGTFSNYYSKYQEERMARDFLHWMNS	KR SGAPS KR HADGTYTSDV
Goldfish	KR HSEGTFSNDYSKYLETRRAQDFVEWLMNS	KS NGGSA KR HAEGTYTSDI
Bass	.. HSQGTFTNDYTNYLEDRQAQDFIRWLMNN	KR SGAAE KR HADGTFTDDA
	GLP-1	IP2GLP-2
Pufferfish 1	SSYLKDQAIKDFVARLKAGQV RR	ESETNRRVEAFN RR HVDGTFTSDVNKV
Zebrafish 1	SSYLQDQAAQRFVARLKSGQP KQ	DVANNKGANMAQ RR HVDGSFTSDVNKV
Zebrafish 2	SSYLQDQAAKEFVSWLKTGRG RR	E..... ..
Pufferfish 2	STYLQDQAAKEFVSWLKTGPG RR	E..... ..
Anglerfish 1	SSYLKDQAIKDFVDRLKAGQV RR	E..... ..
Anglerfish 2	SSYLQDQAAKDFVSWLKAGRG RR	E..... ..
Trout 1	STYLQDQAAKDFVSWLKSGRA RR	ESAEESRNGPMS RR HVDGSFTSDVNKV
Trout 2	STYLQDQAAKDFVSWLKSGPA RR	ESAEESMNGPMS RR HVDGSFTSDVNKV
Goldfish	SSFLRDQAAQNFVAWLKSGQP KQ	E..... ..
Bass	SSDFYDQAIKDFVAKLKSGQD RR	EPETDRRREAFS RR HVEGSFTSDIN..
	GLP-2	
Pufferfish 1	LDSMAAKEYLLWVMASKPSGERK KR	QADQ
Zebrafish 1	LDSIAAKEYLQWVMNSKASGTSG KR	GGNQ
Zebrafish 2		
Pufferfish 2		
Anglerfish 1		
Anglerfish 2		
Trout 1	LDSLAAKEYLLWVMTSKTSGKSN KR	QEDH
Trout 2	LDSLAAKEYLLWVMTSKTSCKSN KR	QEDH
Goldfish		
Bass		

SOMATOSTATINAS

Las somatostatinas (SSs) son un grupo de hormonas peptídicas estructuralmente diversas que presentan numerosos efectos sobre metabolismo, crecimiento, y desarrollo de peces y vertebrados en general.

Las SSs se producen en las células D de los islotes pancreáticos además de encontrarse en células de tejidos diferentes, incluyendo la zona gastrointestinal. Se encuentran a menudo colocalizadas con otros factores tales como colecistoquinina, neuropeptido-Y y ácido γ -aminobutírico en la misma célula (Nelson y Sheridan, 2005; Patel, 1999).

Peces y anfibios poseen múltiples genes de SS que dan lugar a varias formas moleculares. Cada uno de los genes de SS codifica un precursor distinto, preproSS (PPSS) (PPSS-I, PPSS-II y PPSS-III), que por escisión proteolítica, producen péptidos de longitudes diferentes (Nelson y Sheridan, 2005; Sheridan et al., 2000). Es de destacar que el péptido de 14 aminoácidos, SS-14, aparece muy bien conservado en la filogenia, caracterizándose en casi todos vertebrados estudiados hasta la fecha (Sheridan et al., 2000). Formas variables de SS que contienen [Tyr⁷, Gly¹⁰] en la secuencia de SS-14 se han aislado de numerosas especies de teleósteos (Nelson y Sheridan, 2005) (Tabla 3).

La PPSS-I da lugar a la SS-14 invariante y a una forma de SS extendida por el extremo N-terminal, de 28 aminoácidos denominada SS-28, además de otros péptidos que varían en longitud. El precursor PPSS-II contiene otros péptidos y otra variante de SS-14. En los salmónidos, hay dos genes que codifican PPSS-II (ambos contienen [Tyr⁷, Gly¹⁰]-SS-14 en el extremo C-terminal) de los cuales se pueden obtener potencialmente SSs de diferente longitud (Moore et al., 1995 y 1999). Varias especies de peces, como *Carassius auratus*, *D. rerio*, *T. rubripes* o *Acipenser sturio*, tienen una tercera prosomatostatina (PPSS-III) que contiene [Pro²]-SS-14 en el extremo C-terminal (Devos et al., 2002; Lin et al., 1999a, 2000;) (Tabla 4 y 5).

Las SSs tienen muchos efectos directos e indirectos en el metabolismo intermediario y en el comportamiento alimenticio. En general, impiden el consumo de comida y promueven procesos catabólicos (por ejemplo, movilización de los lípidos y carbohidratos almacenados) (Sheridan y Kittilson, 2004; Volkov et al., 2005). Las SSs también pueden ayudar a coordinar el metabolismo con procesos de crecimiento y reproductivos (Sheridan y Kittilson, 2004).

El efecto regulador de la secreción de la SS sobre GH, acción por el cual esta familia de hormonas recibe su nombre, se debe a que actúan en varios niveles del

sistema GH – IGF-1. Inhiben la producción y almacenamiento de GH pituitario y actúan de forma extrapituitaria reduciendo la sensibilidad al GH, así como por inhibición de la producción, secreción y sensibilidad a IGF-1, aunque no todas las formas de SS son equipotentes en esta acción (Sheridan y Hagemeister, 2010) y esta es solamente una de un enorme número de acciones fisiológicas que poseen las SSs. En mamíferos, se sabe que las SSs inhiben algunos factores pituitarios, incluyendo la inhibición a la hormona estimulante del tiroides (TSH), la adenocorticotrópica (ACTH) y la prolactina (PRL) (Patel, 1999). Las SSs inhiben otras hormonas como la INS, GLU, y PP del páncreas endocrino y también actúan sobre el páncreas exocrino con la secreción de bicarbonato y enzimas digestivas (Klein y Sheridan, 2008; Patel, 1999; Sheridan et al., 2000). Además, reducen la secreción de tiroxina, triyodotironina y calcitonina del tiroides; y reduce las secreciones de renina y aldosterona renales y suprarrenales (Barnett, 2003; Patel, 1999). Las SSs también impiden la secreción de péptidos gastrointestinales incluyendo: secretina, ghrelina, CCK, polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), péptido inhibidor gástrico (GIP), motilina, enteroglucagón, neurotensina, ácido gástrico, factor de péptido intrínseco, bilis y los fluidos colónicos (Barnett, 2003; Broglio et al., 2003). No sólo las secreciones gastrointestinales están afectadas por las SSs, hay otras funciones relacionadas con el tracto gastrointestinal como la motilidad de intestino, vaciado gástrico, tiempo de tránsito gastrointestinal, contractibilidad de la vejiga, circulación en el intestino, circulación sanguínea del hígado y esplénica, impidiendo también la absorción intestinal de carbohidratos, aminoácidos, calcio y triacilglicéridos (Barnett, 2003).

Las SSs han demostrado tener acciones neurotrópicas y miotrópicas, influyen en el transporte, modulan el desarrollo funcional y regulan el metabolismo. Por ejemplo, las SSs estimulan la actividad migratoria del complejo motor, modulan el comportamiento y la cognición (funciones del SNC), e inhiben varios procesos motores y sensoriales (funciones de SNP) (Barnett, 2003). Las SSs también inhiben la contractibilidad del músculo liso vascular/visceral y del músculo cardíaco, modulan la absorción de agua y electrolitos (Na^+ , Cl^-) en mamíferos y peces (Bern et al., 1985; Davis y Shuttleworth, 1985; Patel, 1999). Además, inhiben células inmunes activadas (linfocitos, monocitos, y macrófagos) (Patel, 1999) e inhiben la diferenciación de las células de cartílago y hueso (Weiss et al., 1981) tanto como la proliferación de células cultivadas de la mucosa intestinal (Stange et al., 1984). Las SSs también juegan un

papel fundamental en la movilización de lípidos almacenados y en las reservas de carbohidratos (Sheridan y Kittilson, 2004).

La inhibición *in vivo* e *in vitro* de secreción de GH por las SSs ha sido demostrada en varios peces teleósteos, incluyendo *C. auratus*, *Mollienesia latipinna*, *Oreochromis niloticus*, *Scophthalmus maximus*, *O. mykiss* y *Oncorhynchus kisutch* (Batten y Wigham, 1984; Cook y Peter, 1984; Lou et al., 1990; Oyama et al., 1981; Rivas et al., 1986; Rousseau et al., 2001; Sweeting y McKeown, 1987). El tratamiento de *O. mykiss* con SS-14 no afectó el consumo de alimentos pero redujo en plasma IGF-I e INS, en asociación con el retraso de crecimiento (Very et al., 2001). Ya que los niveles de ARNm de GH pituitaria no se ven afectados, parece que las SSs actúan principalmente sobre la secreción de GH (Lin y Peter, 2001, Very y Sheridan, 2002). Las SSs también pueden tener acciones fuera del nivel pituitario. Por ejemplo, la incorporación de sulfato [³⁵S] al cartílago de la branquia, que es estimulado por GH y IGF-I (Duan et al., 1998; 2010), fue inhibido por SS-14 *in vivo* e *in vitro* (Very et al., 2001). Además, SS-14 y SS-25-II redujeron el número de receptores hepáticos de GH en *O. mykiss* *in vivo* e *in vitro* y la SS-14 *in vitro* redujo la cantidad de ARNm de IGF-I hepático (Very y Sheridan, 2002).

Está claro que la relación entre la estructura y la función de las SSs existe y que las varias SS isomorfos pueden poseer diferentes efectos fisiológicos. La inyección de SS-25-II, pero no de SS-14, en *O. mykiss* reduce los niveles de INS en plasma, en tanto que, inyecciones de ambos deprimen por igual los niveles de GLU en plasma (Eilertson y Sheridan, 1993). En *C. auratus*, SS-14 y SS-28 de mamíferos fueron equipotentes en la inhibición de la secreción de GH de la pituitaria, mientras que SS-25-II y SS-22 de *I. punctata* no tuvieron efecto sobre la secreción de GH (Marchant et al., 1987, 1989; Oyama et al., 1981). Recientemente, Yunker et al., (2003) demostraron que en el cerebro de *C. auratus*, la SS-28-II fue un inhibidor más potente de la GH que diferentes SSs-14 y que las distintas isoformas pueden ejercer sus acciones activando diferentes vías celulares. Estudios previos sobre la absorción de agua e iones en el intestino de anguilas europeas mostraron efectos variados de las distintas isoformas de SS de anguila. La SS-14-II aumentó el flujo iónico en el intestino más que la SS-14, y la SS-25-II activó el flujo iónico de Na⁺ y Cl⁻ y el flujo de agua a través de la superficie intestinal (Uesaka et al., 1994).

Tabla 3. Aminoácidos pertenecientes a prosomatostatina-1 y/o -2, para 4 especies de osteoglosomorfos además de un ciprínido y del pez dorado, deducidas de la secuencia de nucleótidos (Youson et al., 2006).

Elephantnose I	*PRERKAGCKNFFWKFTSC	114
Knifefish I	*-----	114
White sucker I	*-----	69
Goldfish I	*-----	114
Elephantnose II	P-----Y--G----	115
Knifefish II	P-----Y--G----	116
Butterflyfish II	P-----Y--G----	115
Arawana II	P-----Y--G----	115
White sucker II	Y-----Y--G----	120
Goldfish II	PT-V--E-----Y--G----	120

SST-14

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de las formas variante e invariante de la SS-14 (zona oscurecida) y las formas extendidas (25 – 28 aminoácidos) como se deducen de sus PPSS-I y PPSS-II en osteoglosomorfos. (Youson et al., 2006).

SST-I			
Elephantnose I	AAGPALA**PRERKAGCKNFFWKFTSC	26	
Knifefish I	----P--**-----	26	
White sucker I	----M--**-----	26	
Goldfish I	----M--**-----	26	
SST-II			
Elephantnose II	SVE*PNNLPPRERKAGCKNFYWKGFSTSC	27	
Knifefish II	--D*-----Y--F----	27	
Butterflyfish II	---*-G-V-----Y--F----	27	
Arawana II	-L-*L-----Y--F----	27	
White sucker II	-A-NT-Q-Y-----Y--F----	28	
Goldfish II	-A-SS-Q--T-V--E-----Y--F----	28	

SST-14

Tabla 5. Comparación entre las estructuras primarias de péptidos derivados de la prosomatostatina- II, aislada de los cuerpos de Brockmann de peces teleósteos. (*) Indica una delección de residuos introducida para maximizar la similitud de la secuencia. (Conlon et al., 1997).

Anglerfish	SVDSTNNLPP	¹⁰ RERKAGCKNF	²⁰ YWKGFTSC	[61, 62]
Sculpin	---PP--I-L	-----	-----	[44, 63]
Flounder	-IEPP-----	-----	-----	[44]
Salmon	---***-----	-----	-----	[45]
Trout	--GNP-----	-----	-----	[16]
Eel	---***-QQG	-----	---P---	[46]
Goldfish	--E-S-H--A	-----	-----	[64]
Tilapia	-ADQP-SI--	-----	---L---	[47]
Catfish		DNTV TSKPLN-M-Y	F--SRTA-	[67]

FAMILIA DEL NEUROPEPTIDO TIROSINA

Los miembros de la familia del neuropéptido tirosina (NPY) incluyen el neuropéptido tirosina (NPY), el polipéptido pancreático (PP) y el péptido tirosina-tirosina (PYY). Como con muchas otras hormonas pancreáticas, los miembros de esta familia están estrechamente relacionados con la regulación del consumo de energía y el balance energético.

Esta familia de péptidos es filogenéticamente antigua y la forma de surgir de cada péptido parece resultar de una serie de duplicaciones de genes (Cerdá-Reverter y Larhammar, 2000).

El primer péptido de esta familia que se descubrió fue el NPY en 1982 por Tatemoto y su equipo. Un poco más tarde, en 1985, Andrews et al., encuentran el primer miembro de esta familia en peces, en concreto en *Lophius americanus*, este péptido se conoce como anglerfish peptide Y (aPY). En el año siguiente, Kimmel et al., 1986, aíslan y caracterizan un péptido del páncreas de salmón con un 83% de homología con el NPY porcino. Larhammar en 1996 clasificó este péptido de salmón como un miembro de la superfamilia NPY llamado PYY. Pero hasta 1992 no se determinó la secuencia de aminoácidos del NPY de diferentes peces como *C. auratus*, *Torpedo marmorata*, (Blomqvist et al., 1992), *Gadus morhua*, *O. mykiss*, (Jensen y Conlon, 1992), *Scyliorhinus canicula* (Conlon et al., 1992). Sin embargo, aunque es bastante considerable la conservación de la secuencia del NPY a lo largo de la evolución (Larhammar, 1996), los estudios inmunocitoquímicos para la localización del NPY en peces, se llevaron a cabo utilizando anticuerpos contra NPY de mamíferos (Silverstein y Plisetskaya, 2000) (Tabla 6).

El NPY parece tener un origen exclusivamente neuronal mientras que el PYY se distribuye tanto en intestino y páncreas como en tejidos neuronales. El PP no se encuentra en peces y aparentemente es el resultado de una duplicación de genes en un tetrápodo primitivo (Jensen y Conlon, 1992; Larhammar, 1996).

Una característica fundamental de los péptidos de esta familia es que posee una secuencia de aminoácidos altamente conservada que permite el correcto plegado en la conformación polipéptido pancreática (pliegue PP) (Blundell et al., 1981; Cerdá-Reverter y Larhammar, 2000; Larhammar, 1996). Esta conservación de la estructura parece crítica para que estos péptidos puedan interactuar con los receptores apropiados

cuando se liberan en las terminaciones nerviosas o en las células del tracto gastrointestinal.

Se sabe que en mamíferos el PP es liberado en respuesta al consumo de alimentos y que es responsable de la inhibición de las secreciones gástricas y pancreáticas. Utilizando PP de salmones y escorpénidos, se demostró que la administración de PP induce a alimentarse y eleva la presión sanguínea de una manera dosis dependiente, lo que sugiere actividades biológicas similares para el péptido en mamíferos y peces (Balasubramaniam et al., 1990, 1992).

El neuropéptido Y es un péptido de 36 aminoácidos altamente conservado en todos los vertebrados estudiados (Tabla 7). Youson y Potter (1993) demostraron la presencia de NPY en los islotes pancreáticos de dos especies de lamprea (*Ichthyomyzon gagei* y *Petromyzon marinus*), lo que fue importante para entender la evolución del péptido. La existencia de NPY, sin embargo, no se ha limitado al páncreas: NPY se ha identificado en el tracto gastrointestinal y en neuronas del sistema nervioso central y periférico de muchas especies de peces (Nelson y Sheridan, 2006).

Se han realizado muchos estudios de los efectos del NPY sobre la ingesta (Vona-Davies y McFadden, 2007), pero existe poca información sobre los cambios relacionados con el NPY sobre la digestión y la utilización de energía. Cuando se administra *in vivo*, el NPY demuestra ser un fuerte estimulador del consumo de alimentos en vertebrados de clases muy diferentes (Narnaware et al., 2000). Según los estudios de Volkoff et al., (2005, 2009), el NPY es el más potente factor estimulador de la ingesta de alimentos. En *C. auratus*, las inyecciones de NPY incrementaron el consumo de comida cuando se administraba intracerebroventricular pero no cuando se inyectaba intraperitonealmente, lo que sugiere que el sitio de acción, al igual que GLP-1, es el cerebro (Lopez-Patiño et al., 1999). Estos resultados fueron corroborados por Narnaware et al., (2000), que demostraron que las inyecciones de receptores antagonistas de NPY reducían significativamente el consumo de alimentos en *C. auratus*. Los salmones de la especie *Oncorhynchus tshawytscha* mantenidos sin alimento durante largos períodos de tiempo mostraban cambios en neuronas NPY, lo que nos indica el papel importante de éstos péptidos en el balance de energía y regulación de la alimentación (Silverstein et al., 1998). Bernier et al., (2004) sugirieron posibles interacciones con los niveles de cortisol de suero, que aumentarían durante los períodos de estrés la expresión del NPY en el telencéfalo y el consumo de comida en *C. auratus*.

Volkov y Peter (2000) demostraron que las inyecciones de lipopolisacáridos, un componente bacteriano que estimula la respuesta inmunitaria, en *C. auratus* reducía la ingesta de alimentos así como la expresión de NPY, demostrando una conexión entre los sistemas inmunitario y neuroendocrino. Estas respuestas fisiológicas que van asociadas a cambios en el apetito, podrían deberse a modulaciones de la expresión génica y la acción de hormonas reguladoras como parece demostrarse en *C. auratus*, *G. morhua* y en *L. americanus* (Volkoff et al., 2009). El NPY también afecta a la potencia cardiovascular y produce la contracción de músculo liso intestinal en *G. morhua*, lo que podría tener efectos indirectos sobre el metabolismo de peces (Shahbazi et al., 2002). El NPY también inhibe directamente la liberación de SS en los islotes pancreáticos de *O. mykiss* (Eilertson et al., 1995).

El PYY se produce principalmente en el tracto gastrointestinal de mamíferos y en peces y también en el sistema nervioso (Larhammar, 1996). Además, se ha demostrado que el PYY disminuye el apetito en mamíferos (Batterham et al., 2002). Existe poca información sobre los efectos metabólicos de PYY en peces, pero al igual que el PP, el PYY en mamíferos impide también las secreciones gástricas y pancreáticas (Conlon, 2002) (Tabla 7 y 8).

Un péptido aislado en los islotes pancreáticos de diversas clases de peces muestra una secuencia más cercana al NPY y al PYY que al PP de mamíferos, denominándose péptido tirosina de pez (péptido Y o PY) (Cerdá-Reverter y Larhammar, 2000) (Tabla 9). La expresión en células neuronales del PY se ha descrito en numerosas especies (Cerdá-Reverter et al., 2000; Kurokawa y Suzuki, 2002; Noe et al., 1989). La función de este péptido tiene que ser mejor estudiada en peces, pero el PY en mamíferos regula el consumo de alimento y la presión sanguínea, de manera similar a las acciones de otros péptidos en esta familia (Balasubramaniam et al., 1992) (Tabla 9).

Tabla 7. Alineamiento de las secuencias de PYY. Sólo se muestran las posiciones que difieren de la secuencia de arriba, que es la secuencia deducida de un gnatóstomo ancestral. La secuencia PYY de pollo es una aminoácido más larga por el extremo amino (Cerdá-Reverter et al., 2000).

	1	10	20	30	36
Ancestral gnathostome	YPPK	PENPGEDAPPEELAKYYSALRHYINLITRQRY			
Human (<i>Homo sapiens</i>)	--I--	A-----S-----NR--AS--L--V----			
Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	--A--	A-----S-----SR--AS--L--V----			
Mouse (<i>Mus musculus</i>)	--A--	A-----S-----SR--AS--L--V----			
Pig (<i>Sus scrofa</i>)	--A--	A-----S-----SR--AS--L--V----			
Cow (<i>Bos taurus</i>)	--A--	QA--H-S-D--NR--TS--L--V--F			
Guinea Pig (<i>Cavia porcellus</i>)	--S--	A-S-S-----R--AS--L--V----			
Chicken (<i>Gallus gallus</i>)	A-----	S-DA-S--I-Q-F-----V----			
Phyton (<i>Phyton morulus</i>)	-----	S--N-T-----IAD-----V----			
Desert tortoise (<i>Gopherus agassizii</i>)	-----	DN-S--M--F-----V----			
Tree frog (<i>Phyllomedusa bicolor</i>)	-----	S-----S--MN--LT-----V----			
European green frog (<i>Rana ridibunda</i>)	-----	S-----S--MN--LT-----V----			
Sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	--A--	AS-RDG-----			
Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	-----	-----T-----			
Coho Salmon (<i>Oncorhynchus kistch</i>)	-----	-----T-----			
Eel (<i>Anguilla rostrata</i>)	-----	S--Q--T-----			
Bowfin (<i>Amia calva</i>)	-----	-----R-----			
Gar (<i>Lepisosteus spatula</i>)	-----	-----			
Bichir (<i>Polypterus senegalis</i>)	-----	-----			
Ray (<i>Raja rhina</i>)	-----	D--A-----			
Spiny dogfish (<i>Squalus acanthias</i>)	-----	-----			
Common dogfish (<i>Scyliorhinus canicula</i>)	-----	-----			
Sea lamprey (<i>Geotria australis</i>)	M----	D--SQ--S-----S--MS-V-N-----			
Sea lamprey (<i>Petromyzon marinus</i>)	M----	D--SP--S-----S--ML-V-N-----			
River lamprey I (<i>Lampetra fluviatilis</i>)	M----	D--SS--S-----S--ML-V-N-----			
<u>River lamprey II (<i>Lampetra fluviatilis</i>)</u>	<u>F----</u>	<u>D--DN-S--QM-R-KA-V-----</u>			
Constant PYY	.P.KP..P...	A.P.....Y....R.Y.NL.TRQR.			

Tabla 8. Secuencias deducidas de la familia NPY ancestral. Los puntos marcan diferencias entre ancestros de NPY y de PYY. La marca tipo diamante señala la identificación del ancestro PP con el ancestro PYY en la posición diagnóstico Pro-14 (Larhammar, 1996).

A	1	10	20	30	36																															
NPY gnathostome	Y	P	S	K	P	D	N	P	G	E	D	A	P	E	D	L	A	K	Y	Y	S	A	L	A	H	Y	I	N	L	I	T	R	Q	R	Y	
		•		•									•	•																						
PYY gnathostome	Y	P	P	K	P	E	N	P	G	E	D	A	P	P	E	E	L	A	K	Y	Y	S	A	L	A	H	Y	I	N	L	I	T	R	Q	R	Y
													♦																							
PP tetrapod	A	P	X	E	P	X	X	P	G	D	A	T	P	E	X	L	N	Q	Y	Y	X	D	L	X	Q	Y	I	X	X	T	A	P	R	Y		

B	1	10	20	30	36																															
						Constant																														
NPY constant	.	P	.	K	P	.	P	G	.	A	P	.	.	.	.	A	.	Y	.	A	.	R	H	Y	I	N	L	I	T	R	Q	R	Y	22		
PYY constant	.	P	.	K	P	.	P	.	.	A	P	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	A	.	Y	.	N	L	.	T	R	Q	R	.	15			
PP constant	.	.	.	P	.	P	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	R	.	7

Tabla 9. Alineamiento de las secuencias de PY. Los guiones indican aminoácidos idénticos a los de la secuencia de arriba, que es la secuencia deducida de un gnatóstomo ancestral (Cerdá-Reverter et al., 2000).

	1	10	20	30	36																															
Acantomorpha	Y	P	P	K	P	E	S	P	G	S	N	A	S	P	E	D	W	A	K	Y	H	A	A	V	R	H	Y	V	N	L	I	T	R	Q	R	Y
Sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	-----																																			
Tilapia (<i>Oreochromis nilotica</i>)	-----D-----																																			
Daddy sculpin (<i>Cottus scorpius</i>)	---Q---G-----																																			
Anglerfish (<i>Lophius americanus</i>)	---T-----S-Q-----																																			
Constant PY	Y	P	P	.	P	E	.	P	G	.	.	A	S	P	E	D	W	A	.	Y	.	A	A	V	R	H	Y	V	N	L	I	T	R	Q	R	Y

2.3 ORGANIZACIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOCRINAS PANCREÁTICAS

Hay cuatro tipos principales de células en el órgano del islote de peces, pero no todos los peces poseen todos estos tipos celulares.

Las células que reaccionan con suero contra INS se han denominado células B o β y en peces se distribuyen generalmente en el centro, tanto de los islotes principales como de los islotes secundarios (Youson y Al-Mahrouki, 1999). Esta disposición de las células de INS las encontramos en los islotes de *D. labrax* (Lozano et al., 1991b; Agulleiro et al., 1993) y en *S. auratus* (Abad et al., 1986, 1992).

En *Scophthalmus maximus*, las células B se localizaron en cordones distribuidos por todo el islote al igual que en *Mugil auratus* y *Mugil saliens* (Berwert et al., 1995; Lozano y Agulleiro, 1986). En *Oreochromis niloticus* las células B se encuentran distribuidas en agrupaciones celulares tanto en el islote principal como en los secundarios (Morrison et al. 2004; Yang et al., 1999).

Las células productoras de SS se llaman células D. Se ha demostrado la existencia de dos tipos de células D, las D1 y D2, que tienen diferente distribución, estructura e inmunorreactividad específica (Abad et al., 1992; Agulleiro et al., 1993; Lozano y Agulleiro, 1986; Lozano et al., 1991a y b; Nozaki et al., 1988; Youson et al., 2006). Las células D2 se localizan cerca de la región central junto a las células B y son inmunorreactivas a SS-14 y las células D1 son inmunorreactivas a SS-25, localizándose en la periferia del islote, entre las células productoras de GLU (Abad et al., 1992; Berwert et al., 1995; Nozaki et al., 1988; Plisetskaya et al., 1986; 1989; Youson et al., 2006).

Esta disposición de células D1 y D2 se encuentra, tanto en el islote principal como en los secundarios, en ejemplares adultos de *S. aurata* (Abad et al., 1986; 1992), *D. labrax* (Agulleiro et al., 1993; Lozano et al., 1991b), *O. niloticus* (Morrison et al., 2004; Yang et al., 1999), *M. auratus* y *M. saliens* (Lozano y Agulleiro, 1986) y en larvas de *D. labrax* (Agulleiro et al., 1994; García Hernández y Agulleiro, 1992; García Hernández et al., 1994) y de *O. niloticus* (Morrison et al., 2004).

Las células D2 no se reconocen morfológica ni inmunocitoquímicamente en osteoglosomorfos (Youson y Al-Mahrouki, 1999), pero presentan unas células denominadas DX, con estructura, gránulos e inmunorreactividad a SS-34 de lamprea. Sin embargo, los gránulos de las células D1 de los osteoglosomorfos inmunorreaccionan tanto con SS-14 como con SS-25 (Youson et al., 2006).

Las células productoras de SSs largas, se localizan en la periferia de los islotes y rodean a las células productoras de SS-14 e INS (Morrison et al., 2004; Yang et al., 1999).

En teleósteos, la proporción de células productoras de SS es más alta que en mamíferos, donde son relativamente escasas (10% según Bishop y Polak, 1997); en peces, esta proporción sube a 23,1% para la SS-25 y 21.8% para la SS-14 (Yang et al., 1999).

Las células productoras de GLU, llamadas células A o α tienen varios patrones de localización. Se pueden localizar distribuidas en cordones de células aisladas por todo el islote principal mientras que en los islotes más pequeños se localizan sólo en la periferia como en *M. auratus* y *M. saliens* (Lozano y Agulleiro, 1986). En *D. labrax* sólo en la periferia de los islotes más grandes aunque unas pocas células se encuentran dispersas entre las células B (Agulleiro et al., 1993; Becaría et al., 1990; Lozano et al., 1991a). En *Ambloplites rupestre* se localizan en la periferia de los islotes, estas células fueron además inmunoteñidas con anti-GLP de salmón pero anti-GLU también tiñó algunas células de la zona central del islote (Youson y Al-Mahrouki, 1999). En ejemplares adultos de *S. aurata* las células inmunorreactivas a GLU se encuentran en la periferia del islote adentrándose en él a través de los septos de tejido conectivo (Abad et al., 1986, 1988).

Las células inmunorreactivas de la familia del NPY se localizan generalmente en la región periférica de los islotes pancreáticos (Youson et al., 2006). En *Cottus scorpius* y en *O. niloticus* las células inmunorreactivas a PYY se introducen en el interior del islote hasta su centro siguiendo los septos de tejido conectivo (Stephan y Falkmer, 1980; Yang et al., 1999). En *S. aurata*, así como en *D. labrax*, las células se agrupan en un área superficial del islote principal; en los islotes más pequeños, las células son más numerosas ocupando toda el área externa (Lozano et al., 1991a; Abad et al., 1986). En *M. auratus* y en *M. saliens* estas células son escasas o ausentes en el islote principal y en muchos de los islotes más pequeños (Lozano y Agulleiro, 1986). Esta diferente proporción en islote principal y secundarios no se da en *O. niloticus* donde parecen ser similares (Morrison et al., 2004; Yang et al., 1999).

Se ha demostrado colocalización de péptidos de la familia del NPY con el GLU en *D. labrax*, en células de los islotes intermedios y pequeños (Lozano et al., 1991a). En adultos de *S. aurata*, la coexistencia completa de inmunorreactividades a GLU y PP se ha demostrado solamente en los islotes secundarios mientras que células con PP se

agrupan en áreas limitadas de la periferia del islote principal (Abad et al., 1987, 1988). No se ha encontrado coexistencia de inmunorreactividad a GLU y PP en los islotes principal y secundario de *S. maximus* (Berwert et al., 1995) y de GLU y PYY en larvas de *O. niloticus* (Morrison et al., 2004).

2.4 ONTOGENIA DEL PÁNCREAS ENDOCRINO

El desarrollo del páncreas endocrino de teleósteos se ha estudiado mediante técnicas de inmunocitoquímica microscópica ópticas (Al-Mahrouki y Youson, 1998; Beccaria et al., 1990; Belsare, 1974; Berwert et al., 1995; García Hernández y Agulleiro, 1992; García Hernández et al., 1994; Guyot et al., 1998; Kurokawa et al., 2000; Lozano et al., 1991a y b; Morrison et al., 2001, 2004; Pack et al., 1996; Rombout et al., 1979; Rombout y Taverne-Thiele, 1982), técnicas de inmunocitoquímica microscópica electrónicas (Abad et al. 1988; Agulleiro et al., 1993; 1994; Al-Mahrouki y Youson, 1999; Beccaria et al., 1990; García Hernández et al., 1994; Guyot et al., 1998), por hibridación *in situ* (Devos et al., 2002; Kurokawa et al., 2002; Milewsky et al., 1998), y por inmunocitoquímica e hibridación *in situ* para estudiar la expresión de las hormonas pancreáticas y factores de la transcripción involucrada en el desarrollo del páncreas (Argenton et al., 1999; Assouline et al., 2002; Biemar et al., 2001).

El páncreas endocrino de teleósteos aparece primero como una agrupación celular (Berwert et al., 1995; Guyot et al., 1998) o como una masa de células con forma de cordón incluida en la pared dorsal del digestivo anterior durante etapas del desarrollo muy tempranas, como ocurre en larvas recién eclosionadas de *D. labrax* (García Hernández y Agulleiro, 1992), *Paralichthys olivaceus* (Kurokawa et al., 2000) o de 1 día después de la eclosión como en *S. maximus* (Berwert et al., 1995). Estas células endocrinas contienen INS y SS-25 en *D. labrax* (García Hernández y Agulleiro 1992) o sólo células con INS en *S. maximus* (Berwert et al., 1995) y *P. olivaceus* (Kurokawa et al., 2000).

La masa inicial de células endocrinas se separa del digestivo y migra a la zona ventral para formar un pequeño islote (García Hernández y Agulleiro, 1992; Guyot et al., 1998; Kurokawa et al., 2000). En *Clarias batrachus* el primer islote incluye células con INS (Falkmer, 1961) y se observa por primera vez 7 días después de la eclosión (Belsare, 1974). En *B. conchoniis*, las células inmunorreactivas a INS, GLU y SS se observan inmediatamente después de la aparición del islote, mientras que las células con PP aparecen un mes después de la fertilización (Rombout et al., 1979; Rombout y Taverne-Thiele, 1982). En *D. labrax* las células pancreáticas centrales contienen INS y SS-14, y las periféricas con SS-25 se ven en el islote de dos a cinco días después de la eclosión. Cuatro días más tarde estas células están rodeadas por células con GLU mientras unas pocas células con NPY/PYY/PP/GLU aparecen en unas pequeñas áreas periféricas del islote después de un mes (García Hernández y Agulleiro, 1992). De

forma similar, en *S. maximus* las células con INS aparecen entre 1 y 4 días después de la eclosión, las células con SS-14 y GLU aparecen después de 5 ó 6 días después de la eclosión, y las células periféricas con PP aparecen seis días más tarde completando el islote (Berwert et al., 1995), mientras que en el islote de *P. olivaceus* no hay inmunorreactividad a ningún péptido de la familia del NPY (Kurokawa et al., 2000). En *O. niloticus*, se ha descrito un islote de células con INS antes de la eclosión (Morrison et al., 20001) y también en la eclosión (Morrison et al., 2004). Un día después de la eclosión este islote contiene células con INS, la mayoría localizadas centralmente y células con SS-14, SS-25 y GLU distribuidas por todo el islote, mientras que unas pocas células eran PYY positivas (Morrison et al., 2004).

Las siguientes etapas del desarrollo del páncreas endocrino están marcadas por: un incremento del tamaño del primer islote que se convierte en el islote principal, y por la aparición e incremento en número y tamaño de nuevos islotes (Belsare, 1974; Berwert et al., 1995; García Hernández y Agulleiro, 1992; Kurokawa et al., 2000; Kurokawa y Suzuki, 2002; Milewski et al., 1998; Morrison et al., 2004; Pack et al., 1996).

En *P. olivaceus*, los islotes accesorios pequeños e intermedios aparecen 30 días después de la eclosión. Estos difieren del islote principal por la presencia de células periféricas que expresan inmunorreactividad a ARNm de PP y PY (Kurokawa et al., 2000; Kurokawa y Suzuki, 2002). En *S. maximus*, cuatro días después de la eclosión se localizan pequeños islotes con células con INS como se encuentran en el primer islote en esa etapa (Berwert et al., 1995). Estos pequeños islotes también contienen células con SS-14 a los 5 o 6 días y células con GLU a los 8 días, mientras que a los doce días aparecen algunas células que contienen PYY (Berwert et al., 1995). Alguno de los islotes pequeños son del tipo principal, con células con SS-14 entremezcladas con células con INS, mientras que otros son islotes secundarios, con células con SS-14 en la periferia.

En *D. labrax*, las células de los islotes primordiales contienen INS y SS-25 y aparecen primero cercanas a los conductos pancreáticos (García Hernández y Agulleiro, 1992). Posteriormente, se observan islotes pequeños en áreas que rodean los conductos pancreáticos, así como células endocrinas aisladas y agrupadas de todos los tipos celulares. Los tipos y la distribución son similares a los del islote principal pero las células están rodeadas por una delgada capa de células que muestran coexistencia de inmunorreactividad a PP/PYY/NPY y GLU, pero no células que solamente tengan

inmunorreactividad a GLU. Estas células con coexistencia se encuentran también entre las células epiteliales de los conductos pancreáticos (García Hernández y Agulleiro, 1992). Conforme va progresando el desarrollo se incrementa el número y tamaño de estos islotes, dando lugar a islotes secundarios (García Hernández y Agulleiro, 1992), los cuales, en adultos, han sido clasificados en tipo I (con una distribución similar al islote principal) y II (con una distribución similar a los islotes pequeños descritos anteriormente) (Lozano et al., 1991a). El islote principal, que deriva del primer islote que aparece en el digestivo, parece fusionarse con los pequeños islotes y/o con células aisladas y agrupadas que en primer lugar se encuentran próximas a los conductos pancreáticos en las larvas (García Hernández y Agulleiro, 1992). En adultos de *D. labrax*, el islote principal contiene células endocrinas que se disponen en amplios cordones rodeados por una delgada capa de células exocrinas mientras los otros islotes están formados por células endocrinas homogéneamente distribuidas (Lozano et al., 1991a, b).

Aunque se han sugerido algunas relaciones funcionales entre células con SS-25 y GLU y entre células con SS-14 e INS basadas en su disposición en los islotes de teleósteos (Abad et al., 1992; Lozano et al., 1991b; Nozaki et al., 1988), las células con SS-25 aparecen en las larvas de *D. labrax* antes de ser identificadas las células con GLU. Así, otras funciones podrían ser atribuidas a SS-25 en etapas tempranas del desarrollo (García Hernández y Agulleiro, 1992), tales como la inhibición de la secreción de INS que ha sido demostrada en salmónidos adultos (Plisetskaya et al., 1986; Sheridan et al., 1987).

En *D. labrax*, el origen directo desde el digestivo de las células del páncreas endocrino ha sido confirmado por microscopía electrónica puesto que las células endocrinas del cordón primordial son contiguas con las células de revestimiento del digestivo y no hay una lámina basal entre ellas (García Hernández et al., 1994). Además, células indiferenciadas, activas mitóticamente, sin ningún gránulo secretorio (u ocasional) se han encontrado en el epitelio del digestivo cercano al cordón primordial y rodeando los primeros islotes después de su separación del digestivo. Estas células parecen acompañar a las células endocrinas en su migración desde el digestivo para formar el revestimiento pancreático. Por otro lado, el incremento en el número de células endocrinas en los islotes no puede ser atribuido únicamente a la división celular, puesto que las figuras de mitosis no son frecuentes (García Hernández et al., 1994).

En *D. rerio*, se ha demostrado por hibridación *in situ* que el gen de la INS es el primer gen de hormonas que se expresa. Dos hileras bilaterales de células parecen aproximarse a la línea media en el endodermo dorsal durante la mitad de la somitogénesis (Biemar et al., 2001) pero convergen durante el final de la somitogénesis para formar una lámina de una célula de espesor que sólo contiene células que expresan SS (Argenton et al., 1999; Biemar et al., 2001). Posteriormente, las células se agregan en una agrupación o islote endocrino final que también presenta células que expresan GLU (Biemar et al., 2001). A las 24 horas después de la fertilización (hpf) se forma un presunto islote que contiene células que expresan GLU rodeando a un grupo central de células que expresan INS y SS (Biemar et al., 2001). Entre las 24 y las 48 hpf, la tinción por doble inmunofluorescencia revela la aparición en el islote de células inmunorreactivas a INS y a SS-14, y células inmunorreactivas a sólo INS o GLU (Argenton et al., 1999). Un islote formado por células con INS y SS rodeado por células con GLU y PP se encuentra dorsalmente al digestivo anterior, embebido por tejido exocrino, cinco o seis días después de la fertilización (Biemar et al., 2001). Además, se han demostrado en el desarrollo temprano de *D. rerio* la expresión de dos diferentes precursores de SS, PPSS-I, precursor de la conservada SS-14, y PPSS-II, precursora de las variantes de SS-14 (Tyr⁷, Gly¹⁰), la primera se expresa más tarde (24 hpf) que la última (17 hpf) (Devos et al., 2002). PPSS-II es el precursor predominante de SS, la mayoría de células que expresan PPSS-I también expresan PPSS-II.

En embriones de *Oryzias latipes*, las células que expresan INS han sido localizadas primero en la pared dorsal del epitelio digestivo, más tarde forman un grupo que emigra al lado derecho del embrión; posteriormente son detectados en la zona ventral y claramente separados del digestivo (Assouline et al., 2002). En adultos jóvenes de *O. latipes*, sólo hay un islote en el tejido exocrino; este contiene un grupo de células con INS rodeadas por células con GLU (las únicas hormonas utilizadas) (Assouline et al., 2002).

2.5 ULTRAESTRUCTURA DE LAS CÉLULAS ENDOCRINAS

Los estudios sobre ultraestructura de las células endocrinas durante la ontogenia de peces sólo se han realizado con detalle en *D. labrax*. En esta especie, el citoplasma se diferencia progresivamente presentando una disminución en el número de ribosomas libres, un desarrollo gradual de orgánulos y un incremento en el número y tamaño de los gránulos de secreción (García Hernández et al., 1994). Cada tipo de célula endocrina tiene gránulos de secreción característicos desde el momento de su aparición que permiten correlacionar el mismo tipo de célula endocrina en estados más avanzados del desarrollo y en adultos, para lo cual se han utilizado técnicas inmunocitoquímicas microscópico ópticas (Abad et al., 1986, 1988, 1990, 1992; García Hernández y Agulleiro, 1992; García Hernández et al., 1994; Lozano et al., 1991a y b;) y microscópico electrónicas (Abad et al., 1986, 1988, 1990, 1992; Agulleiro et al., 1993; 1994; Al-Mahrouki y Youson, 1999; García Hernández et al., 1994; Lozano et al., 1991a, b; Lozano y Agulleiro, 1986).

En las células con INS, los gránulos secretores presentan el contenido central muy denso, separado de la membrana limitante por un estrecho halo claro, en *S. aurata*, tienen un diámetro uniforme de 410 nm (Abad et al., 1986). En *D. labrax*, los gránulos secretores tienen un diámetro de 622 nm y el contenido granular no están muy bien definido, siendo central o excéntrico, a veces en forma de barra, como también se encuentra en *Osteoglossum bicirrhosum*, en esta especie, el contenido granular puede ser también esférico, oval, rectangular o triangular y el diámetro varía de 154 a 338 nm (Agulleiro et al. 1993; Al-Mahrouki y Youson, 1999). En *M. auratus* y *M. saliens*, el diámetro de los gránulos de secreción es de 900 nm (Lozano y Agulleiro, 1986). En *Pantodon buchholzi*, *Noptopterus chitala* y *Gnathonemus petersii* el diámetro está entre 93 y 338 nm y en su interior hay una matriz esférica o hexagonal (Al-Mahrouki y Youson, 1999).

Los gránulos de secreción de las células con SS-25 tienen de moderada a baja electronodensidad en todas las especies estudiadas, en *S. aurata* miden 410 nm de diámetro (Abad et al., 1990). En *D. labrax*, *M. auratus* y *M. saliens* hay además otros con un contenido central oscuro, el diámetro en *D. labrax* está entre 583 y 637 nm y en *M. auratus* y *M. saliens* los gránulos llegan a 1000 nm de diámetro (Agulleiro et al., 1993; Lozano y Agulleiro, 1986). En los osteoglosomorfos *P. buchholzi*, *N. chitala*, *G. petersii* y en *O. bicirrhosum*, SS-25 y SS-14 se colocan en la misma célula y el diámetro de los gránulos es de 72 y 320 nm (Al-Mahrouki y Youson, 1999).

Las células con SS-14 tienen gránulos secretores homogéneos con contenido electronodenso medio o alto de forma esférica, el diámetro varía en las diferentes especies, en *S. aurata* son de 220nm, en *D. labrax* de 467 a 486 nm, en los osteoglosomorfos *P. buchholzi*, *N. chitala*, *G. petersii* y *O. bicirrhosum* de 1400 nm (Abad et al., 1990; Agulleiro et al., 1993; Al-Mahrouki y Youson, 1999; Lozano y Agulleiro, 1986).

Las células con SS-28 en *S. aurata* tienen gránulos con una matriz ligeramente electronodensa y un pequeño contenido central de elevada electronodensidad, su diámetro es de 220nm (Abad et al., 1990).

En osteoglosomorfos se encuentran células con SS-34, que presentan gránulos muy electronodensos alargados o con forma de lágrima, de 69 a 240 nm de diámetro (Al-Mahrouki y Youson, 1999).

Las células con GLU tienen unos gránulos de secreción de mediana o alta electronodensidad y un contenido electronodenso polimórfico, frecuentemente poliédrico, los más frecuentes son los hexagonales, pero también se encuentran octogonales o tetragonales. En *S. aurata* son de 325 nm de diámetro (Abad et al. 1988). En *D. labrax* hay dos tipos de gránulos, los más numerosos tienen un diámetro de 504 nm y otros de 389 nm y un contenido de mediana o alta electronodensidad (Agulleiro et al., 1993). En *M. auratus* y *M. saliens* tienen un diámetro de 1000 nm (Lozano y Agulleiro, 1986). En *P. buchholzi*, *N. chitala*, *G. petersii* y *O. bicirrhosum* el diámetro de los gránulos con GLU se encuentra entre 93 y 385 nm y el contenido granular es oval o circular (Al-Mahrouki y Youson, 1999).

Las células con PP tienen gránulos redondeados u ovals con un contenido esférico muy electronodenso separado de la membrana limitante por un halo claro, en *S. aurata* presentan gránulos secretores de 315 nm de diámetro, en islotes intermedios y pequeños se ha demostrado coexistencia en células GLU/PP (Abad et al., 1988). En *M. auratus* y *M. saliens* son de 600 nm de diámetro (Lozano y Agulleiro, 1986). Los gránulos con NPY en *D. labrax* tienen un diámetro de 323 nm de diámetro y contenido homogéneo de mediana electronodensidad y un estrecho halo claro, menos frecuentes se encuentran otros de diámetro 266 nm y contenido de elevada electronodensidad (Agulleiro et al., 1993). En *P. buchholzi*, *N. chitala*, *G. petersii* y *O. bicirrhosum* el diámetro de los gránulos de PYY fue de 48 a 200 nm y un contenido granular de electronodensidad elevada, por doble inmunotinción se demuestra la no coexistencia en estas células de GLU y PYY (Al-Mahrouki y Youson, 1999).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención de muestras

Se han estudiado 150 ejemplares de *Sparus aurata*, con edades comprendidas entre la eclosión y 114 días después de la eclosión provenientes del Centro Oceanográfico de Murcia (IEO). La recogida de muestras tuvo lugar entre los meses de febrero y mayo del año 2000 en el Centro Oceanográfico de Murcia (IEO), dónde estaban desarrollándose a una temperatura de 18-19° C, una salinidad del 42 ‰, 80 % de saturación de oxígeno, pH de 7.7 y un fotoperiodo normal, la eclosión se produjo 2 días después de la fertilización. Las larvas se alimentaron desde el día 4 después de la eclosión con rotíferos (*Brachionus plicatilis*), a una concentración de 5-20 rotíferos ml⁻¹ y fitoplancton; desde el día 20, con nauplios de *Artemia* sp. a una concentración de 1-5 nauplios ml⁻¹ y desde el día 40 la dieta se completó con metanauplios de *Artemia* sp.

3.2. Procesado de muestras para microscopía óptica

Las muestras fueron fijadas por inmersión durante 24 horas en líquido fijador de Bouin, e incluidas en Paraplast Plus (Sherwood). El material fue seccionado a 5 µm y una de cada cinco o diez secciones obtenidas, dependiendo de la edad de la larva, fue teñida siguiendo el método de tinción convencional de hematoxilina-eosina o con la técnica inmunocitoquímica indirecta peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) (Sternberger, 1986). Tras haber establecido nueve etapas de desarrollo significativas durante el desarrollo del sistema endocrino pancreático de la dorada, considerando algunos cambios morfológicos, y la primera aparición de inmunorreactividad a las distintas hormonas pancreáticas (Tabla 1), se realizaron cortes seriados de muestras de cada una de dichas etapas: ejemplares recientemente eclosionados, 1 día, 2 días, de 4 a 9 días, de 12 y 16 días, de 17 a 23 días, de 24 y 25 días, de 30 a 44 días y de 51 a 114 días, los cuales fueron procesados mediante la técnica PAP y de doble fluorescencia (Wang y Larsson, 1985)

Tabla 1.

Primer antisuero

Antisuero contra	Fuente	Código n°	Dilución trabajo PAP	de IF
Insulina de bonito (bINS)	Dr. J. Planas, Barcelona, España	3P-6	1:1000	1:500
Somatostatina-14 sintética (SS-14)	Amersham International Inglaterra	RPN 1612	1:500	1: 250
Somatostatina-25 de salmón (SS-25)	Dra. E. M. Plisetskaya	3324	1:500	1: 250
Somatostatina-28 (1-12) (SS-28)	Dr. O. Tramu, Talence, Francia	7	1:500	1: 250
Glucagón porcino (GLU)	Amersham International Inglaterra	RPN 1602	1:500	1: 250
Péptido similar al glucagón-1 (1-19) (GLP-1)	Hammersmith Hospital, Londres, UK	1642	1:500	-
Péptido similar al glucagón-2 (GLP-2)	Hammersmith Hospital, Londres, UK	1650	1:250- 1: 2000	-
Péptido tirosina-tirosina (PYY)	Hammersmith Hospital, Londres, UK	1710	1:500	1: 250
Neuropéptido Y (NPY)	Dr. O. Tramu, Talence, Francia	12	1:250	1:100

Nota: Todos los sueros fueron obtenidos en conejo. PAP, Peroxidasa-antiperoxidasa. IF, Inmunofluorescencia.

Inmunocitoquímica (Peroxidasa-antiperoxidasa PAP)

Después de ser desparafinadas y rehidratadas, las secciones se lavaron en tampón fosfato salino 0,1 M (pH 7.2-7.4) (PBS) y se incubaron durante 24 horas a 4° C con el primer antisuero correspondiente diluido en PBS (Tabla 1), posteriormente se lavaron 3 veces, durante 5 minutos en PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente

con el segundo antisuero de cerdo anti-conejo (Dakopatts A/S, Dinamarca), diluido en PBS a una concentración de 1:20, durante un tiempo comprendido entre 30 minutos y 1 hora. Después de lavar nuevamente con PBS, las muestras se trataron durante 30 minutos a 1 hora a temperatura ambiente con el complejo peroxidasa-antiperoxidasa de conejo (Dakopatts A/S, Dinamarca), diluido en PBS a una concentración de 1:100. Después de lavar con PBS y, seguidamente, con tampón TRIS-ClH (pH 7.6) 0.05M, la actividad peroxidasa se visualizó utilizando 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorhídrico (DAB) diluída al 0.05% en tampón TRIS-ClH que contenía un 0.01% de H₂O₂, durante 15 min.

Doble inmunofluorescencia

Las secciones fueron incubadas durante 24 horas a 4° C con el primer antisuero, citado en la tabla 1, posteriormente lavadas en PBS durante 15 minutos e incubadas con el segundo antisuero de cerdo anti-conejo conjugado con tetrametilrodamina isotiocianato (TRICT) (Dakopatts A/S) diluido en PBS a la concentración 1:20. Las secciones se lavaron en PBS, se deshidrataron en etanol, se aclararon en xileno, se secaron al aire y se trataron con vapores de paraformaldehído durante 1h a 60° C, de esta manera fueron bloqueados los sitios de unión libres de inmunoglobulina. Las secciones se lavaron en PBS y, después se volvieron a incubar durante 24 horas a 4°C con otro primer antisuero. Las secciones se lavaron durante 15 minutos y seguidamente incubadas con el segundo antisuero de cerdo anti-conejo conjugado con fluoresceína isotiocianato (FITC) (Dakopatts A/S) diluído en PBS a la concentración de 1:40.

Especificidad de las inmunorreacciones

Los detalles del antisuero primario utilizado y los resultados de las pruebas de preabsorción se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente. La especificidad de la inmunotinción se determinó omitiendo el primer antisuero y por la incubación paralela con antisuero preabsorbido con 100 µg/ml de los péptidos relacionados durante 24 h a 4° C, previamente a su utilización. El tejido pancreático de *S. aurata* adulta se utilizó como control positivo.

Tabla 2.
Preabsorciones

Antisuero	Preabsorción con							
	INS bovina	SS-25	SS-28 (1-14) porcina	SS-14	GLU humano bovino porcino	GLP-1 (1-19)	NPY sintético porcino	PYY sintético porcino
bINS	-	+	+	+				
SS-25	+	-	+	+				
SS-28 (1-12)	+	+	-	+				
SS-14	+	-	+	-				
GLU					-	+	+	+
GLP-1 (1-19)					-	-	+	+
NPY					+	+	-	-
PYY					+	+	+	-

(+), (-) indican si persiste o no la inmunorreactividad después de la preabsorción

3.3 Procesado de muestras para microscopía electrónica

Las muestras se fijaron en una mezcla de glutaraldehído al 1% y paraformaldehído al 2% en tampón cacodilato 0.1M (pH 7.2-7.4) durante 3-4 horas, a una temperatura de 4° C y posteriormente se lavaron en una solución de sacarosa al 0.35% en tampón cacodilato 0.1 M (pH 7.2-7.4). Parte de las muestras se fijaron posteriormente con una solución de tetróxido de osmio al 1% en tampón cacodilato de 2 a 3 horas, a una temperatura de 4° C. Seguidamente, las muestras se mantuvieron durante 2 horas a una temperatura de 4° C, en una solución de acetato de uranilo al 4,8% en tampón veronal (pH 7.2-7.4). A continuación se procedió a la deshidratación mediante concentraciones crecientes de etanol y a la impregnación en una mezcla de resinas epoxi (Luft, 1961), utilizando óxido de propileno como líquido intermediario.

Se obtuvieron secciones semifinas y ultrafinas de las muestras procesadas de todas las edades objeto de estudio con un ultramicrotomo Reitcher-Jung. Las secciones semifinas se tiñeron con azul de toluidina y se utilizaron para localizar la zona de páncreas objeto de estudio.

Microscopía electrónica convencional.

Las secciones ultrafinas obtenidas se recogieron sobre rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963).

Inmunoglobulina-oro (IgG-oro).

Esta técnica se ha realizado tanto en secciones de tejido postfijado con tetróxido de osmio como en secciones fijadas solamente con glutaraldehído y paraformaldehído. Se ha aplicado el método, con algunas modificaciones, de van Bergen en Henegouwen y Leunissen (1986). Las secciones ultrafinas, recogidas sobre rejillas de níquel, se trataron durante 45 minutos con metaperyodato sódico saturado si la muestra se postfijó con tetróxido de osmio, o durante 10 minutos con peróxido de hidrógeno al 10% si no había sido postfijada con tetróxido de osmio. A continuación, las rejillas se lavaron con agua destilada, seguidamente con PBS con glicina (PBS-glicina, 50 mM) durante 10 minutos, y posteriormente 3 veces (5 minutos cada vez) con una solución de albúmina bovina (BSA) al 0.5% y gelatina al 0.2% diluidas en PBS (PBG). Posteriormente se incubaron con el primer antisuero (Tabla 1) diluido en PBG durante 24 horas en una cámara húmeda a 4° C, seguidamente se lavaron con PBG y se incubaron con inmunoglobulina-oro (IgG-oro) de cabra anti-conejo (G10, Jansen Pharmaceutica, Beerse, Bélgica) diluida 1:25 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las rejillas se lavaron seguidamente con PBS (6 x 5 minutos), PBS-glicina (2 x 3 minutos) y agua destilada (4 x 5 minutos).

Las rejillas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Las imágenes se obtuvieron sobre placas fotográficas realizadas con un microscopio electrónico Zeiss EM 10C.

3.4. Digitalización de imágenes

Las imágenes fotográficas para microscopía óptica se obtuvieron con una cámara digital Cools Snap Photometrics y procesadas con el programa de la cámara Cool Snap versión 1.2, se guardaron en formato TIFF a una resolución de 600 dpi.

Para la obtención de imágenes fotográficas para microscopía electrónica, las placas fotográficas se escanearon con una resolución de 1200 dpi con un escáner Epson Perfection 4180 PHOTO, para después disminuir su resolución a 600dpi. Tanto las imágenes para microscopía óptica como electrónica se maquetaron con el programa Adobe Photoshop Elements 2.0 y Adobe Photoshop CS2 versión 9.0.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO MICROSCÓPICO ÓPTICO

Los cambios más importantes relacionados con la aparición y organización durante el desarrollo de las células pancreáticas endocrinas de *S. aurata* se resumen en la Tabla 3. Se ha demostrado la existencia de células con inmunorreactividad semejante a INS, SS-14, SS-25, SS-28 (1-12), GLU, GLP-1 (1-19), péptido tirosina-tirosina y neuropéptido tirosina. La preabsorción del antisuero contra INS, SS-25, SS-28, GLU o PYY por su péptido correspondiente inhibió la inmunotinción, como ocurrió cuando se realizó la preabsorción del antisuero SS-14 con SS-14 o SS-25, GLP-1 (1-19) con GLP-1 o GLU, y NPY con NPY o PYY (Tabla 2). No se observó inmunorreacción cuando se utilizó el antisuero de GLP-2. Estas pruebas de preabsorción mostraron que los antisueros de INS, SS-25, SS-28, GLU reaccionaron específicamente con los péptidos respectivos, mientras anti-SS-14 no discriminó entre SS-14 y SS-25, ni el anti-NPY entre PYY y NPY o anti-GLP-1 entre GLU y GLP-1.

Tabla 1. Aparición y organización celular durante el desarrollo del páncreas endocrino de *Sparus aurata*.

+ inmunoreactividad

Edad	Organización celular	INS/ SS-25	INS	SS-25	SS-28 (1-12)	SS-14	GLU/ GLP-1 (1-19)	PYY	INS/ SS-25/ SS-28	INS/ SS-25/ SS-14	GLU/ GLP-1 (1-19)/ NPY	GLU/ GLP-1 (1-19)/ PYY/NPY
Eclosión	Cordón primordial	+										
1 día	Un islote primordial	+										
2 días	Un islote único		+	+								
4-9 días	Un islote único		+	+	+							
12 y 16 días	Un islote único		+	+	+		+					
17-23 días	Un islote único Fibras nerviosas		+	+	+	+	+	+				
24 y 25 días	Un islote grande Un islote pequeño Células aisladas y agrupadas Fibras nerviosas	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
30-44 días	Un islote grande 2-4 islotes pequeños Fibras nerviosas		+	+	+	+	+	+			+	
51-114 días	Un islote principal y algunos intermedios Algunos islotes intermedios e islotes pequeños Fibras nerviosas		+	+	+	+	+					+
			+	+	+	+		+				+

Larvas recientemente eclosionadas (1.32 mm de longitud)

En larvas recientemente eclosionadas, se observaron solamente células que mostraban colocalización de INS y SS-25 (INS/SS-25), las cuales se disponen formando un cordón (cordón primordial) junto al epitelio del área dorsal de la región anterior del intestino indiferenciado (Figs. 1a-e).

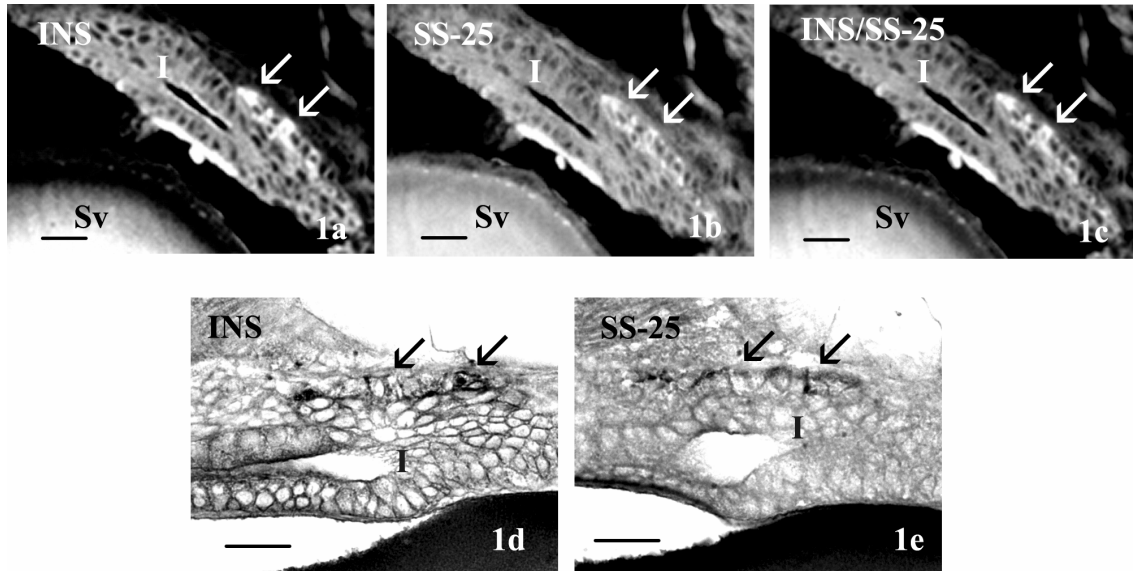


Fig. 1. Secciones longitudinales de larvas recientemente eclosionadas de *S. aurata*. Sección del cordón primordial, junto al intestino primitivo anterior (I), donde se observan células endocrinas con inmunorreactividad. **1a.** Células con insulina (INS) (fluorescencia-FITC). **1b.** Células con somatostatina-25 (SS-25) (fluorescencia-TRITC). **1c.** Las fotografías de doble inmunofluorescencia muestran coexistencia de ambos péptidos (↙). **1d y e** Secciones consecutivas longitudinales teñidas con la técnica PAP indican los mismos resultados. Saco vitelino (Sv). **a-c** x700; **d-e** x1000.

Larvas de 1 día (1.56 mm de longitud)

Las células con INS/SS-25 se disponen en un islote pequeño, redondeado (islote primordial), rodeado por células indiferenciadas próximas al digestivo indiferenciado, y la región posterior del saco vitelino (Figs. 2a y b).

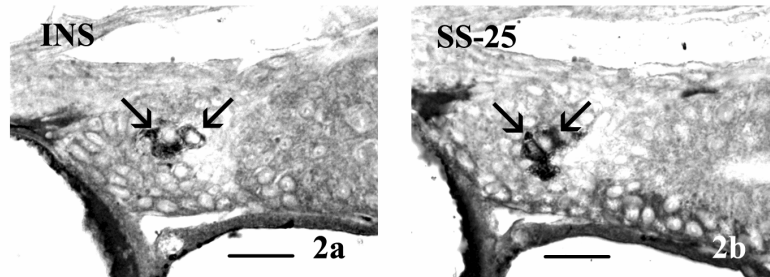


Fig. 2. Secciones longitudinales consecutivas de larvas de 1 día. En el islote primordial se observa coexistencia de: **2a.** Células con insulina (INS). **2b.** Células con somatostatina-25 (SS-25). Las flechas señalan perfiles celulares idénticos (↘). Técnica PAP. x1000.

Larvas de 2 días (1.73 mm de longitud)

Mostraron un islote único, más grande que el islote observado en larvas de 1 día. No se ha mostrado coexistencia a inmunorreactividades de INS y SS-25. Las células con INS y con SS-25 se localizaron en el centro y en la periferia del islote, respectivamente. (Figs. 3a y b).

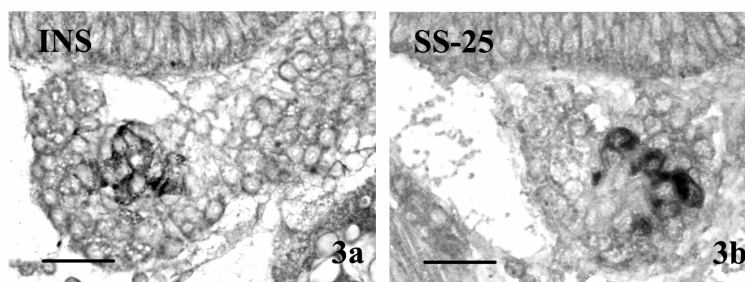


Fig. 3. Secciones consecutivas del islote único en larvas de 2 días **3a.** Células con insulina (INS) en el interior. **3b.** Células con somatostatina-25 (SS-25) en el exterior. Técnica PAP. x1100.

Larvas de 4 a 9 días (2 a 2.6 mm de longitud)

En esta etapa se identifican por primera vez células con inmunorreactividad a SS-28 las cuales se sitúan en la región interior del islote único donde se encuentran también células con INS y las células con SS-25 se localizan en el área periférica del islote (Figs. 4a-c). Este islote se encuentra rodeado por células del páncreas exocrino indiferenciado y se localiza entre el intestino anterior y el hígado, cerca del saco vitelino. A partir de los 8 días, este islote se localiza próximo a la vejiga natatoria.

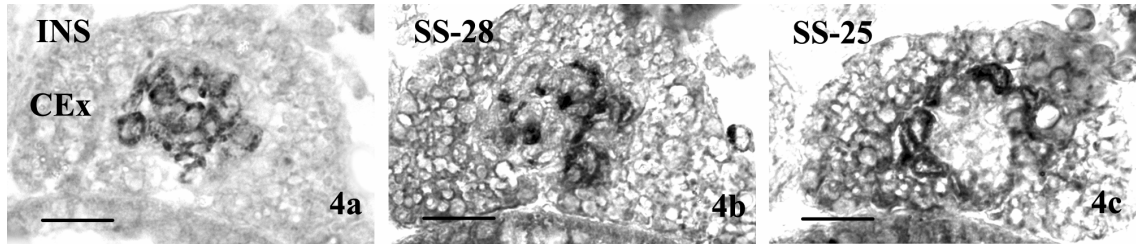


Fig. 4. Secciones consecutivas longitudinales de larvas de 4 días. El islote único estaba rodeado por células pancreáticas exocrinas (CEx) indiferenciadas. **4a.** Células con insulina (INS). **4b.** Células con somatostatina-28 (SS-28) **4c.** Células con somatostatina-25 (SS-25). Técnica PAP. x1100.

Larvas de 12 a 16 días (2.8 a 3.1 mm de longitud)

El islote único se localiza dorsalmente bajo la vejiga natatoria y el riñón, entre el intestino anterior y el bazo (Fig. 5a). Está compuesto de células con INS y con SS-28 en el área central (Figs. 5a y b) y células con SS-25 en la periferia (Fig. 5c). Inmunorreactividades tanto a GLU y a GLP-1 se encuentran por vez primera colocadas en las células endocrinas próximas a las células con SS-25 (Figs. 5d y e).

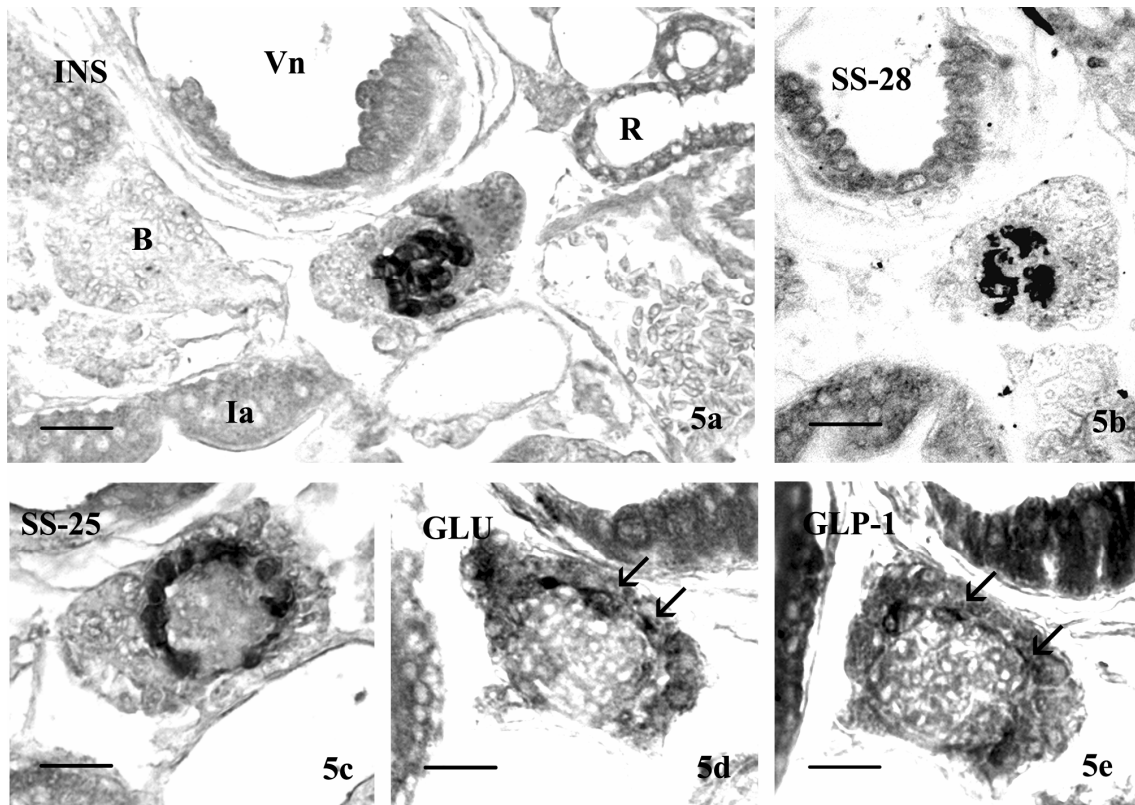


Fig. 5. Secciones longitudinales consecutivas del islote único en larvas de 12 días. **5a.** Células inmunorreactivas a insulina (INS), bazo (B), intestino anterior (Ia), riñón (R), vejiga natatoria (Vn). **5b.** Células inmunorreactivas a somatostatina-28 (SS-28). **5c.** Células inmunorreactivas a somatostatina-25 (SS-25). **5d.** Células inmunorreactivas a glucagón (GLU). **5e.** Células inmunorreactivas a péptido similar al glucagón-1 (GLP-1). La coexistencia en la inmunorreactividad de GLU y GLP-1 está señalada con (↙). Técnica PAP. x1100.

Larvas de 17 a 23 días (3.2 a 4.6 mm de longitud)

El islote único contiene células con INS y con SS-28 en la región central (Figs. 6a y b) y células con SS-25 y células con GLU/GLP-1 en la periferia (Figs. 6c y e), así como células con SS-14 en la región externa y dispersas por todo el área interna (Fig. 6d). En la región central del islote también se ha encontrado fibras nerviosas que muestran inmunorreactividad a PYY (Fig. 6f).

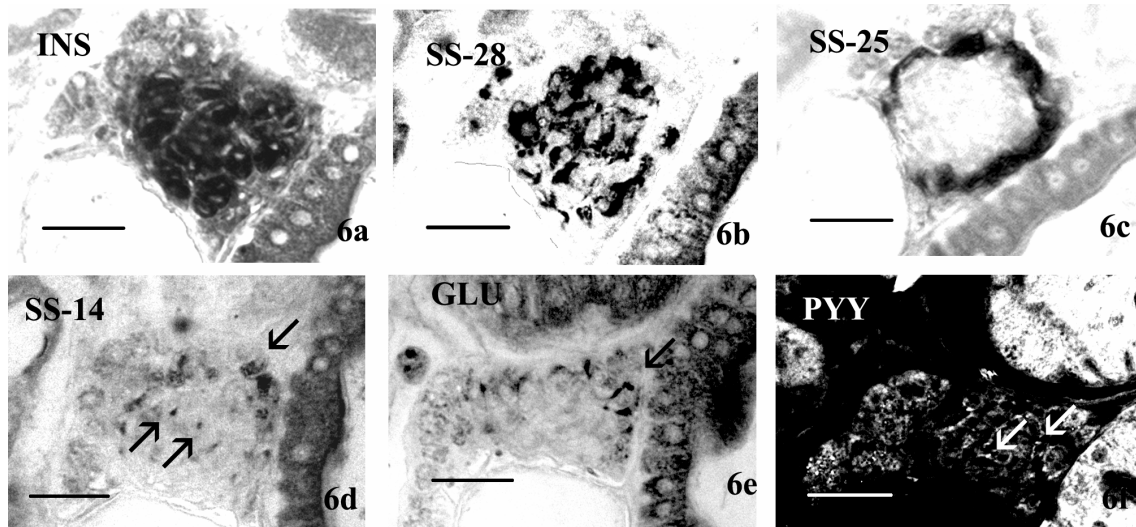


Fig. 6. Secciones consecutivas del islote único de larvas de 17 días. **6a.** Células con insulina (INS). **6b.** Células con somatostatina-28 (SS-28). **6c.** Células con somatostatina-25 (SS-25). **6d.** Células con somatostatina-14 (SS-14) (↗)(↘). **6e.** GLU (↘). **6f.** Obsérvese que las fibras nerviosas muestran inmunofluorescencia –TRICT a PYY (↘). **6a-e.** Técnica PAP. x500.

Larvas de 24 y 25 días (4.7 a 4.9 mm de longitud)

Presentan un gran islote similar, en cuanto a situación y composición celular, al islote único descrito en las etapas anteriores (Figs. 7a-e). Además, aparecen algunos islotes pequeños y células aisladas o agrupadas en el área ventral del páncreas exocrino junto a los conductos pancreáticos. Estos islotes pequeños mostraron los mismos tipos celulares y una disposición celular similar al islote grande (Figs. 8a-d). Las células aisladas y las agrupadas mostraron coexistencia de inmunorreactividad a INS y SS-25 (Figs. 9a-c), INS, SS-25 y SS-28 (Figs. 9d-f) e inmunorreactividades a INS, SS 25 y SS-14 (Figs. 9g-i).

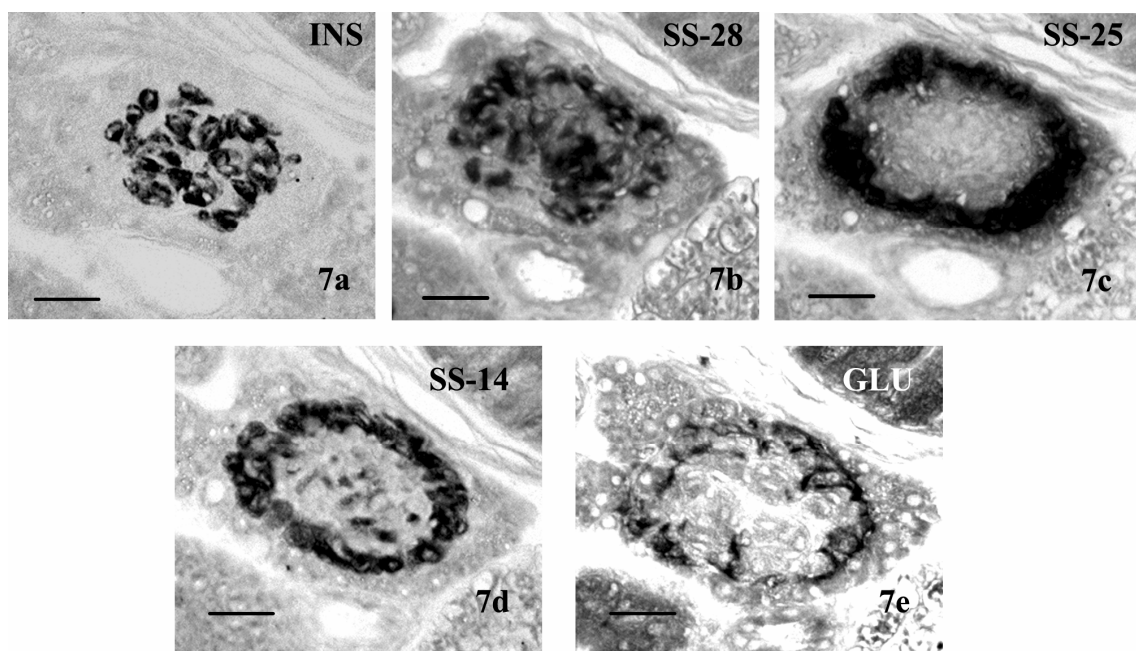


Fig. 7. Secciones consecutivas de un islote grande en larvas de 24 días. **7a.** Células con insulina (INS). **7b.** Células con somatostatina-28 (SS-28). **7c.** Células con somatostatina-25 (SS-25). **7d.** Células con somatostatina-14 (SS-14). **7e.** Células con glucagón (GLU). Técnica PAP. x1000.

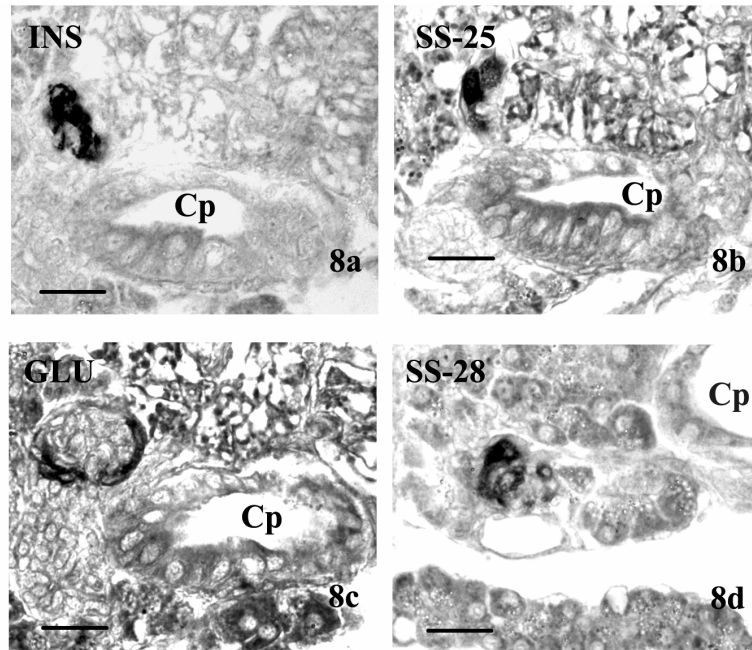


Fig. 8. Secciones consecutivas de un islote pequeño en larvas de 24 días mostrando la misma composición celular que el islote grande. **8a.** Células inmunorreactivas a insulina (INS). **8b.** Células inmunorreactivas a somatostatina-25 (SS-25). **8c.** Células inmunorreactivas a glucagón (GLU). **8d.** Células inmunorreactivas a somatostatina-28 (SS-28). Conducto pancreático (Cp). Técnica PAP. x1000.

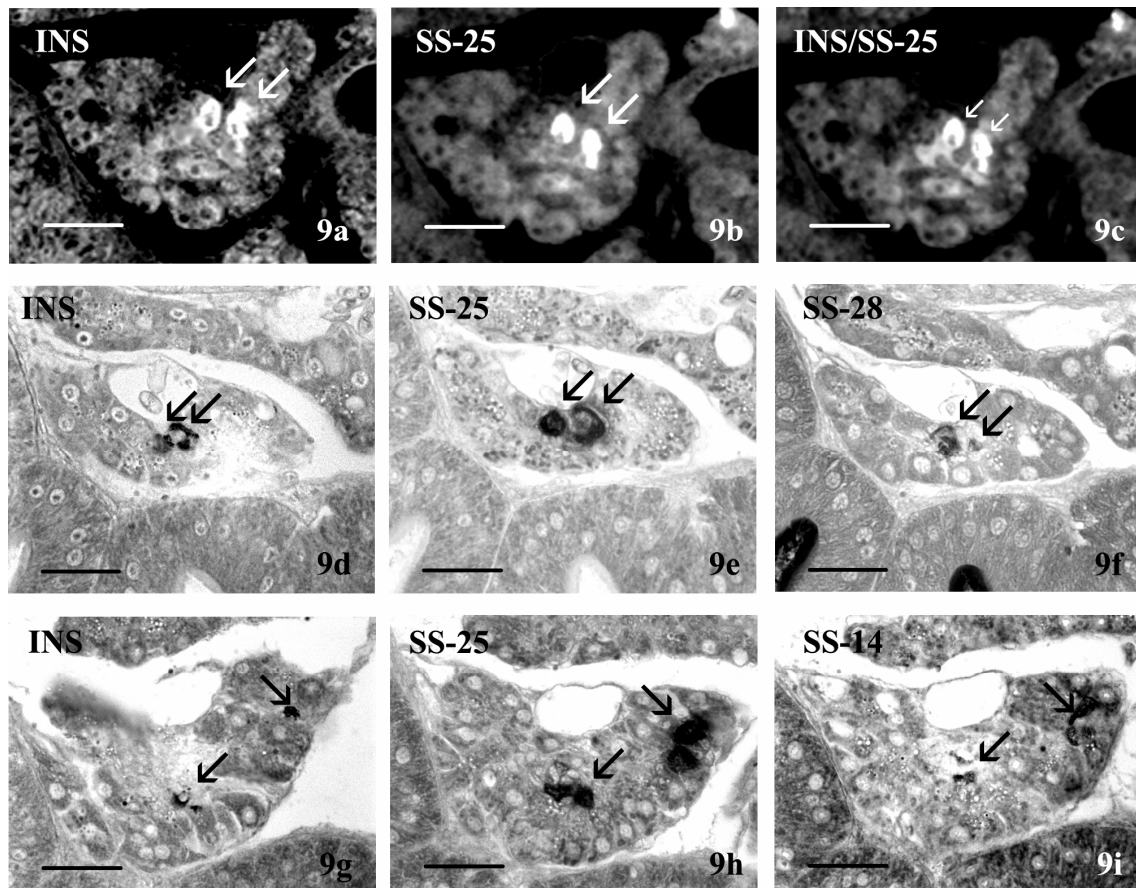


Fig. 9. Células agrupadas en larvas de 24 días. Una única sección de las células agrupadas muestra la coexistencia de inmunorreactividades a: **9a.** Insulina (INS) (fluorescencia-FITC) (↙). **9b.** Somatostatina-25 (SS-25) (fluorescencia-TRITC) (↙). **9c.** Fotografía de doble fluorescencia mostrando coexistencia completa de INS y SS-25 (↙). Secciones consecutivas inmunoteñidas con PAP mostrando coexistencia de inmunorreactividades a: **9d y g** INS (↙)(↘). **9e y h.** SS-25 (↙)(↘). **9f.** SS-28 (↙). **9i.** SS-14(↙). x1200.

Larvas de 30 a 44 días (5 a 9 mm de longitud)

El islote grande aumenta de tamaño y adopta una forma triangular. Las células con INS y con SS-14/SS-28 se observan en la región central (Figs. 10a y b), las células con SS-25 y GLU/GLP-1 se localizan en la periferia (Figs. 10c-f). También se han detectado fibras nerviosas inmunorreactivas a PYY. En esta etapa, no hay coexistencia de inmunorreactividades a INS y SS y mientras disminuye el número de células agrupadas y aumenta el número de pequeños islotes. Los islotes pequeños están compuestos de células con INS y de células con SS-28 en el área central (Figs. 11a y c), de células con SS-25 en la periferia (Fig. 11b) y de células SS-14 (que no se muestran) y con GLU/GLP-1 en las áreas periférica y central (Fig. 11d). Coexistencia a inmunorreactividades de GLU/GLP-1 y NPY se observan en unas pocas células de la periferia de algunos islotes pequeños (Figs. 11d y e).

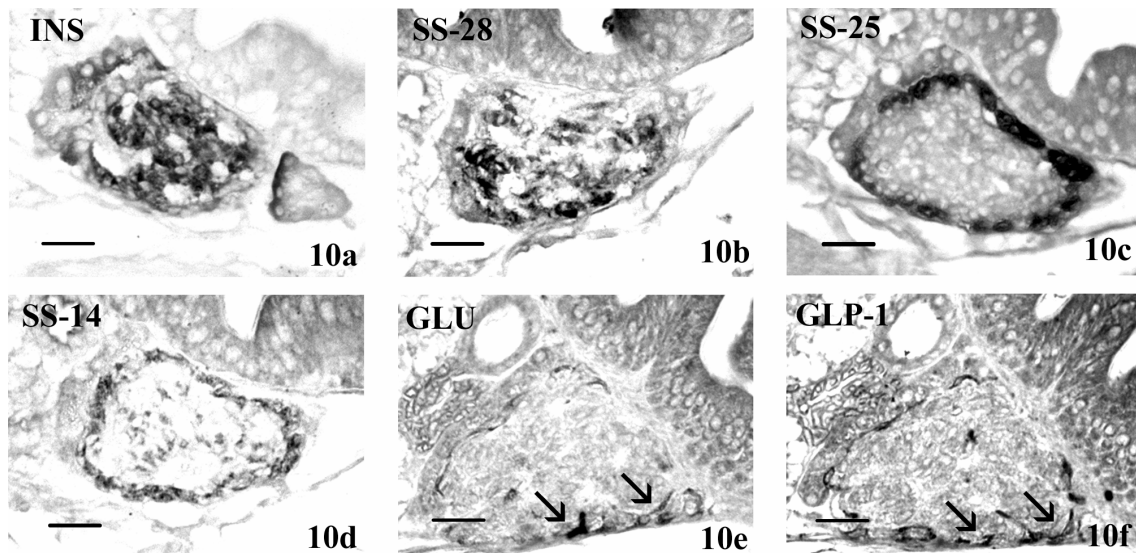


Fig. 10. Secciones longitudinales consecutivas de islote grande en larvas de 30 días. **10a.** Células con insulina (INS). **10b.** Células con somatostatina-28 (SS-28). **10c.** Células con somatostatina-25 (SS-25). **10d.** Células con somatostatina-14 (SS-14). **10e.** Células con glucagón (GLU). **10f.** Células con péptido similar al glucagón-1 (GLP-1). Las flechas señalan el perfil de las mismas células (↗). Técnica PAP. x400.

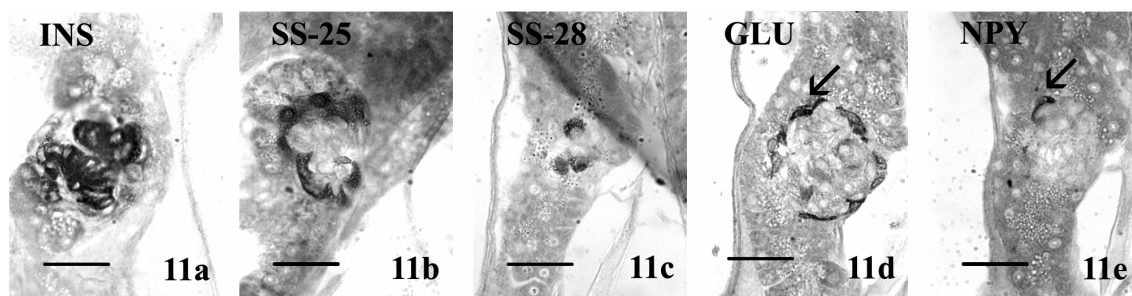


Fig. 11. Secciones longitudinales consecutivas de un islote pequeño en larvas de 37 días. **11a.** Células con insulina (INS). **11b.** Células con somatostatina-25 (SS-25). **11c.** Células con somatostatina-28 (SS-28). **11d.** Células con glucagón (GLU). **11e.** Células con neuropéptido tirosina (NPY). Las flechas señalan el perfil de las mismas células (✓). Técnica PAP. x1000.

Larvas de 51 días a juveniles de 114 días (9.13 a 18.8 mm de longitud)

Desde 51 días en adelante se encuentra un islote principal, varios islotes intermedios y numerosos islotes pequeños (Figs. 13a-h). El islote principal se localiza junto a la vesícula biliar, mientras que el resto de los islotes aparecen dispersos en el seno del páncreas exocrino. Se observa por primera vez inmunoreactividad a PYY en larvas de 51 días. No se observaron células que muestren inmunorreactividad sólo a NPY o a PYY. El islote principal muestra los mismos tipos celulares y fibras nerviosas como en etapas precedentes (Figs. 12a-h) además de unas pocas células en una pequeña área periférica en la que la inmunorreactividad a PYY se encuentra colocalizada con las inmunorreactividades a NPY, GLU y GLP-1 (Figs. 12e-h). Algunos islotes intermedios mostraron la misma disposición y composición que en el islote principal. La coexistencia total de las inmunorreactividades a GLU, GLP-1, PYY y NPY fue observada en la región externa de los islotes intermedios restantes e islotes pequeños (Figs. 13e-h), en los cuales no fueron observadas células que mostrasen sólo inmunorreactividades a GLU/GLP-1.

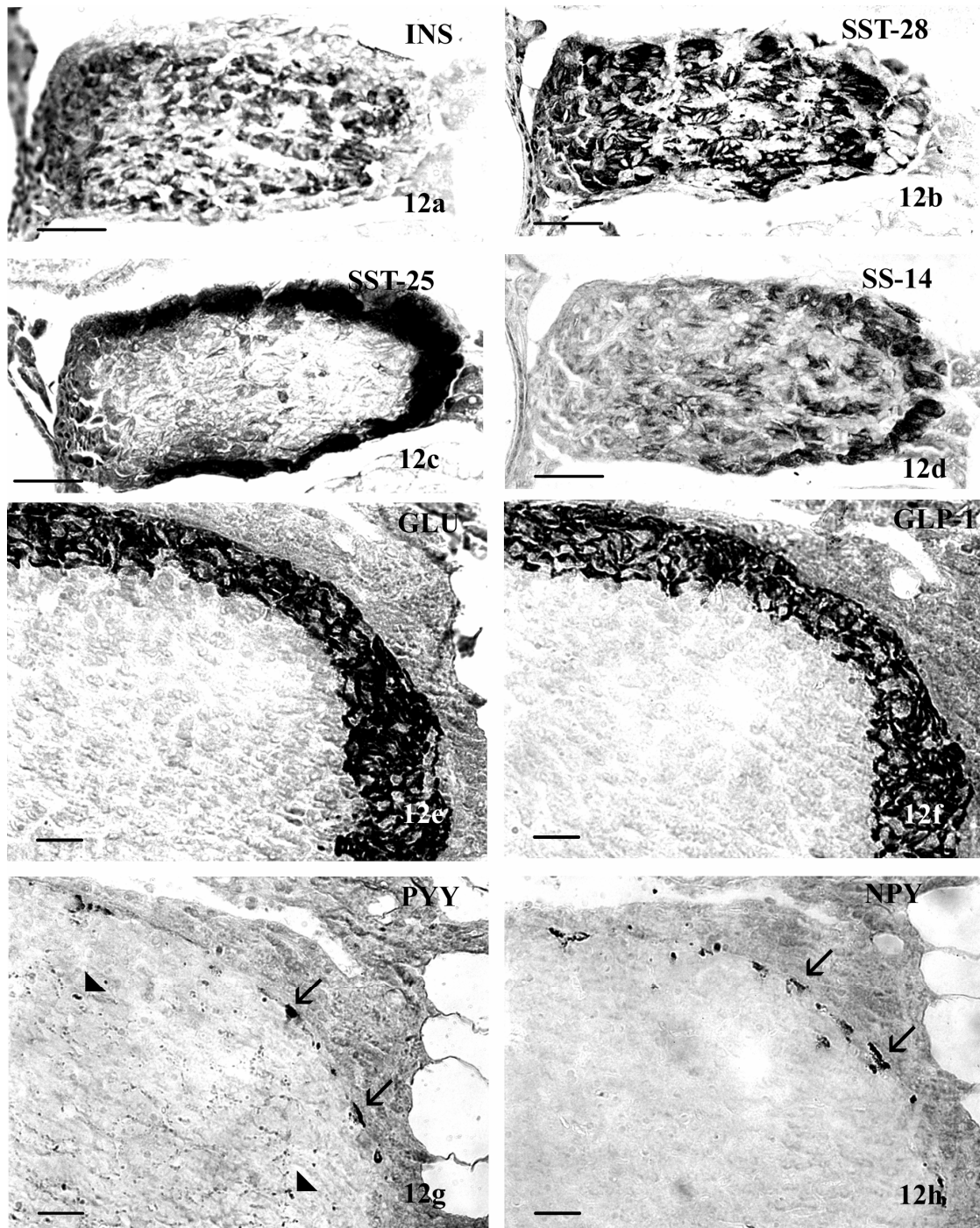


Fig. 12. Secciones longitudinales consecutivas de un islote principal de larvas de 51 días mostrando células inmunorreactivas. **12a.** Células con insulina (INS). **12b.** Células con somatostatina-28 (SS-28). **12c.** Células con somatostatina-25 (SS-25). **12d.** Células con con somatostatina-14 (SS-14). Detalle de la periferia del islote grande mostrando coexistencia de inmunorreactividad a GLU/GLP-1 y NPY. **12e.** Células inmunorreactivas al péptido similar al glucagón-1 (GLP-1). **12f.** Células con glucagón (GLU). **12g.** Células con péptido tirosina-tirosina (PYY). **12h.** Células con neuropéptido tirosina (NPY). Fibras nerviosas PYY inmunoteñidas (▲). Las flechas señalan contornos celulares idénticos (↖). Técnica PAP. **a-d** x600; **e-h** x400.

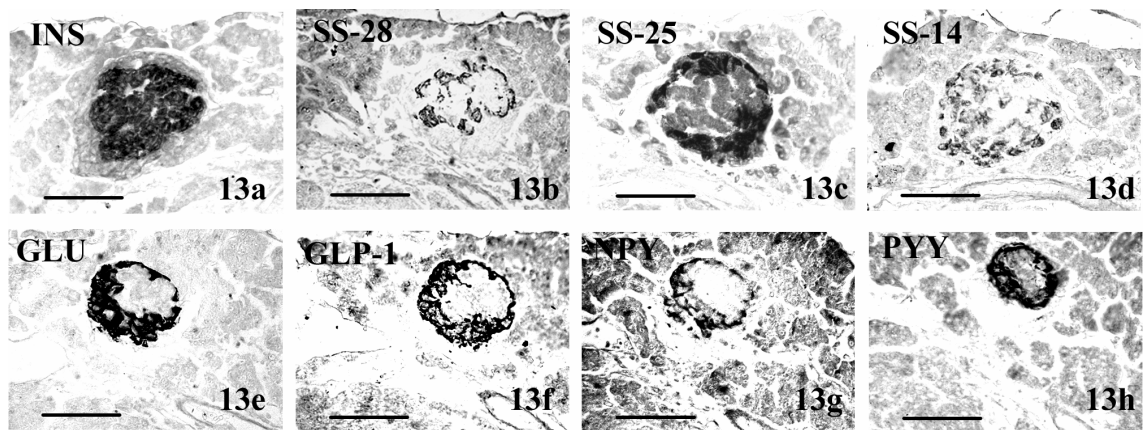


Fig. 13. Secciones consecutivas de un islote pequeño de un espécimen juvenil de dorada de 105 días. **13a.** Células con insulina (INS). **13b.** Células con somatostatina-28 (SS-28). **13c.** Células con somatostatina-25 (SS-25). **13d.** Células con somatostatina-14 (SS-14). Se observa la completa coexistencia de inmunorreactividad entre: **13e.** Células con glucagón (GLU). **13f.** Células con péptido similar al glucagón-1 (GLP-1). **13g.** Células con neuropéptido tirosina (NPY). **13h.** Células con péptido tirosina-tirosina (PYY). Técnica PAP. x600.

4.2 ESTUDIO MICROSCÓPICO ELECTRÓNICO

El estudio microscópico electrónico confirma los resultados obtenidos en el estudio microscópico óptico, en cuanto al momento de aparición y distribución de los diferentes tipos de células endocrinas en los islotes pancreáticos.

Larvas recientemente eclosionadas

Debajo del epitelio de la zona media de la pared dorsal del tracto digestivo, aparece un cordón de células (cordón primordial) formado por células indiferenciadas y células endocrinas que se caracterizan por presentar gránulos de secreción (Fig.1).

Células indiferenciadas

Las células indiferenciadas son de forma ovoidea o triangular y de aspecto más electronodenso que las células endocrinas debido a la presencia de gran cantidad de ribosomas libres y polirribosomas (Fig. 1). El núcleo es grande, ovoideo con ligeras indentaciones, eucromatínico con pequeños grumos de heterocromatina adyacentes a la envoltura nuclear y contiene 1 ó 2 nucléolos (Figs. 1 y 2). Se observan abundantes mitocondrias redondeadas, filamentosas y ramificadas con matriz clara y crestas tubulares, cisternas estrechas y cortas de retículo endoplásmico rugoso (rer) dispersas por todo el citoplasma (Figs. 1 y 2), así como un complejo de Golgi, en cuyas proximidades se encuentran vesículas cubiertas, cuerpos multivesiculares y vesículas redondeadas con contenido de mediana electronodensidad que pueden corresponder a endosomas (Fig. 3a). En algunas células, aparecen cuerpos basales, localizados junto a la membrana plasmática (Figs. 3 y 3b) y estructuras de unión. Se pueden observar figuras de mitosis (Fig. 2).

Células endocrinas

Las secciones de células endocrinas localizadas en la parte basal del cordón primordial (Figs. 1 y 4), son de forma piriforme o triangular (Fig. 4). Las que ocupan la posición central del cordón primordial son redondeadas (Fig. 5). Se caracterizan por presentar un núcleo eucromatínico ovoideo, de contorno ondulado y con indentaciones que en algunos casos pueden ser muy profundas y un nucléolo excéntrico (Figs. 4 y 5).

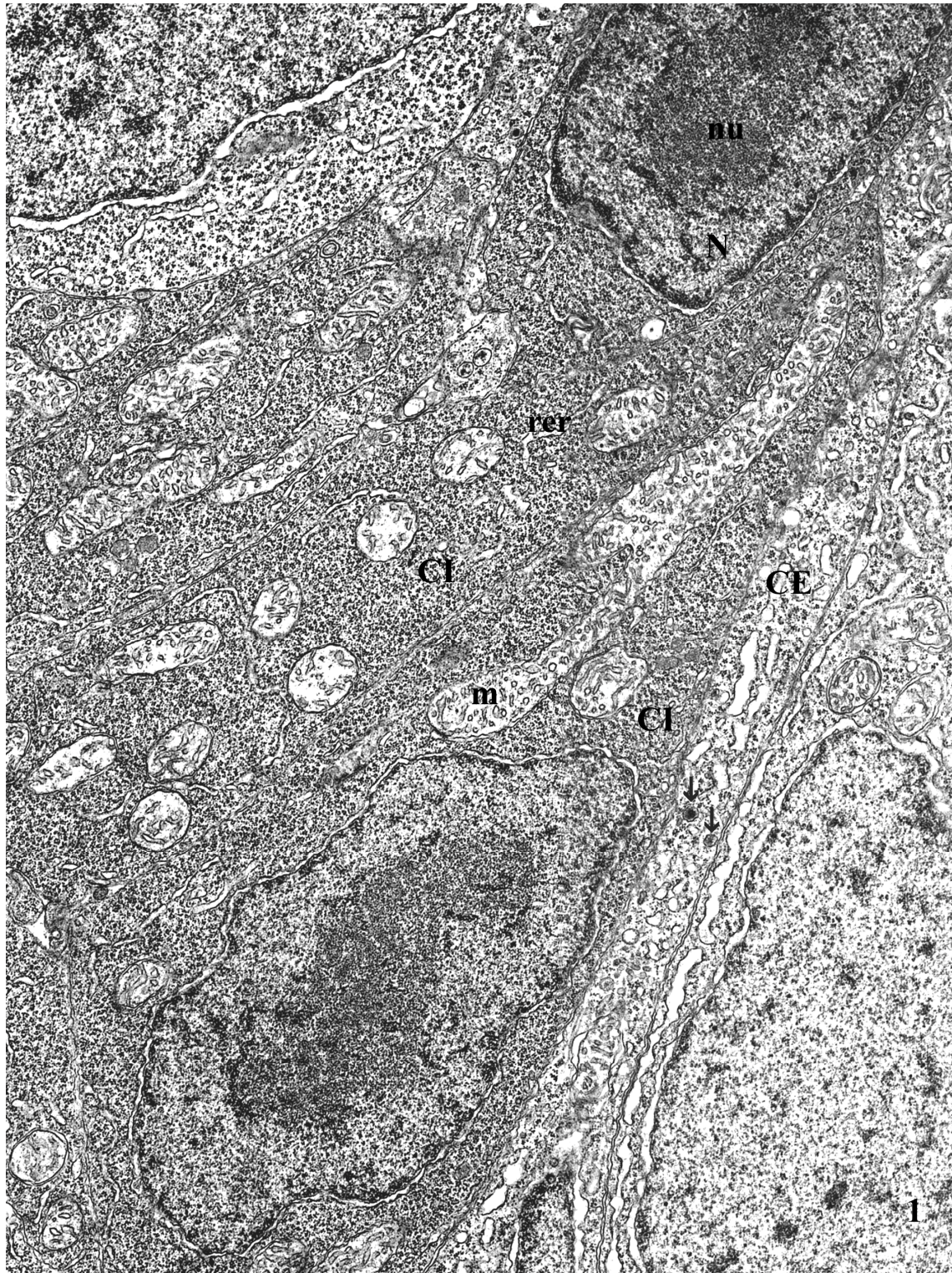


Fig.1. Vista general de células del cordón primordial. Células indiferenciadas (CI) con núcleo (N) eucromatínico y un gran nucléolo (nu), numerosos ribosomas, algunas cisternas de retículo endoplasmático rugoso (rer) y mitocondrias (m). Célula endocrina (CE) alargada, más clara, con cisternas alargadas de retículo endoplasmático rugoso (rer) dilatado y pequeños gránulos de secreción (↓). x6200.

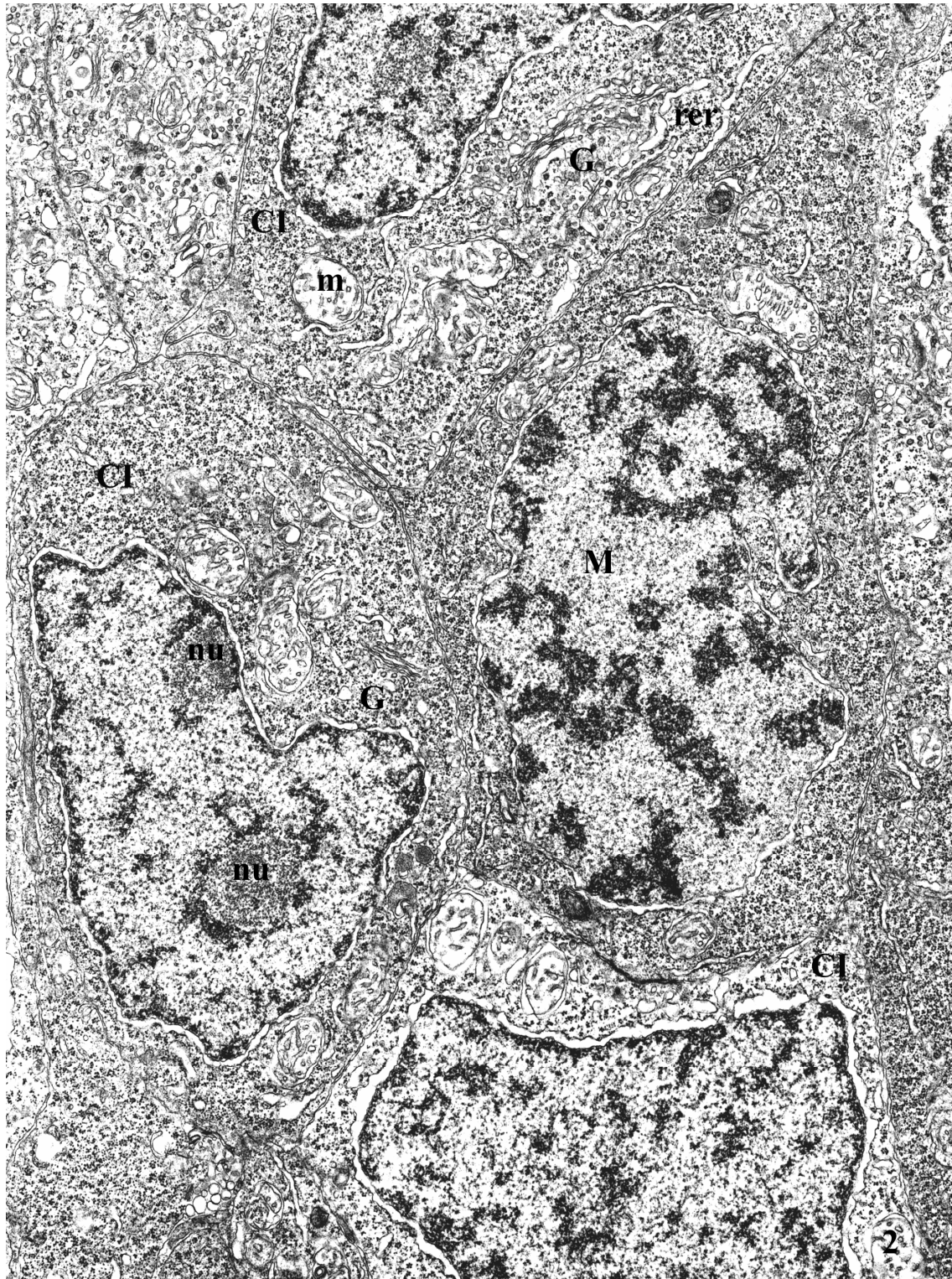


Fig. 2. Vista general de varias células indiferenciadas (CI). Se observan dos nucléolos (nu), mitocondrias (m), complejo de Golgi (G) y cisternas aisladas de retículo endoplasmático rugoso (rer). Células indiferenciadas en mitosis (M). x8000.

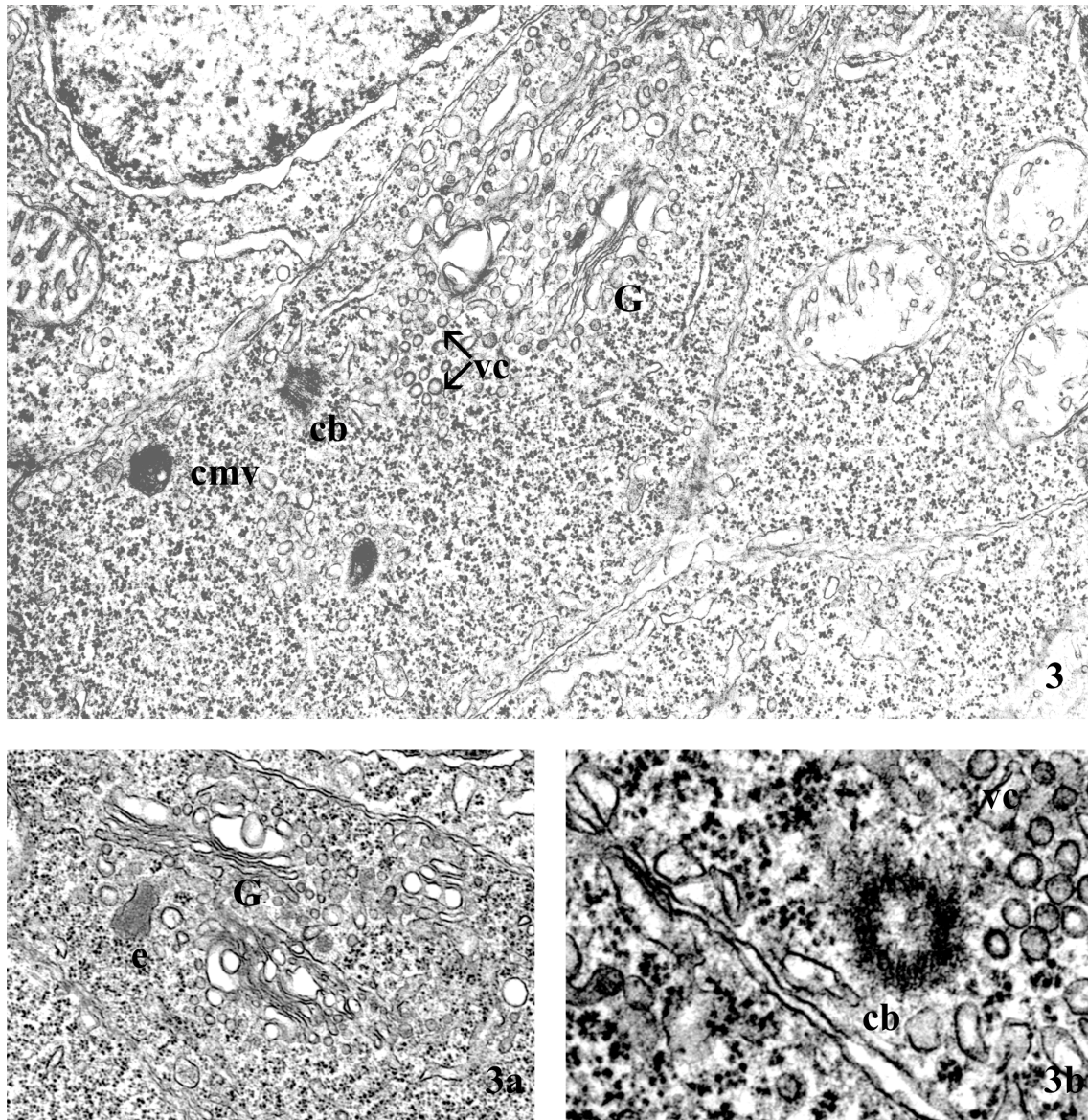


Fig. 3. Detalles de células indiferenciadas donde se pueden apreciar numerosos ribosomas, un corpúsculo basal (cb), complejo de Golgi (G), cuerpos multivesiculares (cmv), y vesículas cubiertas (vc). **3a.** Complejo de Golgi (G) y endosoma (e). **3b.** Corpúsculo basal (cb). 3 x13200; a x16000; c x33440.

En el citoplasma existen abundantes polirribosomas, microtúbulos, mitocondrias redondeadas o filamentosas con crestas tubulares y matriz clara, las cuales están dispersas en el citoplasma o agrupadas en la periferia celular (Figs. 4 y 5), algunas de ellas presentan una constricción central y posiblemente se encuentran en proceso de división (Fig. 7c). El retículo endoplásmico está formado por largas cisternas aisladas y dilatadas con contorno festoneado, localizadas en la periferia celular o dispersas por el citoplasma (Figs. 4, 5 y 7).

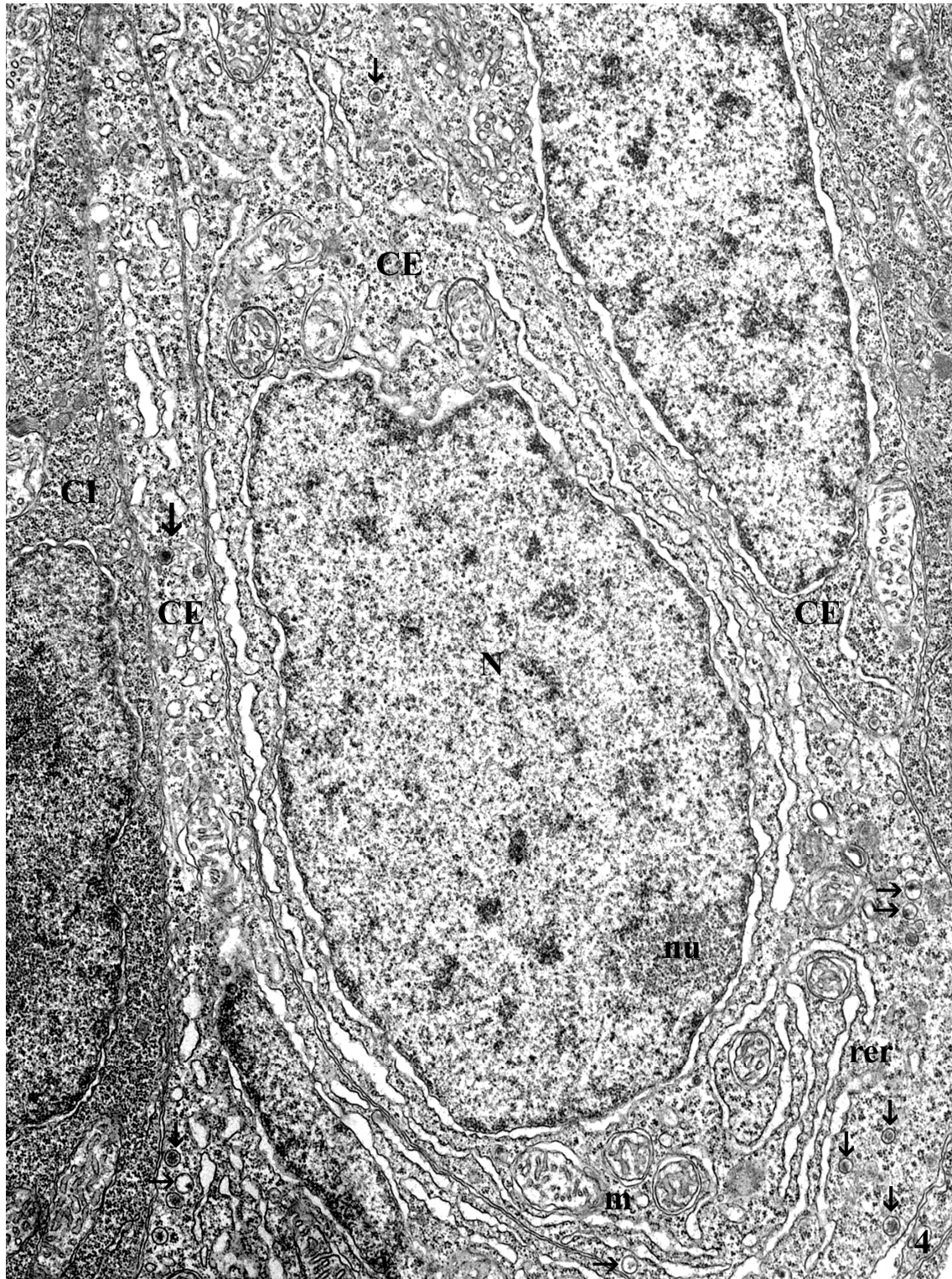


Fig. 4. Células endocrinas (CE) adyacentes a células indiferenciadas (CI). Obsérvense las cisternas dilatadas y aisladas de retículo endoplasmático rugoso (rer), núcleo (N) y nucléolo (nu) y los dos tipos de gránulos de secreción, unos con un contenido ligeramente electronodenso, poco condensado, que puede ocupar todo el gránulo o estar desplazado hacia la periferia (→) y otros con un contenido muy electronodenso central y un halo claro (↓). x6200.

Mitocondrias agrupadas, algunas de ellas en división (Figs. 5, 6, 7 y 7a), complejo de Golgi muy desarrollado, con numerosas cisternas en cuyos extremos se observa un material homogéneo medianamente electronodenso; en sus proximidades se localizan vesículas cubiertas (Fig. 6). Se observan lisosomas secundarios con un contenido heterogéneo (Fig. 6). Se pueden localizar densificaciones semejantes a desmosomas uniendo dos células vecinas, así como cuerpos basales y cilios intracitoplásmicos (Figs. 6a y b). También se observan túbulos estrechos, medianamente electronodensos, algo sinuosos, que están relacionados entre sí y que se podrían corresponder con endosomas, así como cuerpos multivesiculares con material granular similar a los centros densos de los gránulos de secreción (Fig. 7b) próximos a la membrana plasmática y microtúbulos.

Estas células presentan dos tipos de pequeños gránulos de secreción (Figs. 4-7). El primer tipo tiene un contenido ligeramente electronodenso, poco condensado, que puede ocupar todo el gránulo o estar desplazado hacia la periferia (Figs. 4, 6 y 7) y un tamaño entre 182 y 286 nm. Al utilizar la técnica de IgG-oro con anti-SS-25, estos gránulos quedan inmunomarcados en el contenido poco electronodenso del gránulo, ya sea central o excéntrico (Fig. 7c). El segundo tipo de gránulos se localizan en la periferia de la célula o en las proximidades del complejo de Golgi, tienen un contenido muy electronodenso central y un halo claro; su tamaño oscila entre 151 y 190 nm (Figs. 4, 5, 6, 7, 7a y 7b). Al utilizar la técnica de IgG-oro se comprueba que contienen INS y que el inmunomarcado queda en el contenido electronodenso central (Fig. 7d).

Las células endocrinas de esta etapa contienen los dos tipos de gránulos, aunque en cada célula predomina un tipo u otro (Figs. 4 y 7).

Frecuentemente se encuentran secciones transversales de prolongaciones celulares ocupadas completamente por gránulos de secreción semejantes a los descritos anteriormente, predominando los claros (Fig. 6b).

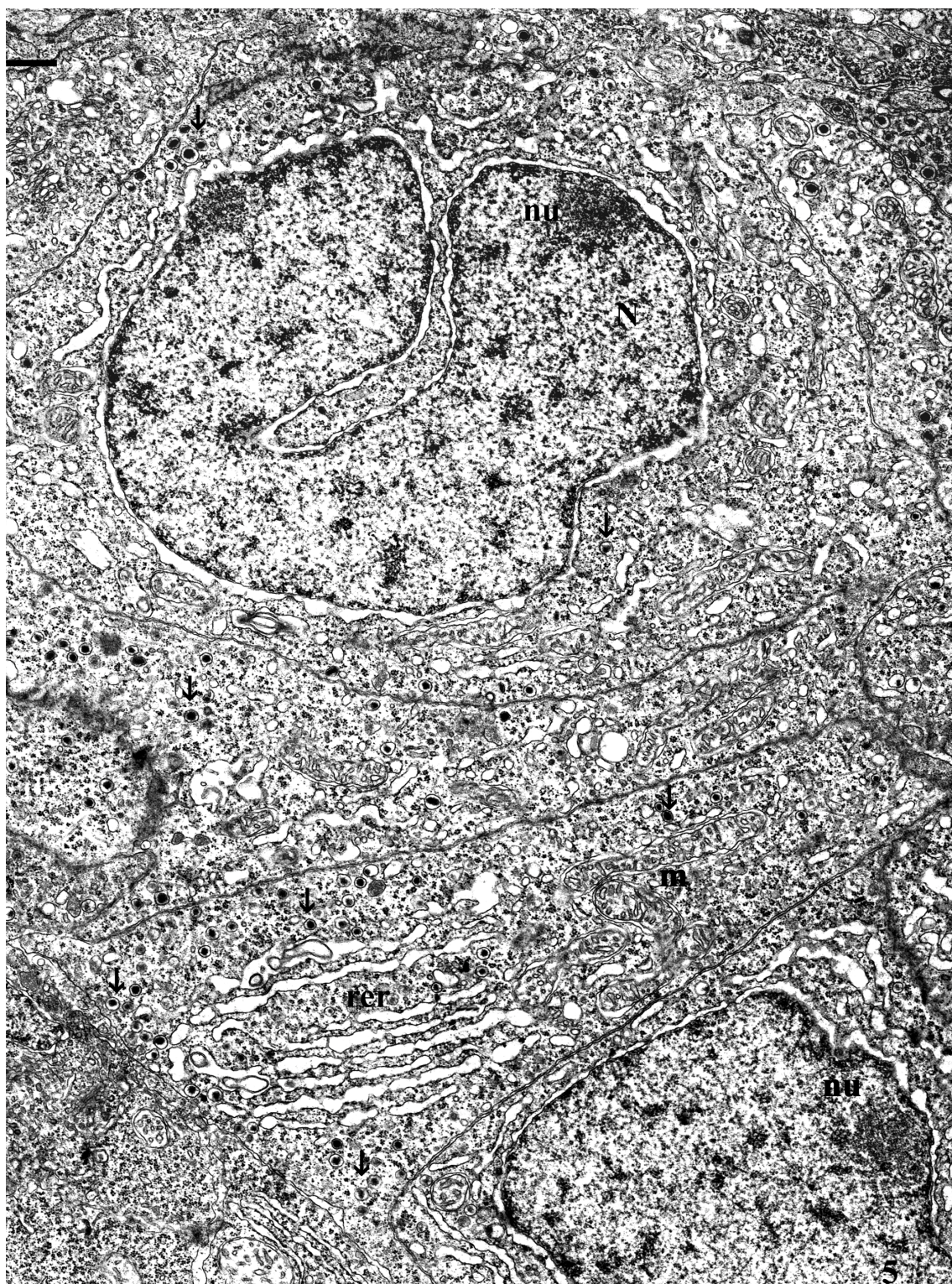


Fig. 5. Células endocrinas que ocupan una posición central en el cordón primordial. Núcleo (N) con indentaciones profundas y nucléolos (nu), cisternas apiladas de retículo endoplasmático rugoso (rer) festoneadas y dilatadas y mitocondrias (m). Obsérvese la presencia de numerosos gránulos de secreción de contenido central muy electronodenso (↓). x4136.

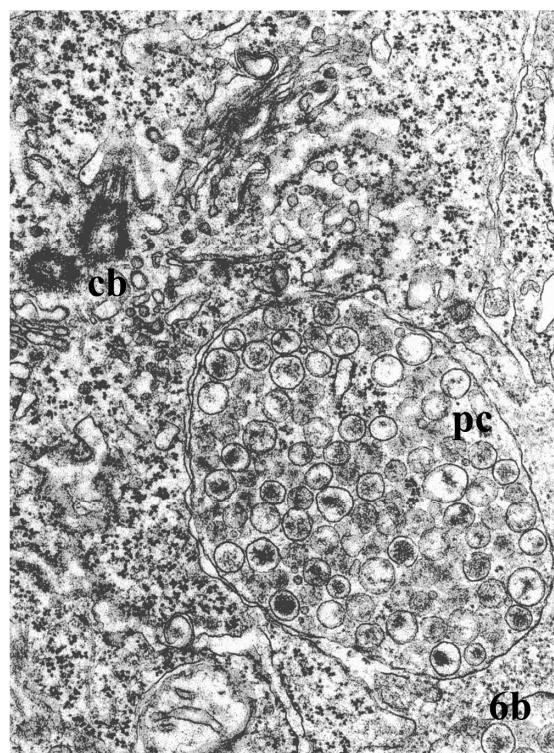
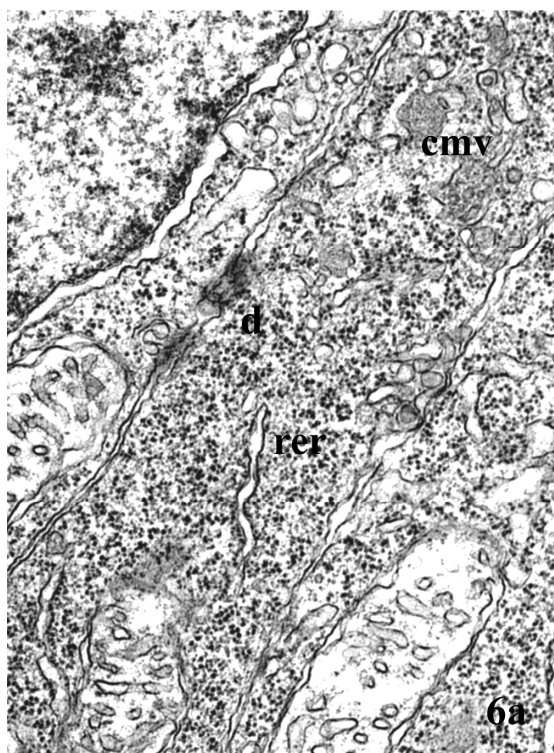
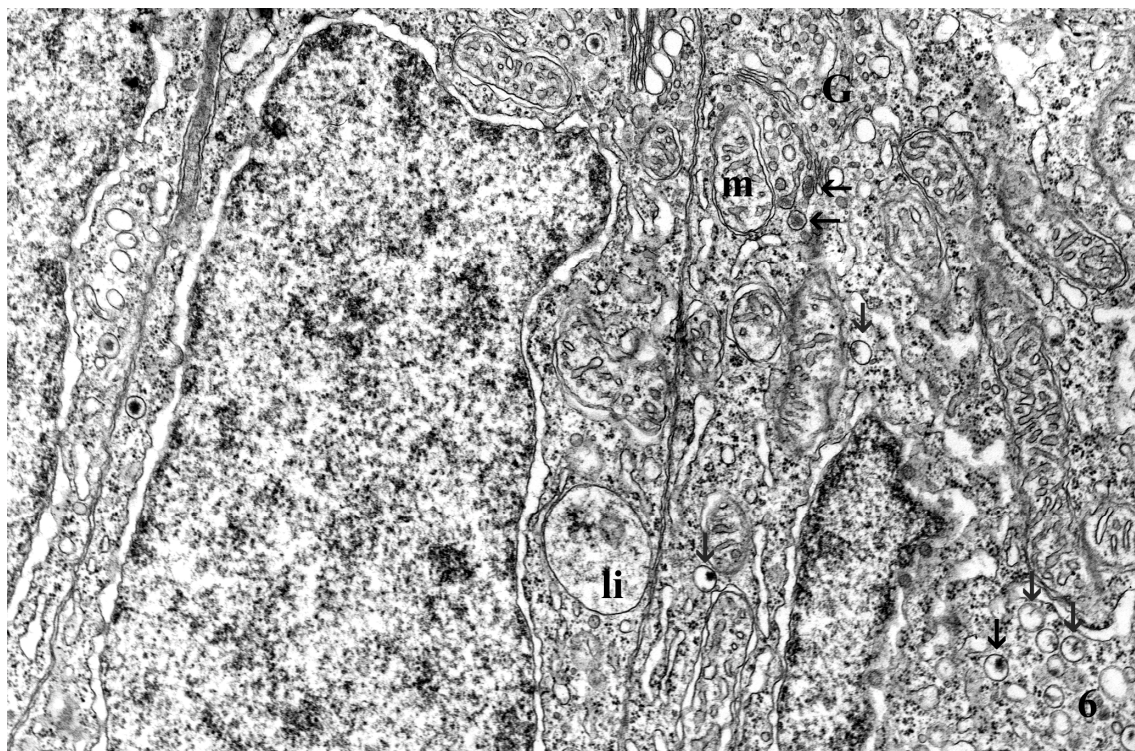


Fig. 6. Secciones de células endocrinas con mitocondrias (m) y lisosoma (li). Destacan los extremos dilatados y con material electronodenso en las cisternas del complejo de Golgi (G) y gránulos de secreción en sus proximidades (←), así como gránulos de contenido ligeramente electronodenso próximos al núcleo (↓). **6a.** Detalle de una célula endocrina con cuerpos multivesiculares (cmv), retículo endoplasmático rugoso (rer) y estructuras de unión entre células vecinas similares a desmosomas (d). **6b.** Prolongación celular (pc) ocupada por gránulos de secreción rodeada por una célula endocrina con un corpúsculo basal (cb) y un cilio intracelular. **6** x11200; **a** x20625; **b** x14320.

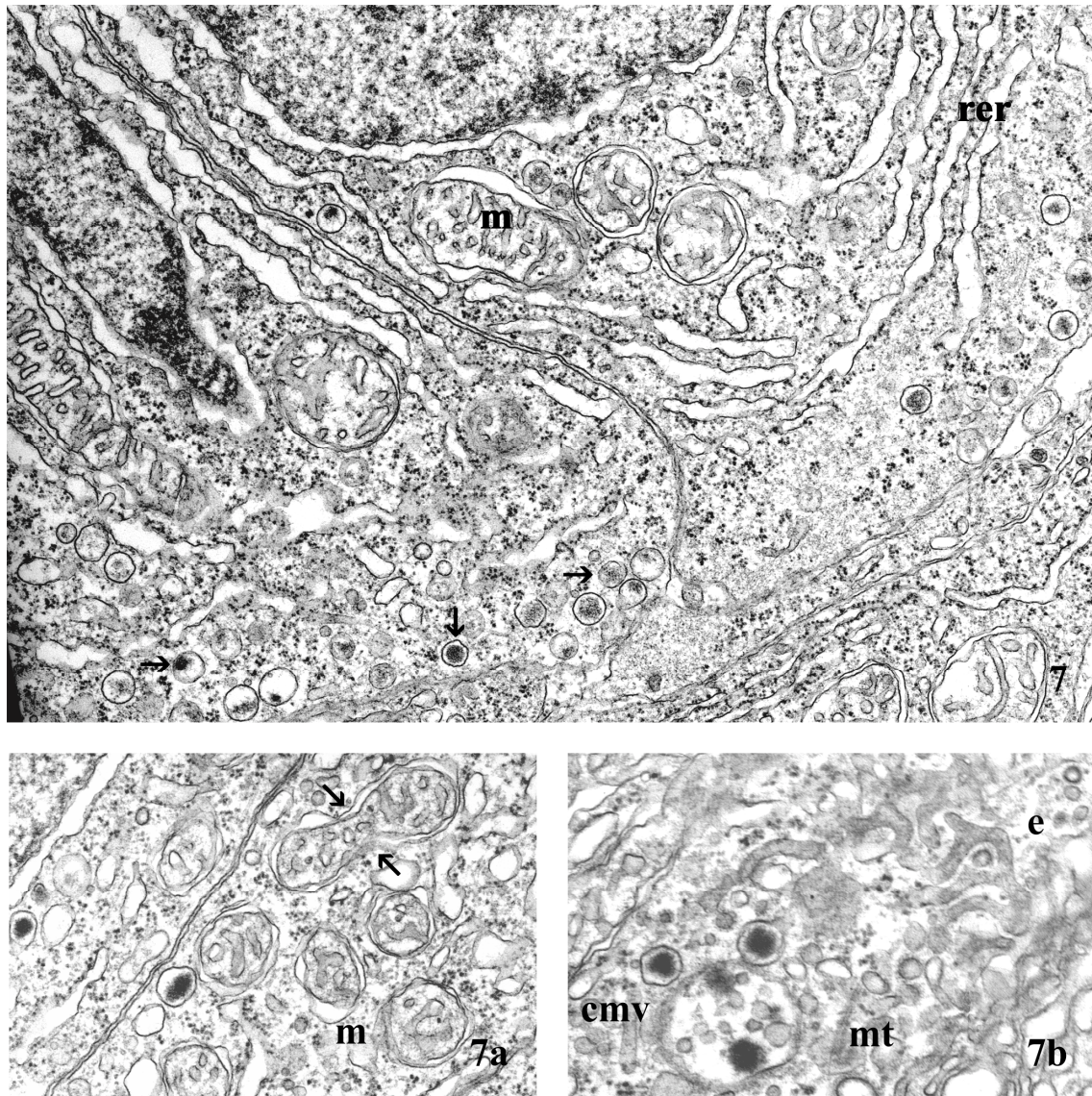
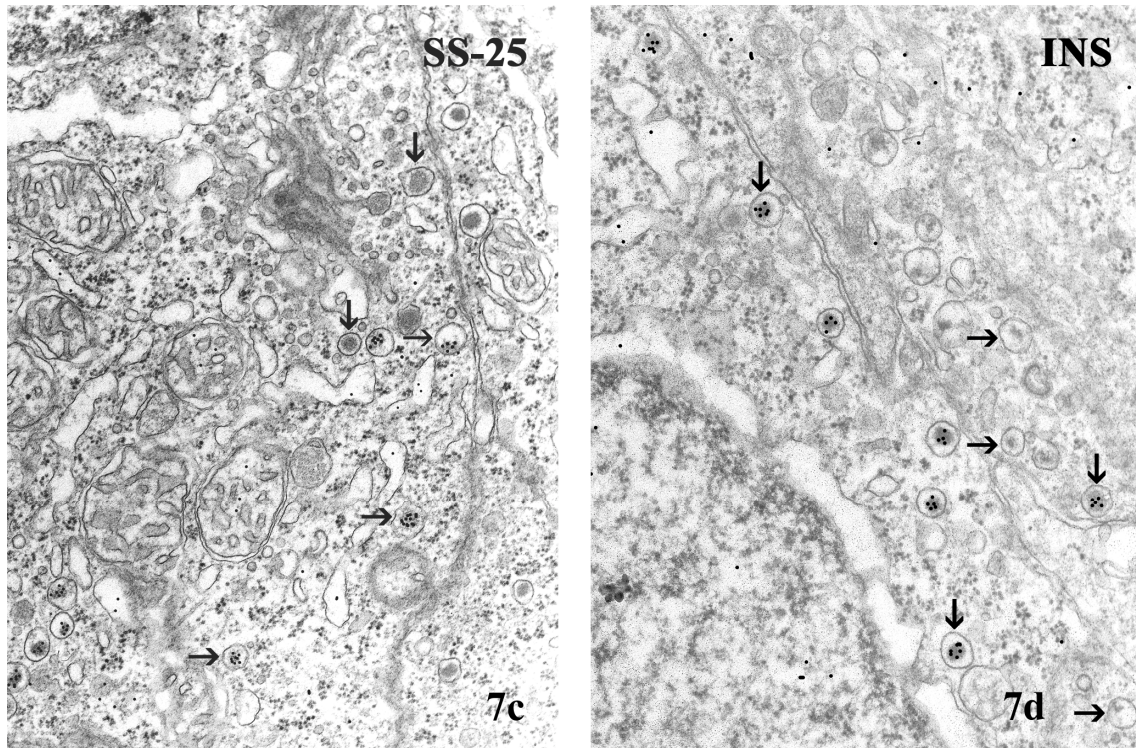


Fig. 7. Células endocrinas con abundantes mitocondrias (m), cisternas aisladas, dilatadas y apiladas de retículo endoplasmático rugoso (rer) y dos tipos de gránulos de secreción en la misma célula, unos con un contenido muy electronodenso central y halo claro (↓) y otros con un contenido ligeramente electronodenso, poco condensado, que puede ocupar todo el gránulo o estar desplazado hacia la periferia (←). **7a.** Mitocondrias (m), algunas con una estrangulación (↘↙) que podría indicar división. **7b.** Cuerpo multivesicular (cmv) con un material muy electronodenso similar al contenido granular y dos gránulos de secreción próximos a él y microtúbulos (mt). Se advierten sinuosos túbulos estrechos relacionados entre sí que forman los endosomas (e). 7 x12300; a x14200; b x16000.



7c. Detalle de una célula endocrina inmunorreactiva a SS-25 (técnica IgG-oro) (SS-25), en los que se muestran gránulos de secreción con su contenido marcado con partículas de oro (←) y otros no marcados (↓). **7d.** Detalle de una célula endocrina inmunorreactiva a INS (técnica IgG-oro) (INS), en los que se muestran gránulos de secreción con su contenido marcado con partículas de oro (↓) y otros no marcados (→). **7c** y **d** x16000.

Larvas de 1 día

En esta etapa las células endocrinas pancreáticas forman una pequeña agrupación (islote primordial), rodeado por células indiferenciadas (Fig. 8).

Las células indiferenciadas presentan características similares a las de la etapa anterior: núcleo central ovoideo y eucromatínico con un gran nucléolo, numerosos ribosomas y grandes mitocondrias, presentan citolisosomas (Fig. 8). Se observan en esta etapa células en división.

Las células endocrinas son de dos tipos que están diferenciados por su electronodensidad, que se debe al número de ribosomas, con abundantes polirribosomas en las células de mayor electronodensidad y más escasos en las de menos electronodensidad, siendo otros orgánulos y los tipos de gránulos de secreción similares aunque en diferente número (Figs. 8 y 9).

Los dos tipos celulares poseen un gran núcleo central de contorno irregular y envoltura nuclear dilatada, algunos en forma de S, con un nucléolo excéntrico (Fig. 9). Se observan cortas cisternas de rer aisladas y dilatadas pero de manera irregular, dispersas y a veces ramificadas (Figs. 8, 9 y 11c). Grandes mitocondrias redondeadas o filamentosas con crestas transversales, pudiéndose encontrar agrupadas y próximas a la envoltura nuclear y rodeadas y en relación con cisternas de rer (Figs. 9 y 10). El complejo de Golgi está formado por varios dictiosomas con cisternas estrechas y apiladas a veces muy replegadas sobre sí mismas (Fig. 10), en sus proximidades existen lisosomas (Figs. 9, 10a y 10b), numerosas vesículas cubiertas y cuerpos multivesiculares, en el interior de los cuales se observa un material electrodensito semejante al contenido de algunos gránulos de secreción (Figs. 10 y 11c). También se pueden encontrar endosomas alargados que contienen un material homogéneo de mediana electronodensidad, junto a la membrana plasmática (Fig. 11), cuerpos basales (Fig. 10 y 10c) y en ocasiones alguna estructura ciliar (Fig. 10c). Entre dos células adyacentes se han observado estructuras de unión tipo desmosoma (Fig. 10c).

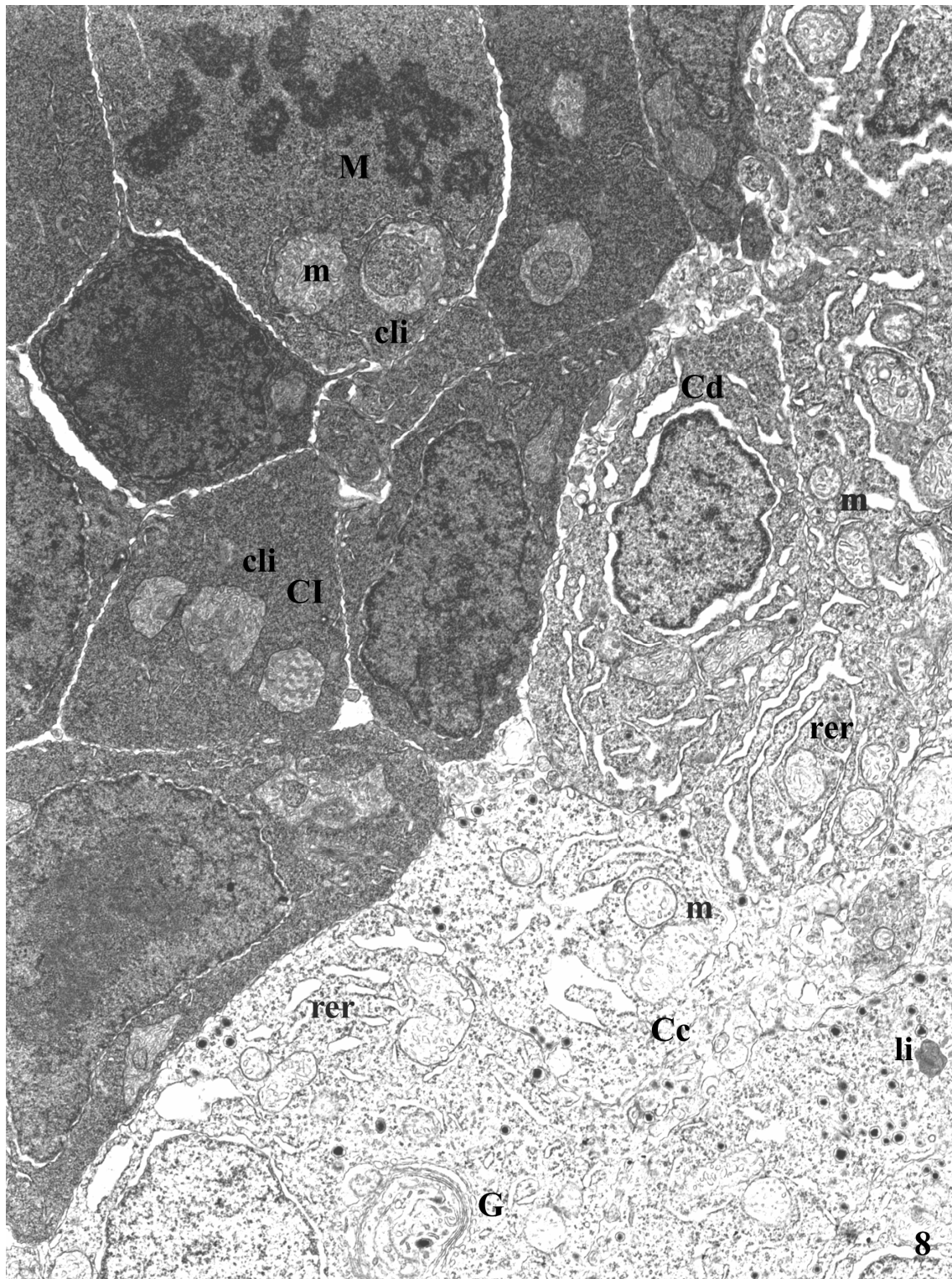


Fig. 8. Vista general del islote primordial. Células indiferenciadas (CI), algunas se encuentran en mitosis (M), destacan las mitocondrias (m) y los citolisomas (cli). Células endocrinas densas (Cd) y células endocrinas claras (Cc). Observándose, en los dos tipos celulares retículo endoplasmático rugoso (rer), mitocondrias (m) y gránulos de secreción (↓). En las células claras se observa además complejo de Golgi (G) y lisosomas (li). x6925.

En ambos tipos celulares existen dos tipos de gránulos de secreción (Figs. 9, 10a y 11a-e), unos con un contenido finamente granular de mediana electronodensidad y un tamaño que oscila entre 141 a 174 nm (Figs. 9 y 11a), estos gránulos quedan marcados con la técnica de IgG-oro para anti-SS-25, depositándose las partículas de oro en el contenido del gránulo, sea central o excéntrico (Fig. 10e), y otros con un centro muy electronodenso rodeado por un estrecho halo claro (154 a 167 nm) (Figs. 9, 10a y 11b) que quedan marcados con oro aplicando la técnica de IgG-oro para anti-INS, depositándose el oro en el contenido central (Fig. 10d). Tanto unos como otros tienden a agruparse, aunque se pueden encontrar los dos tipos de gránulos en todas las células (Figs. 10d-e). La distribución de estos gránulos de secreción es diferente; en las células más electronodensas son más abundantes los gránulos de secreción con un contenido granular de electronodensidad media y en las células de menor electronodensidad los gránulos más abundantes son los más electronodensos rodeados por un halo claro (Figs. 9 y 11a).

La envoltura de algunos gránulos de secreción se prolonga a veces en forma de gancho (Figs. 11c-e).

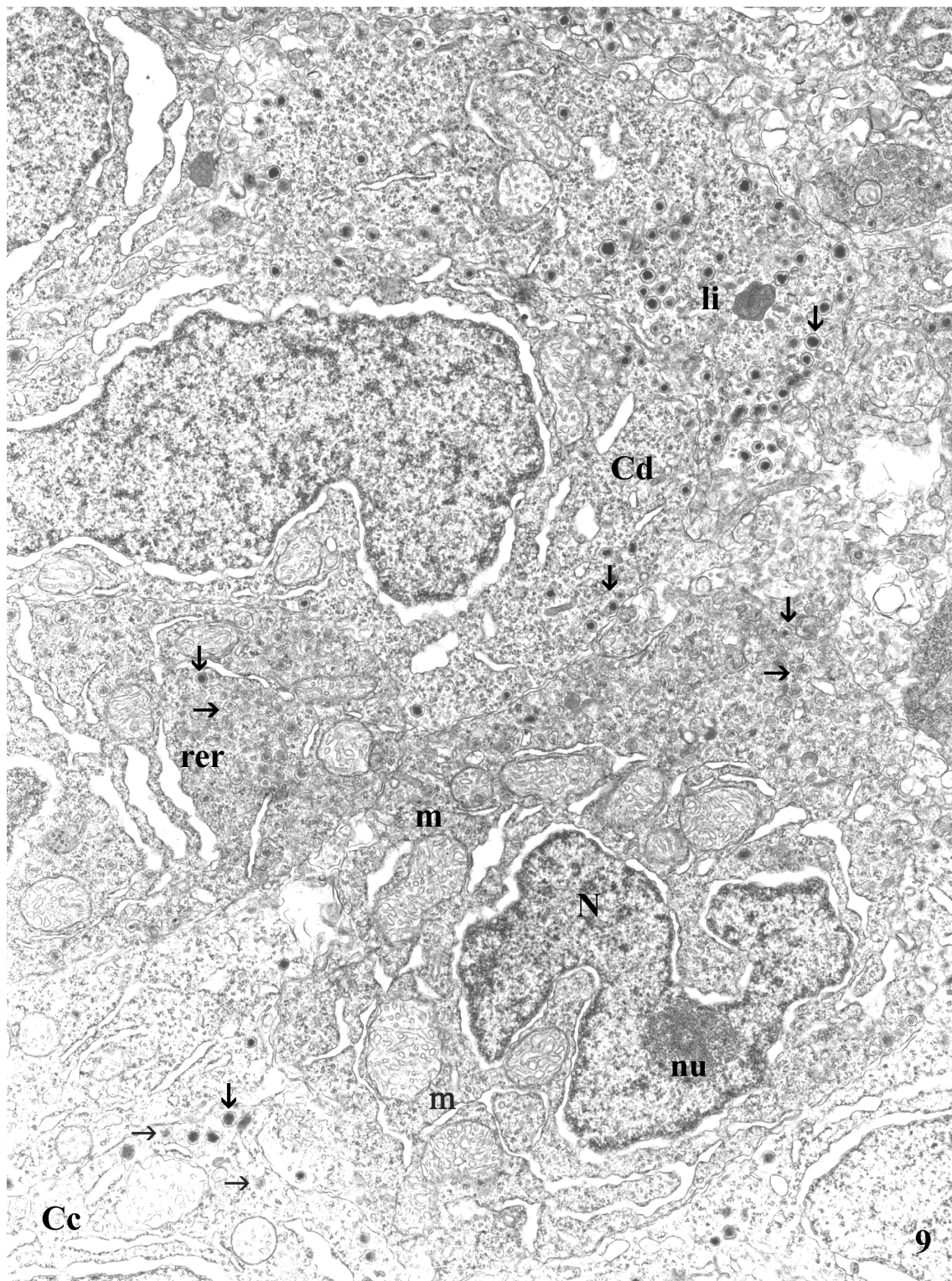


Fig. 9. Células endocrinas claras (Cc) y densas (Cd) con núcleo (N) en forma de S y nucléolo (nu) excéntrico, mitocondrias (m), retículo endoplasmático rugoso (rer), un lisosoma (li) y dos tipos diferentes de gránulos de secreción, los que tienen un contenido central fuertemente electronodenso (↓) y los que tienen un contenido de electronodensidad baja o media; central o excéntrico (→) y que se encuentran en la misma célula. x8250.

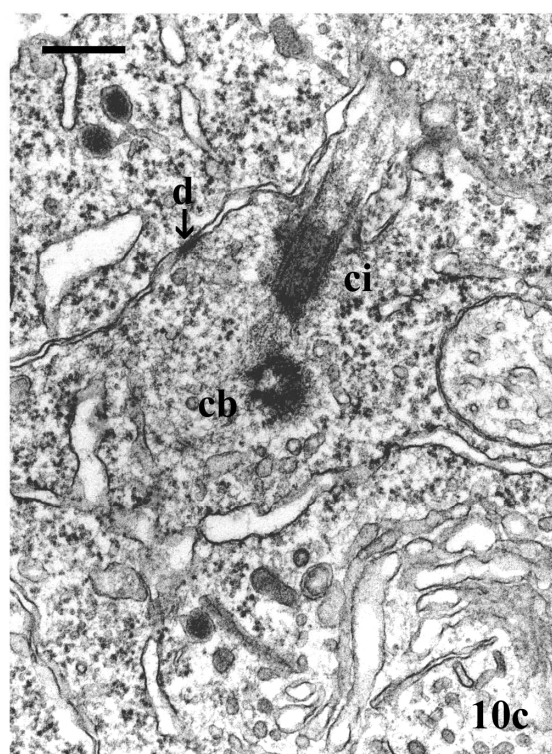
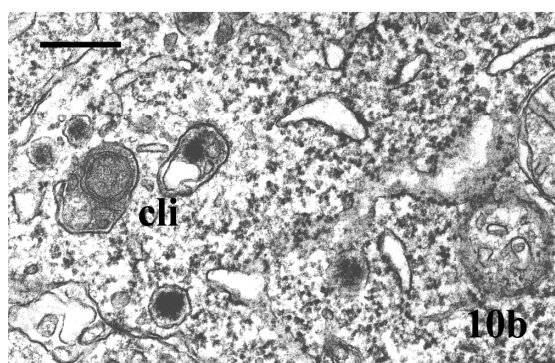
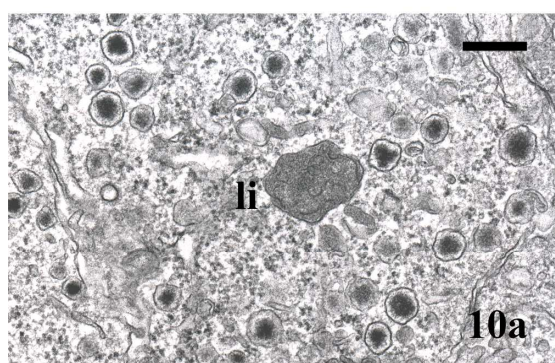
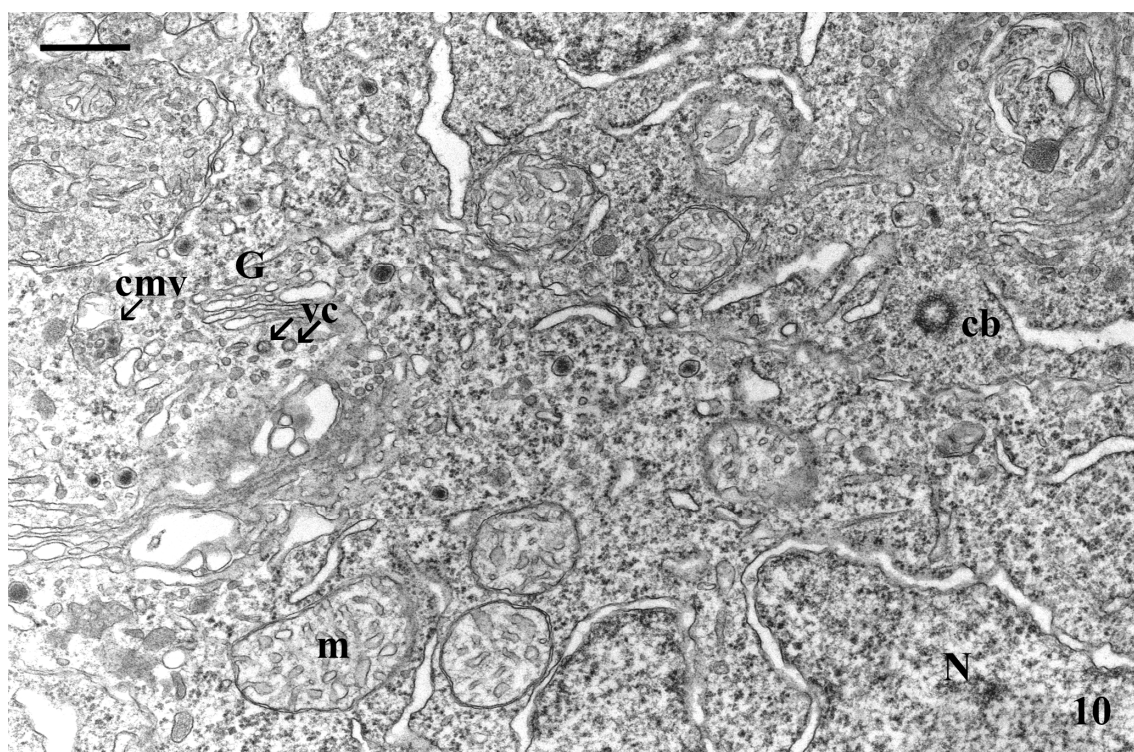


Fig. 10. Detalle de una célula endocrina clara con núcleo (N) indentado, mitocondrias (m), complejo de Golgi (G), corpúsculo basal (cb), cuerpos multivesiculares (cmv) y vesículas cubiertas (vc). **10a.** Célula clara con lisosomas (li). **10b.** Célula densa con citolisosomas (cli). **10c.** Cuerpo basal (cb) y cilio intracitoplásmico (ci), además de estructuras de unión tipo desmosoma (d) entre células oscuras. **10** x14000; **a** x12500; **b** x 16000; **c** x20000.

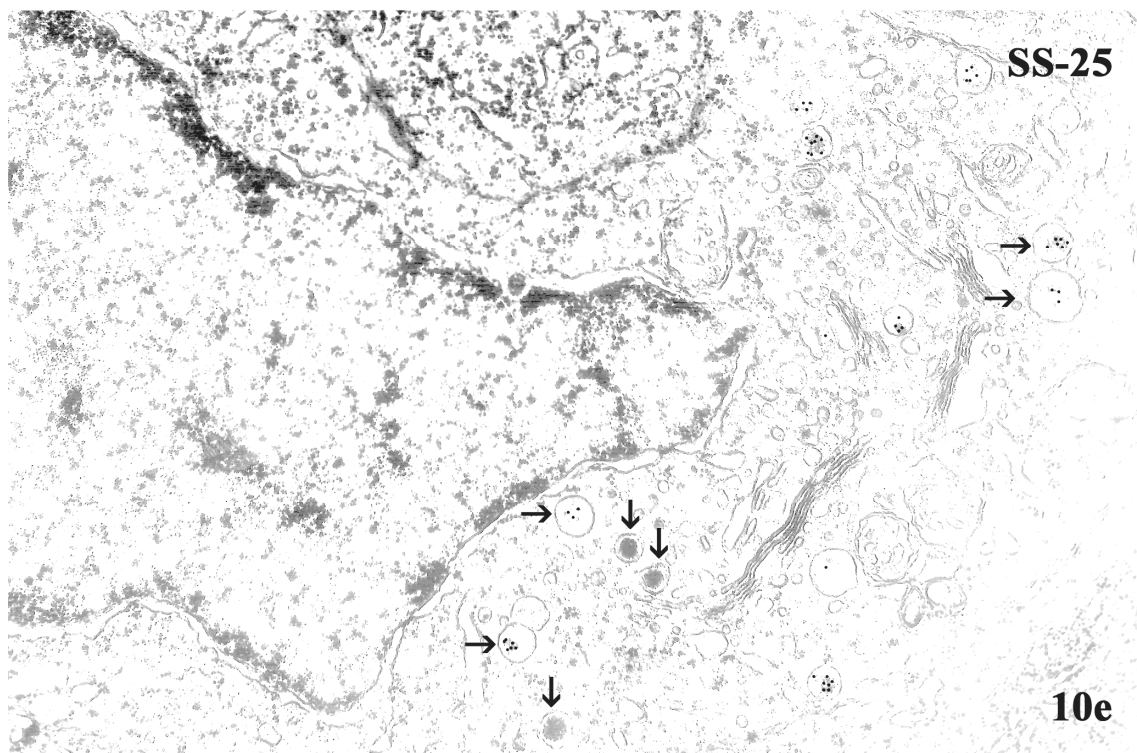
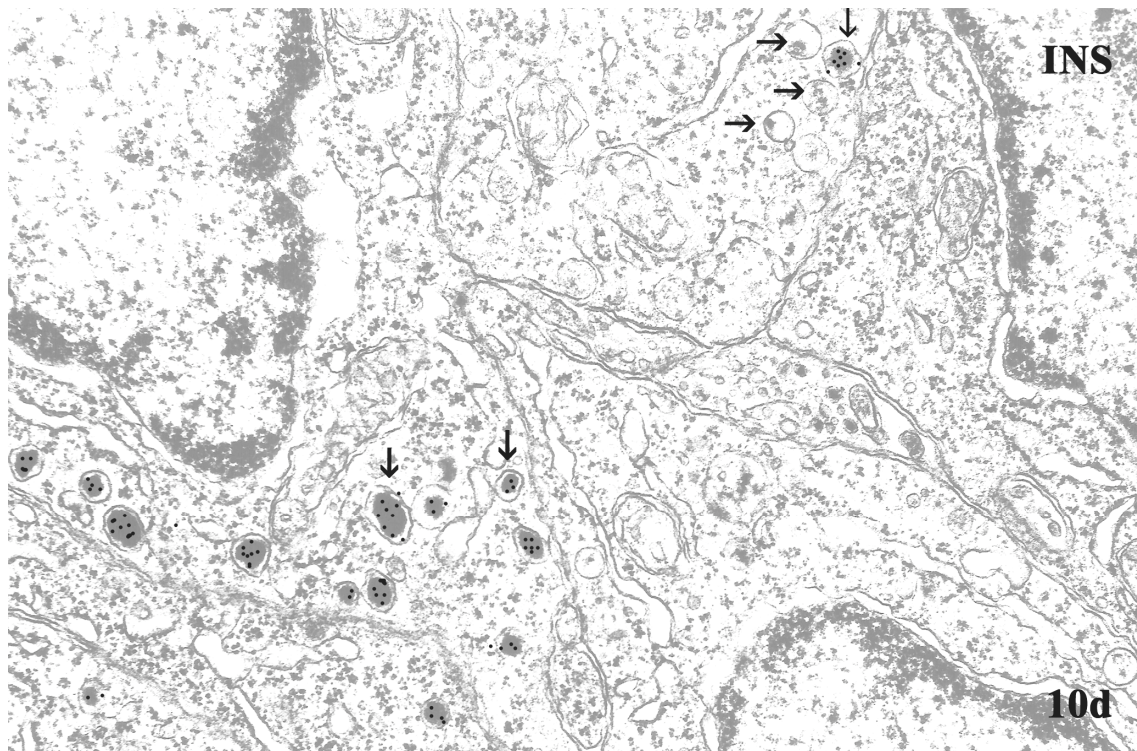


Fig. 10d. Detalle de una célula endocrina inmunorreactiva a INS (técnica IgG-oro) (INS), en la que se muestran gránulos de secreción con su contenido marcado con partículas de oro (↓) y otros no marcados (→). **10e.** Detalle de una célula endocrina inmunorreactiva a SS-25 (técnica IgG-oro) (SS-25), en la que se muestran gránulos de secreción con su contenido marcado con partículas de oro (→) y otros no marcados (↓). x22000.

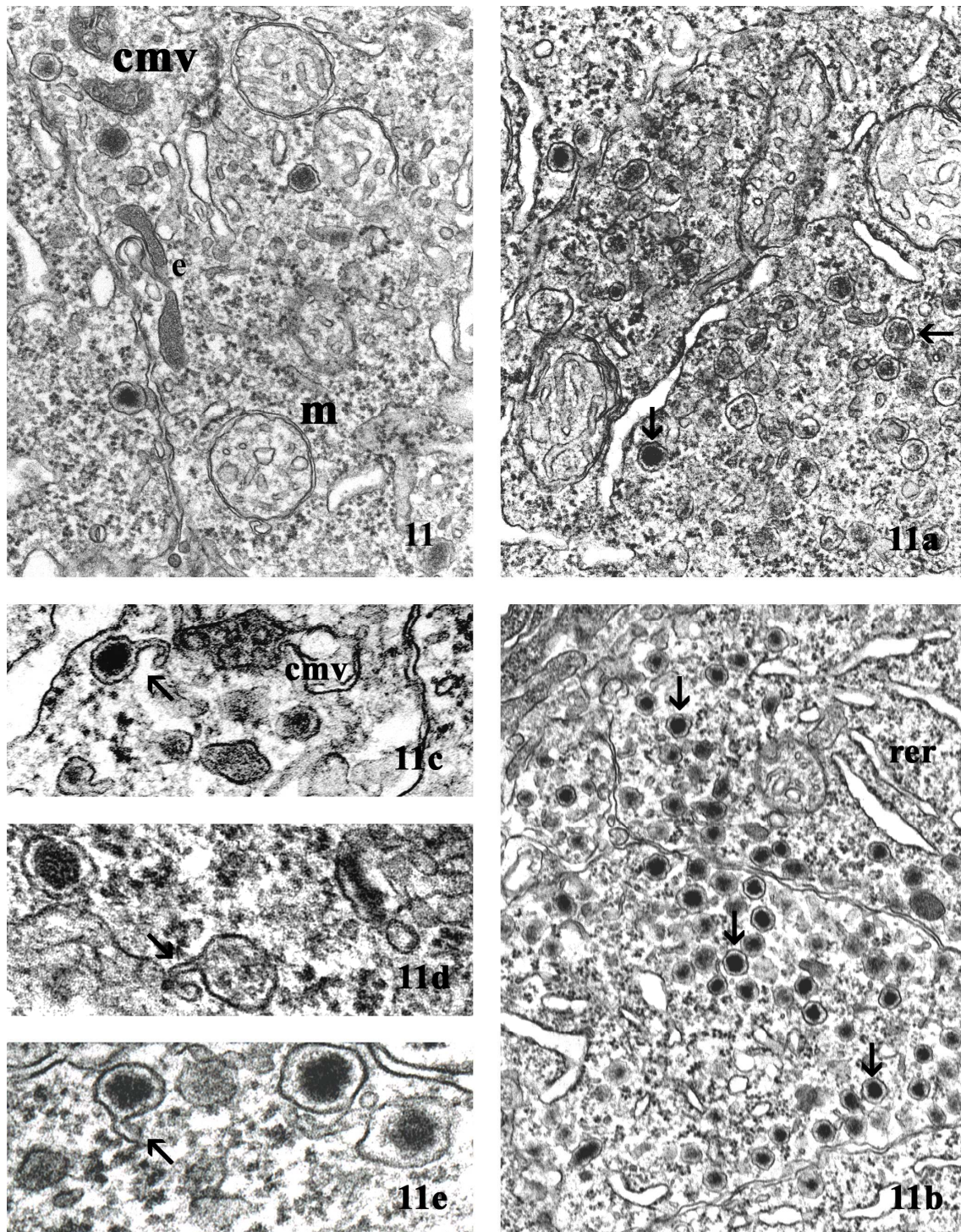


Fig. 11. Detalle de una célula endocrina clara donde se pueden observar un endosoma (e), mitocondrias (m), cuerpos multivesiculares (cmv). **11a.** Nótese que los dos tipos de gránulos que se encuentran en esta etapa están en la misma célula, los de contenido denso (↓) y los de baja electronodensidad (←). **11b.** Gránulos de secreción de elevada electronodensidad (↓) y vesículas cortas y dilatadas del retículo endoplasmático rugoso (rer). **11c.** Cuerpo multivesicular (cmv) y gránulo de secreción cuya envoltura se prolonga en forma de gancho (↵). **11d-11e.** Gránulos de secreción con envoltura prolongada en forma de gancho (↵) y (↶). **11** x21600; **a** x22400; **b** x14400; **c** x36800; **d** x38800; **e** x41000.

Larvas de 2 días

En esta etapa se presenta un islote único y el componente exocrino del páncreas que se ha diferenciado está formado por células electronodensas de contorno ovoideo, que poseen un núcleo también ovoideo con un gran nucléolo, mitocondrias grandes, filamentosas con crestas transversales, abundante rer formado por cortas cisternas dispersas por el citoplasma y un complejo de Golgi, en cuyas proximidades se observan gránulos de zimógeno de diferente tamaño y elevada electronodensidad (Fig. 12).

En cuanto al componente endocrino, se pueden distinguir dos tipos de células que se identifican tanto por las características de sus gránulos de secreción como porque quedan inmunomarcadas con la técnica IgG-oro como células con INS y SS-25. Estas células comienzan a tener una disposición definitiva en el islote. Las células endocrinas con SS-25 se localizan preferentemente en la periferia del islote, contiguas a la porción exocrina del páncreas y las células endocrinas con INS dispuestas en el interior del islote (Fig. 13).

Las células endocrinas con INS son redondeadas u ovoideas, con núcleo eucromatínico indentado y un nucléolo (Fig. 13). En el citoplasma destacan mitocondrias redondeadas o alargadas con crestas tubulares, algunas en proceso de división, abundante rer formado por cisternas alargadas, dispersas y desigualmente dilatadas (Figs. 14 y 15), complejo de Golgi muy desarrollado (Figs. 13-16), vesículas cubiertas en relación con el complejo de Golgi, depresiones revestidas en contacto con la membrana plasmática (Figs. 14, 14a), cuerpos multivesiculares con gránulos de secreción adheridos a su membrana (Figs. 14, 14b y 16) y lisosomas (Fig. 14c). Se observan también cilios intracitoplásmicos y numerosos microtúbulos (Fig. 16). Los gránulos de secreción son esféricos (entre 171 y 252 nm), algunos alargados baciliformes, posiblemente como resultado de la fusión de varios gránulos de secreción, con un contenido central muy electronodenso (Figs. 13-17) que aparecen marcados por la técnica IgG-oro (Fig. 17a).

Las células endocrinas con SS-25 son de contorno alargado con núcleo ovoideo, eucromatínico y nucléolo excéntrico (Fig. 18). En el citoplasma destacan numerosos polirribosomas así como largas cisternas algo dilatadas irregularmente, a veces apiladas, de rer concéntricas al núcleo y próximas a la membrana plasmática (Figs. 18 y 18a). Las mitocondrias son redondeadas o alargadas con crestas tubulares, a veces se encuentran agrupadas (Figs. 18a y b).

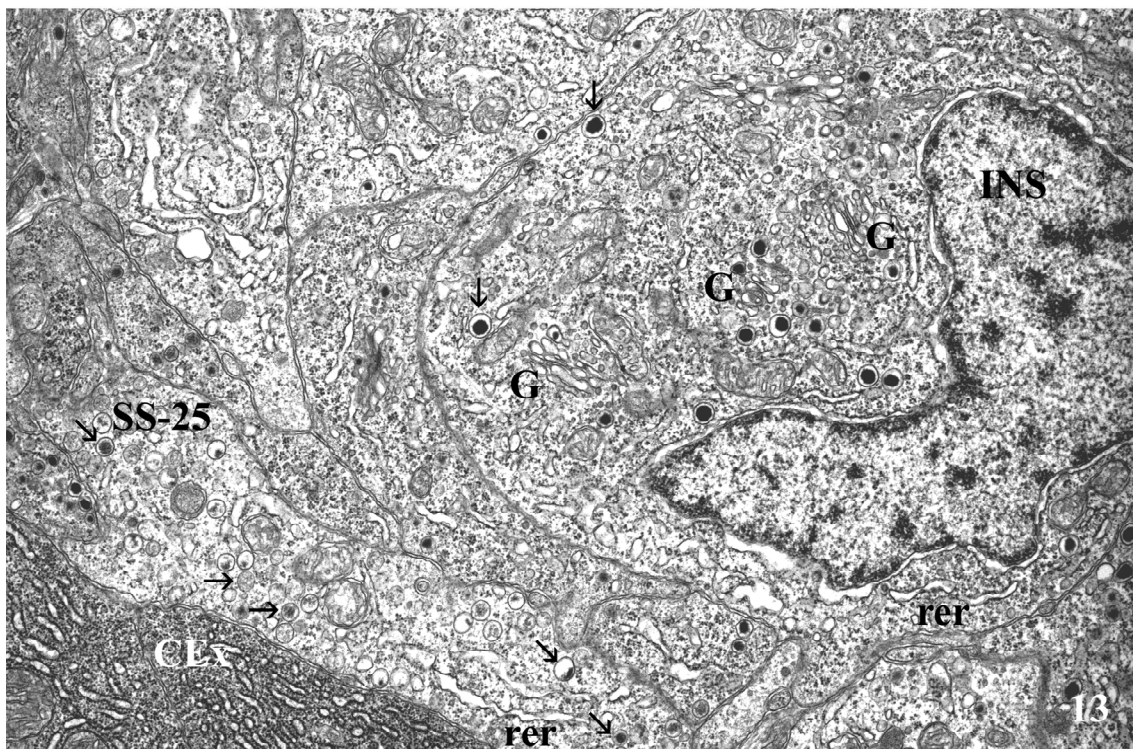
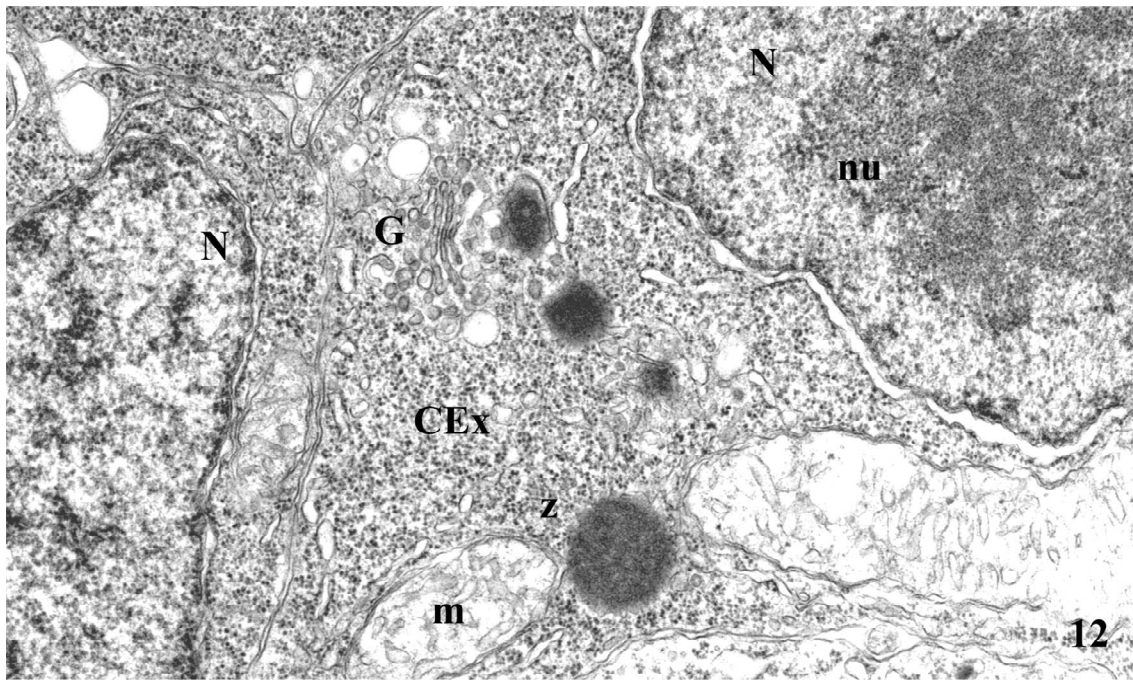


Fig. 12. Célula del páncreas exocrino (CEX), gránulos de zimógeno (z) de electronodensidad elevada; núcleo (N) y nucléolo (nu), numerosos ribosomas, complejo de Golgi (G) y mitocondrias (m). x13500.

Fig. 13. Células alargadas de somatostatina-25 (SS-25), retículo endoplasmático rugoso (rer), gránulos de secreción de contenido ligeramente electronodenso (→) y otros con un centro esférico muy electronodenso (↘). Células con insulina (INS), complejo de Golgi (G), retículo endoplasmático rugoso (rer) y gránulos de secreción esféricos y de contenido central muy electronodenso (↓). Células del páncreas exocrino (CEX). x13787.

El complejo de Golgi está formado por cisternas que están estrechamente apiladas en cuyas proximidades se ubican numerosas vesículas cubiertas (Fig. 19a). Hay cuerpos multivesiculares y en algunos se puede encontrar un material electrodensito semejante al de algunos gránulos de secreción (Fig. 19b). Los gránulos de secreción más numerosos poseen un contenido ligeramente electrodensito, que está rodeado por un estrecho halo claro. Otros más escasos contienen un centro esférico muy electrodensito de disposición central o excéntrica (Figs. 18, 18a, 19a-d). El tamaño de ambos oscila entre los 151 y los 262 nm. Con la técnica de IgG-oro las partículas de oro se observan en el contenido de los gránulos de secreción (Fig. 19e).

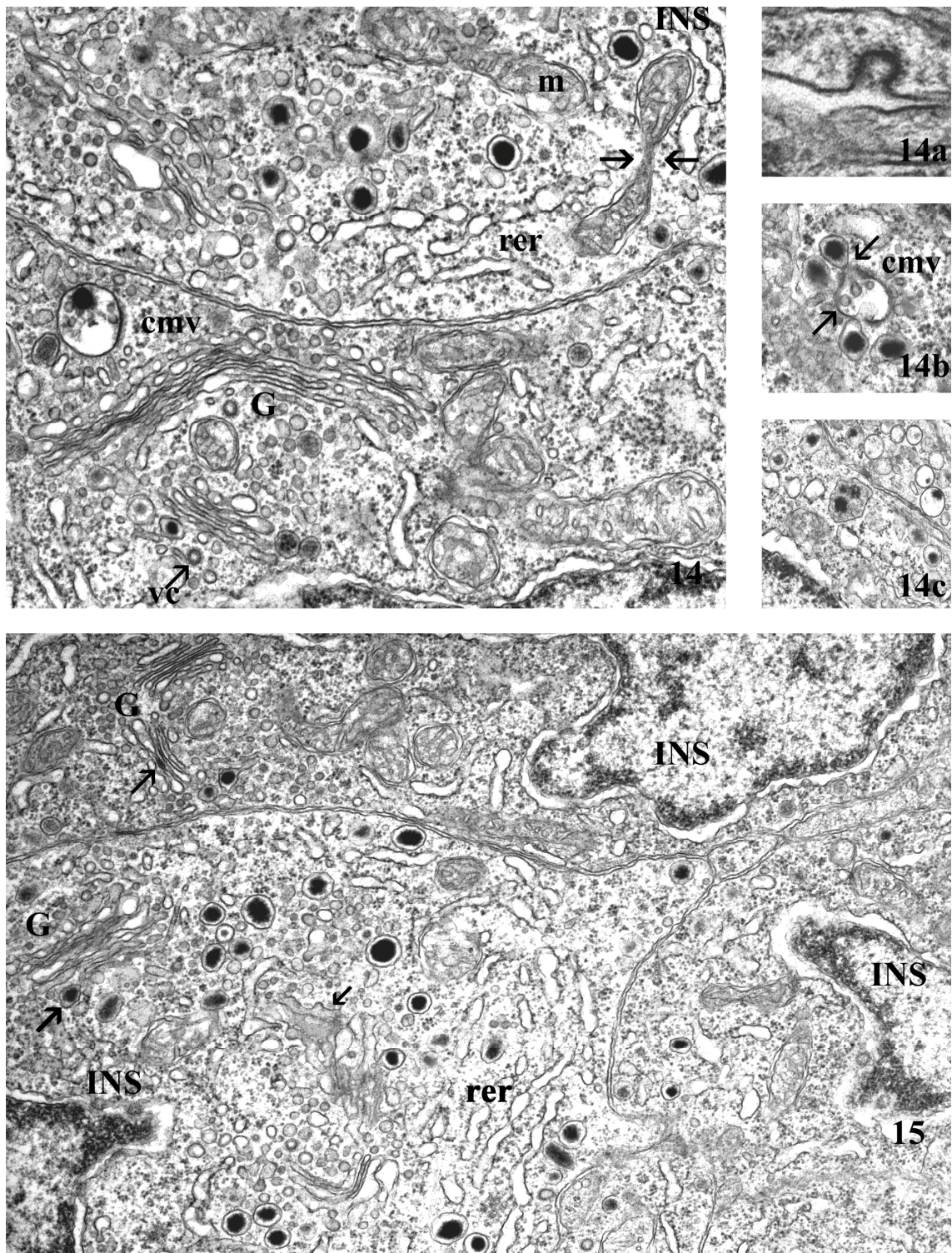


Fig. 14. Células con insulina (INS), mitocondrias (m), alguna en proceso de división ($\rightarrow\leftarrow$), complejo de Golgi (G), vesículas cubiertas (vc), cisternas dilatadas de retículo endoplasmático rugoso (rer), cuerpos multivesiculares (cmv) con material interno semejante al de los gránulos de secreción. **14a.** Depresión revestida. **14b.** Cuerpo multivesicular (cmv) en relación con gránulos de secreción. **14c.** Lisosoma (li) con un material electronodenso similar al contenido de los gránulos de secreción. **14** x16500; **a** x43750; **b** x15000; **c** x10000. **Fig. 15.** Células con insulina (INS), complejo de Golgi (G) con gránulos de secreción en los extremos ($\nearrow$), retículo endoplasmático rugoso (rer) y una sección superficial del complejo de Golgi ($\nwarrow$). x12000.

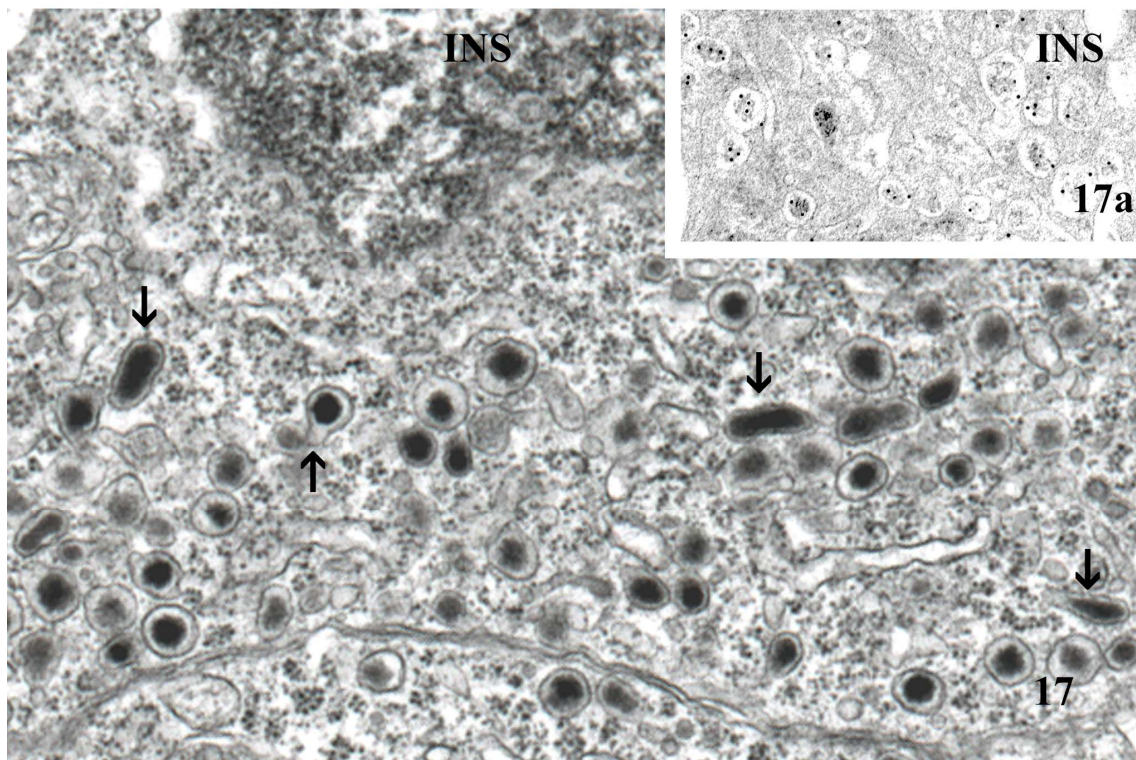
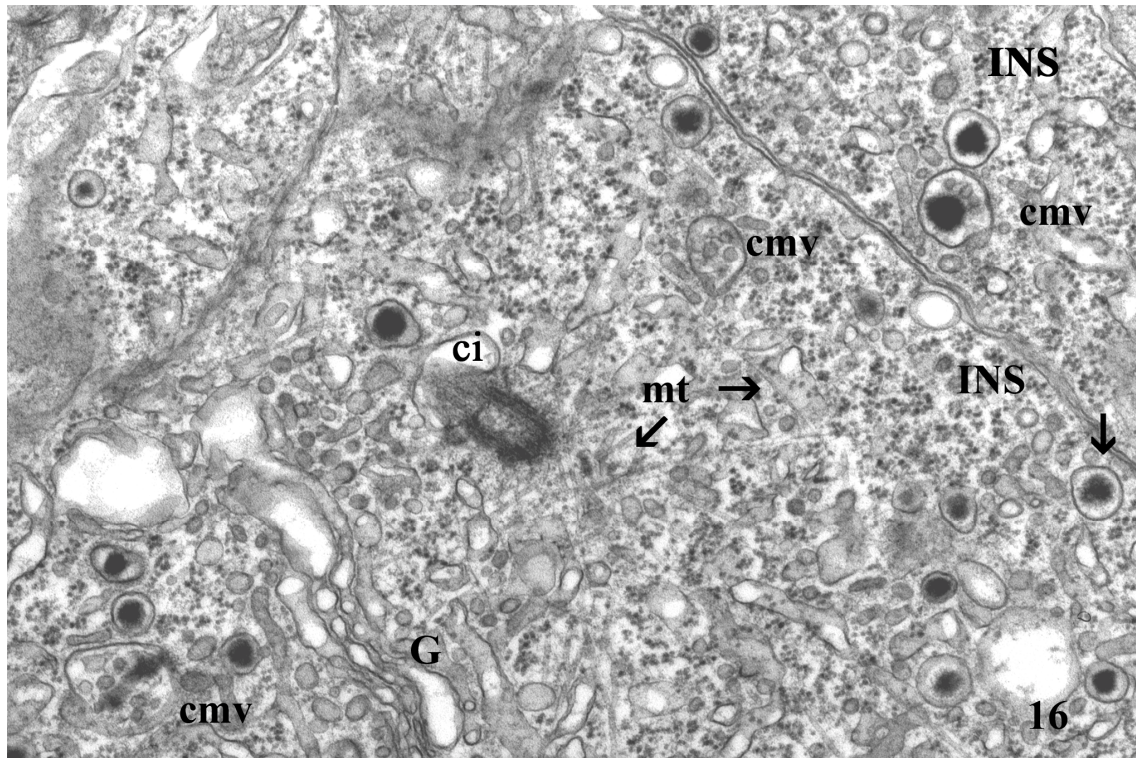


Fig. 16. Célula con insulina (INS), cuerpos multivesiculares (cmv), vesículas dilatadas del complejo de Golgi (G), cilio intracitoplásmico (ci) y microtúbulos (mt). x20000.

Fig. 17. Gránulos de secreción de una células con insulina (INS), algunos tienen forma baciliforme (↓) y en otros su membrana se extiende a modo de gancho (↑). **17a.** Gránulos de INS inmunorreactivos (técnica IgG-oro), el oro se deposita en el contenido del gránulo, pero no en el halo. 17 x20000; a x16000.

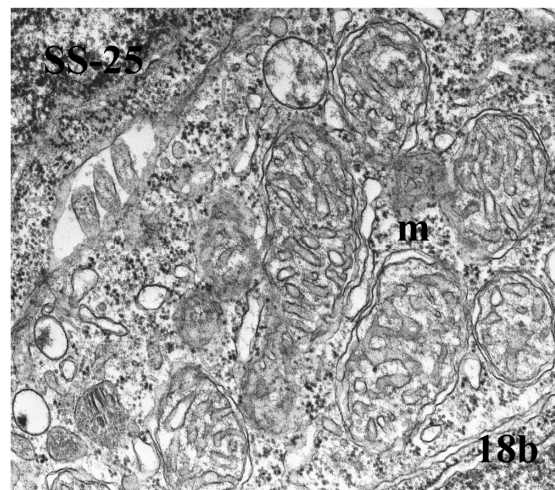
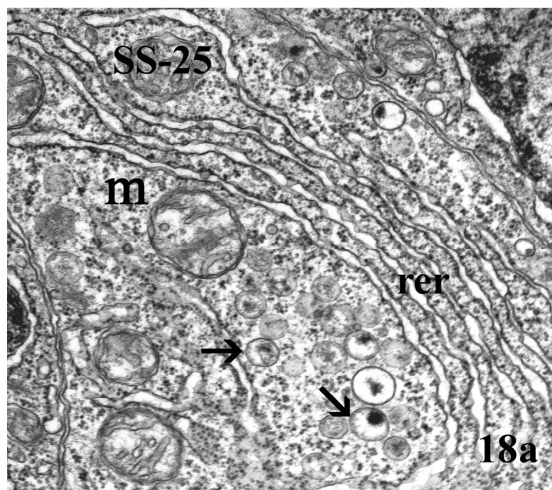
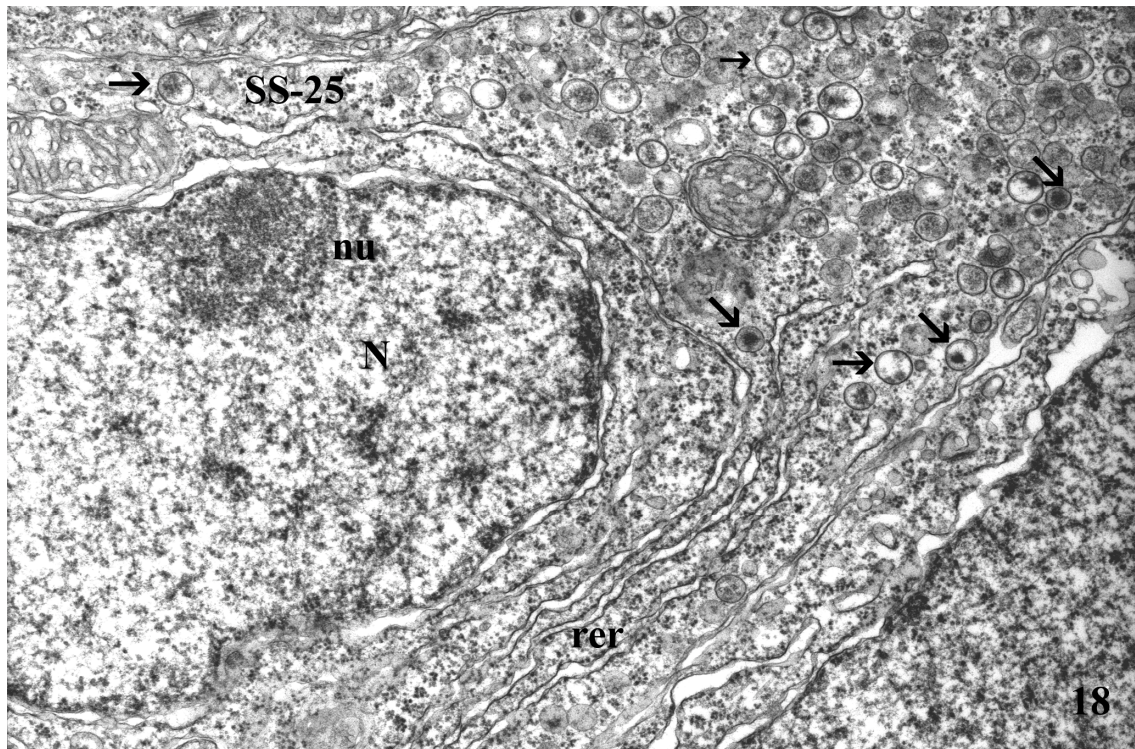


Fig. 18. Células con somatostatina-25 (SS-25). Núcleo (N) claro con un nucléolo (nu) excéntrico, largas cisternas apiladas, algo dilatadas irregularmente de retículo endoplasmático rugoso (rer) paralelas al núcleo. Obsérvese que hay gránulos con contenido esférico central o excéntrico muy electronodenso (↘), y gránulos con contenido ligeramente electronodenso rodeados por un estrecho halo claro (→). **18a.** Obsérvense las cisternas paralelas de retículo endoplasmático rugoso (rer), gránulos de secreción y mitocondrias (m). **18b.** Mitocondrias (m) agrupadas. **18** x11500; **a** x12000; **b** x15000.

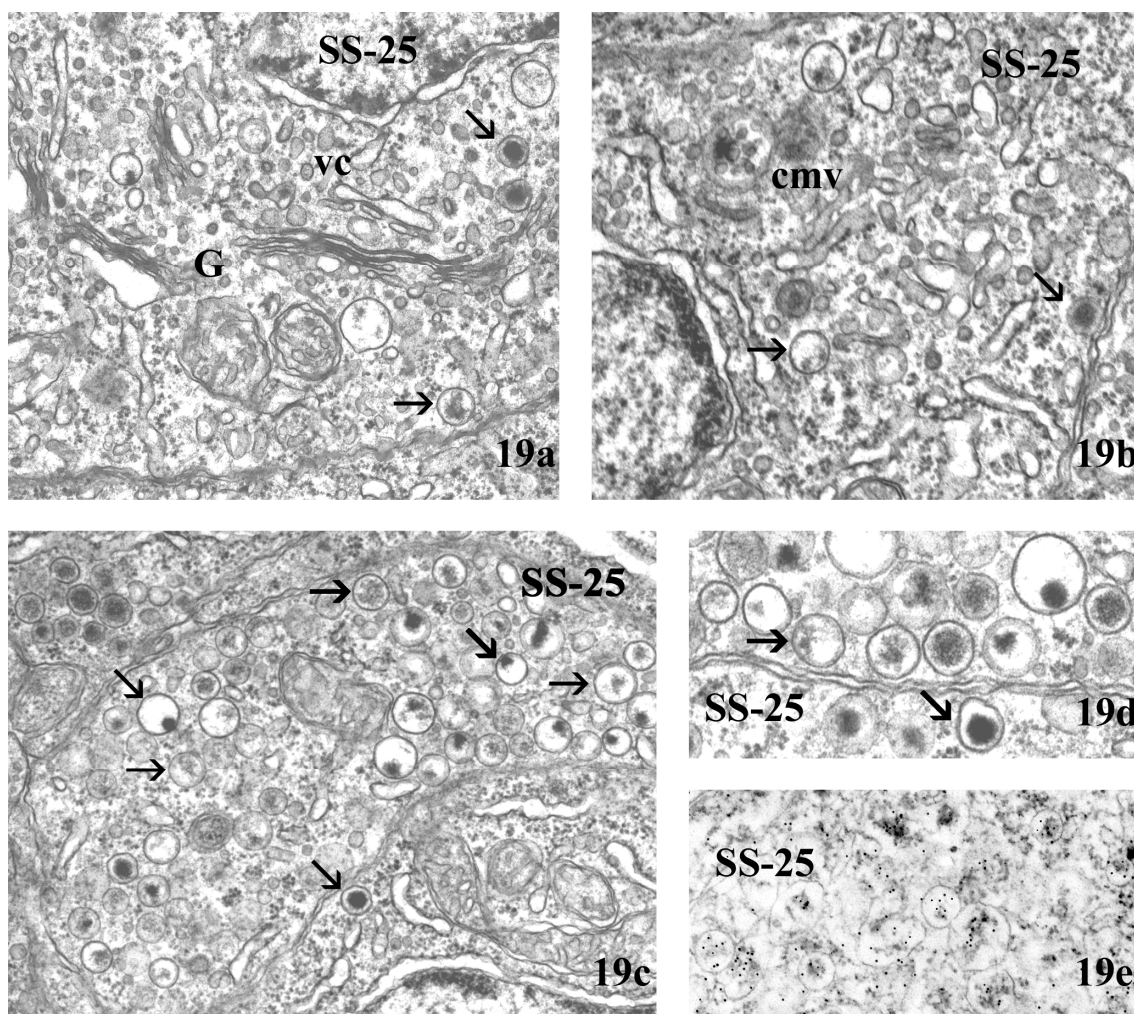


Fig. 19. Detalles de células con somatostatina-25 (SS-25). **19a.** Complejo de Golgi (G), vesículas cubiertas (vc), gránulos de secreción electronodensos (↘), gránulos de secreción claros (→). **19b.** Cuerpos multivesiculares (cmv) y gránulos de secreción electronodensos (↘) y claros (→). **19c.** Gránulos de secreción. **19d.** Gránulos de secreción electronodensos (↘), y de electronodensidad baja (→) próximos a la membrana. **19e.** Gránulos de SS-25 inmunorreactivos (técnica IgG-oro). **a** x13200; **b** x17500; **c** x14000; **d** x22500; **e** x18000.

Larvas de 4 días

El islote pancreático (islote único) que aparece en esta etapa está rodeado por células del páncreas exocrino, que está totalmente desarrollado. Está formado por tres tipos de células endocrinas, identificadas con la técnica IgG-oro como células con SS-25, INS y SS-28. Las células con SS-25 e INS son similares a las descritas en las etapas anteriores, localizándose en el islote en la misma posición y las células con SS-28, que aparecen en esta etapa, se disponen entre las anteriores (Fig. 20).

Las células con SS-28, se sitúan entre las células de SS-25 e INS y son de forma alargada u ovoidea con prolongaciones que rodean a las células con INS (Figs. 20 y 21). Destaca un núcleo grande y lobulado, que puede aparecer en las secciones como dos fragmentos, con un nucléolo excéntrico (Fig. 21). Se observan mitocondrias pequeñas, redondeadas o filamentosas y escasas, con crestas tubulares, cisternas cortas y dilatadas de rer y cisternas del complejo de Golgi dilatadas, a veces con material electronodenso en su interior (Figs. 20 y 21). Junto a estas cisternas y dispersas por el citoplasma, se observan numerosas vesículas cubiertas y cuerpos multivesiculares (Figs. 21 y 22). Son también visibles cilios con un tallo ciliar dirigiéndose a una invaginación de las células con INS (Fig. 22).

Los gránulos de secreción tienen un diámetro medio de 150 nm y son de dos tipos: gránulos con contenido central muy electronodenso rodeado por un estrecho halo claro y gránulos con contenido de electronodensidad media que ocupa la casi totalidad del gránulo (Figs. 21-22b). Con la técnica de IgG-oro estos dos tipos de gránulos de secreción se marcan con SS-28, depositándose las partículas de oro en el contenido granular (Fig. 22b).

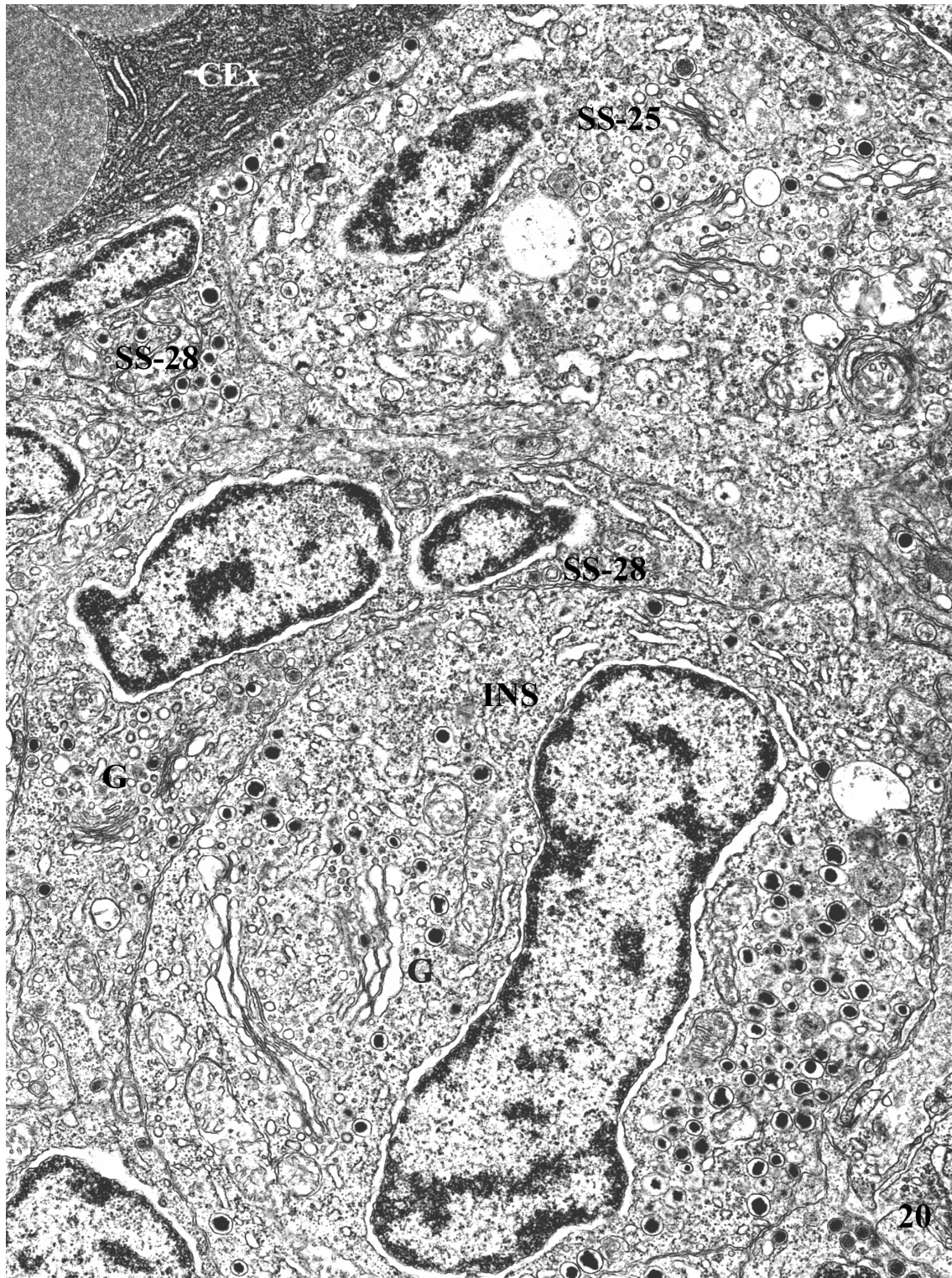


Fig. 20. Vista general del islote único de una larva de 4 días. Las células con somatostatina-25 (SS-25) son periféricas y próximas a las células del páncreas exocrino (CEx), las células con insulina (INS) se localizan en el interior y las células con somatostatina-28 (SS-28) se disponen entre las anteriores. Nótese que el complejo de Golgi (G) tiene material electronodenso dentro de sus cisternas. x9000.

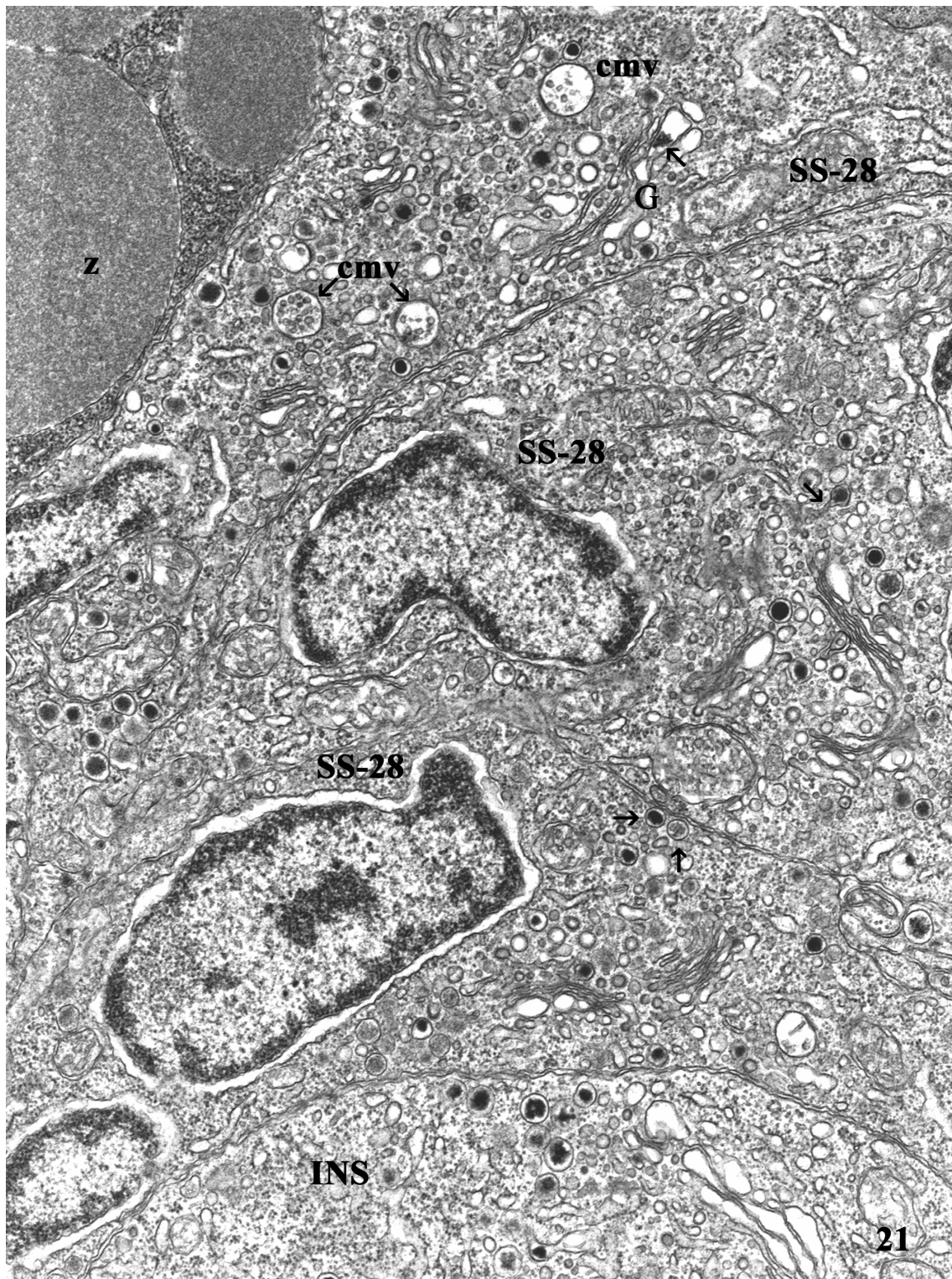


Fig. 21. Células con somatostatina-28 (SS-28), que rodean a las células con insulina (INS), complejo de Golgi (G) con contenido electronodenso dentro de las cisternas (↖) y cuerpos multivesiculares (cmv). Los gránulos de secreción de contenido central muy electronodenso rodeado por un estrecho halo claro (→) y gránulos de contenido de electronodensidad media que ocupa la casi totalidad del gránulo (↑). Obsérvese que uno de los gránulos de secreción tiene una prolongación de su membrana en forma de gancho (↘). x13200.

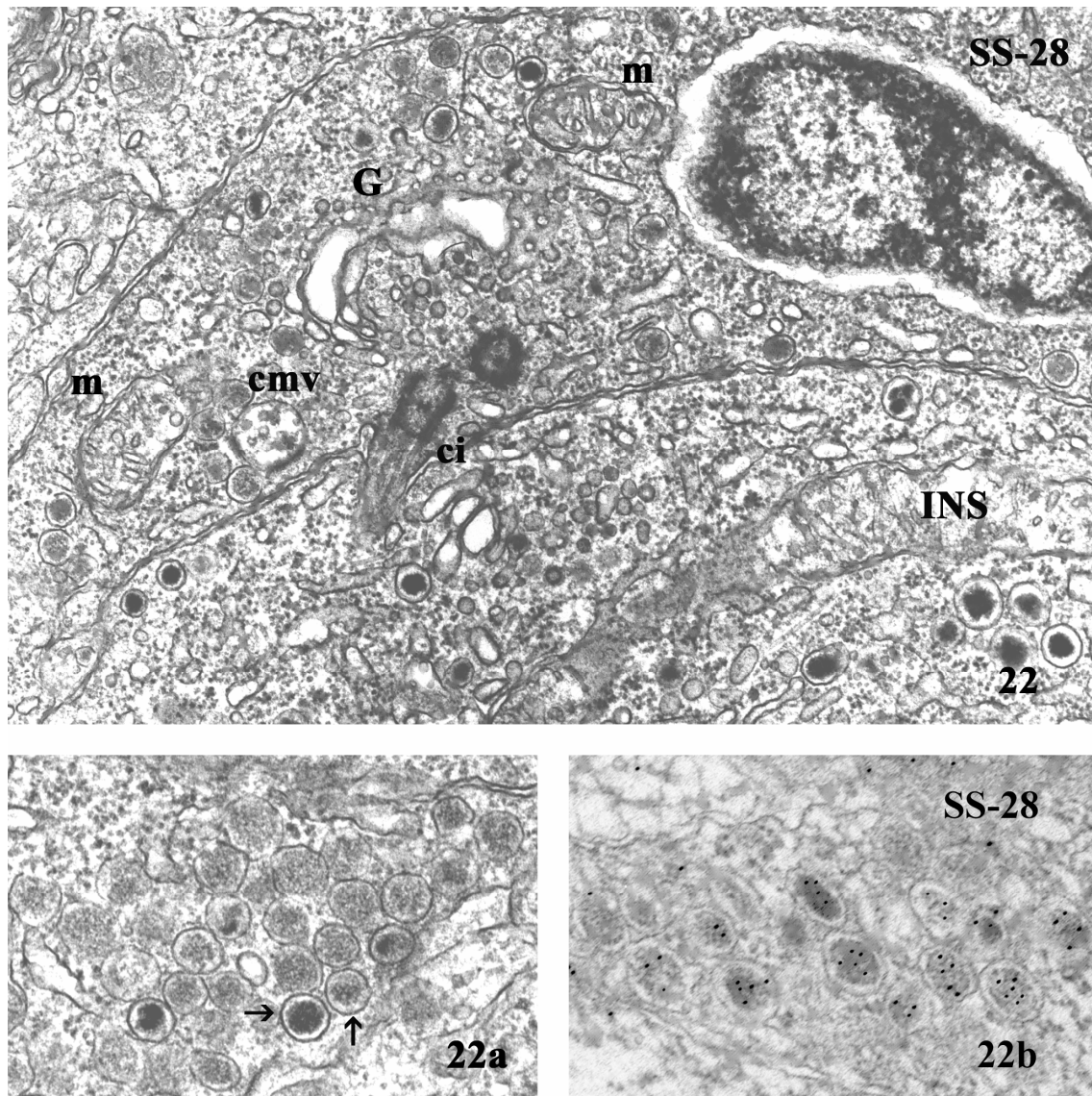


Fig. 22. Células endocrinas de somatostatina-28 (SS-28) y de insulina (INS), con mitocondrias (m), algunas cisternas dilatadas del complejo de Golgi (G), cuerpos multivesiculares (cmv) y un cilio (ci) con tallo ciliar al espacio intercelular que se dirige a una invaginación de la célula con INS. **22a.** Gránulos de secreción de SS-28, de electronodensidad elevada (→) y de electronodensidad media (↑). **22b.** Gránulos de SS-28 inmunomarcados (técnica IgG-oro). **22** x23600; **a** x24000; **b** x30000.

Las células con INS se localizan en la parte interna del islote, ocupando la parte central de éste (Fig. 20). Son células de aspecto redondeado u ovalado con núcleo ovalado con indentaciones, a veces muy profundas y con un nucléolo central o excéntrico (Fig. 23). En el citoplasma encontramos mitocondrias redondeadas o filamentosas con crestas tubulares, con cisternas cortas de rer localizadas próximas a la membrana celular (Fig. 23), complejo de Golgi formado por cisternas dilatadas que contienen un material electronodenso similar al de los gránulos de secreción (Figs. 23, 24 y 24a).

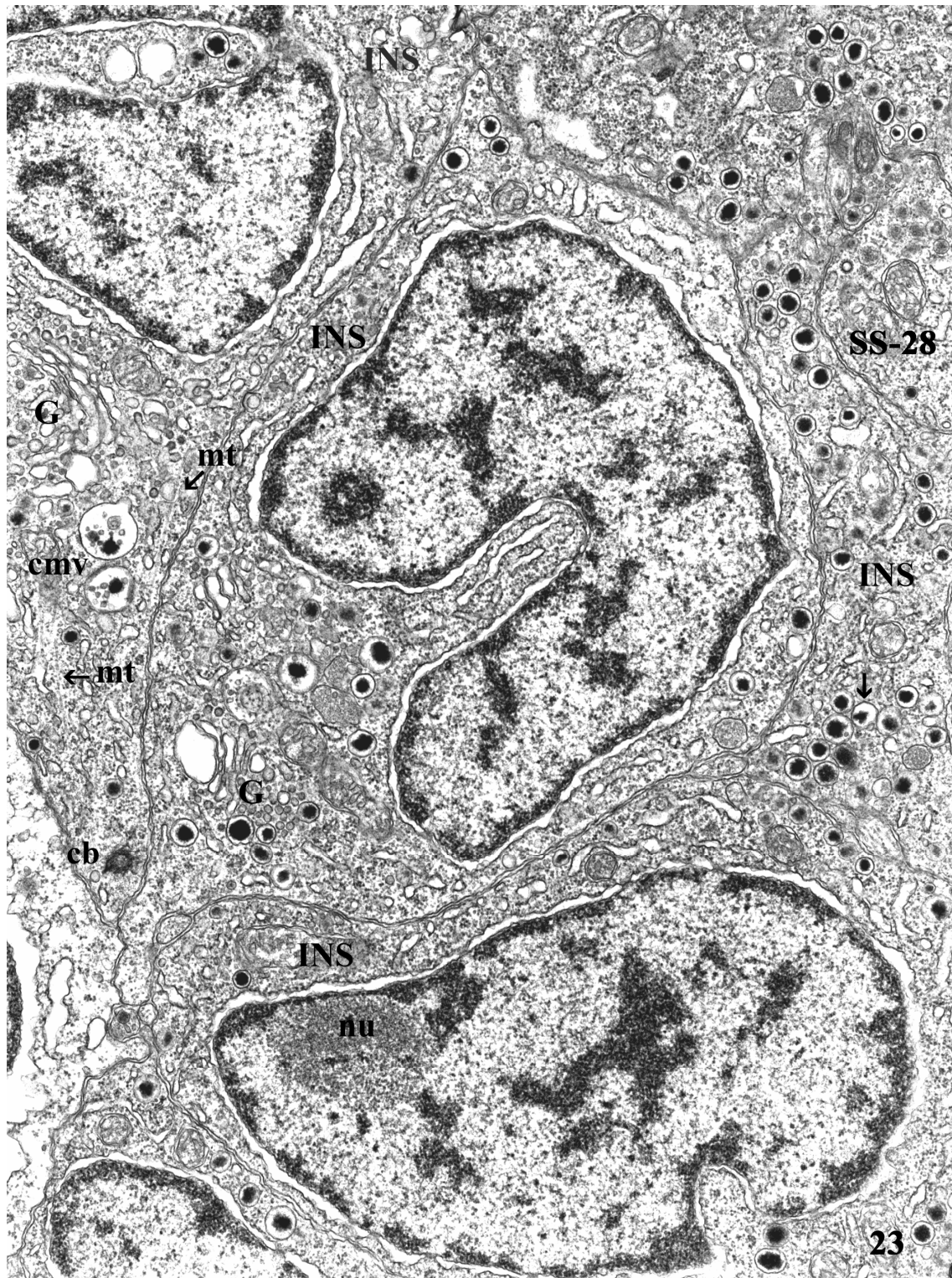


Fig. 23. Células con insulina (INS) donde se aprecia la forma del núcleo con el nucléolo (nu), cisternas aisladas de retículo endoplasmático rugoso, complejo de Golgi (G), corpúsculo basal (cb), cuerpos multivesiculares (cmv) con contenido similar al de los gránulos de secreción y microtúbulos (mt). Los gránulos de secreción presentan contenido no uniforme, muy electronodenso y de aspecto estrellado (↓). Célula con gránulos de somatostatina-28 (SS-28). x16500.

En sus proximidades se aprecian gránulos de secreción, numerosas vesículas cubiertas así como cuerpos multivesiculares que contienen parte del material electronodenso de algunos gránulos de secreción (Fig. 23 y 24). Junto a la membrana celular se observa un cuerpo basal (Fig. 23). También se observan microtúbulos y endosomas (Fig. 23). Los gránulos de secreción tienen un diámetro medio de 175 nm, son de contenido central, esférico, muy electronodenso rodeado por un halo claro (Figs. 20, 23-24b). En ocasiones el contenido electronodenso se dispersa adquiriendo un aspecto estrellado (Figs. 23 y 24). Con la técnica IgG-oro las partículas de oro se depositan principalmente sobre el contenido granular así como en el de algún endosoma relacionado con gránulos de secreción (Fig. 24b).

Las células con SS-25 se caracterizan por tener forma alargada (Fig. 20) con núcleo redondeado u ovalado con indentaciones, cisternas de retículo endoplásmico rugoso dispersas y muy dilatadas, escasas mitocondrias aisladas, complejo de Golgi formado por varias cisternas en cuyas proximidades se disponen vesículas cubiertas (Fig. 25), citolisosomas que contienen orgánulos celulares y cuerpos multivesiculares (Fig. 25). La mayoría de los gránulos de secreción pueden aparecer agrupados o dispersos por el citoplasma y poseen un contenido de mediana electronodensidad (Figs. 20 y 25). En ocasiones pueden aparecer vacíos o con un escaso contenido excéntrico y su diámetro puede llegar a los 275 nm. Otros gránulos de secreción, más escasos, poseen un centro muy electronodenso rodeado por un estrecho halo claro (Figs. 20 y 25), los cuales se localizan preferentemente en las proximidades de las cisternas del complejo de Golgi. Estos gránulos de secreción tienen un diámetro medio de 200 nm. Las partículas de oro se depositan específicamente sobre el contenido granular (Fig. 25a).

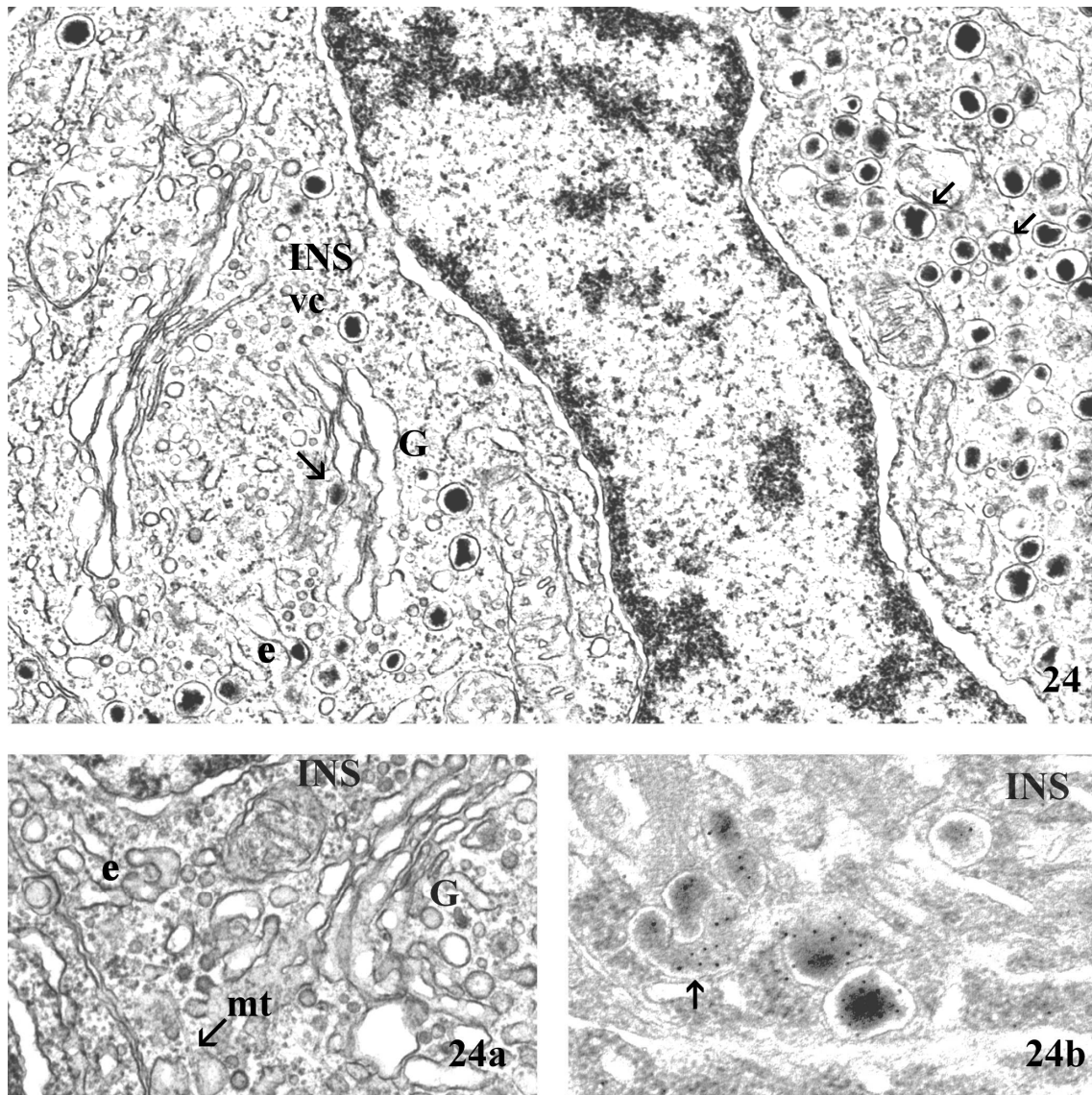


Fig. 24. Célula con insulina (INS). Complejo de Golgi con material denso similar al contenido de los gránulos de secreción (↘), vesículas cubiertas (vc) y endosomas (e), gránulos de secreción con contenido de aspecto estrellado (↙). **24a.** Endosomas (e) y microtúbulos (mt). **24b.** Gránulos de secreción de INS inmunomarcados con oro (técnica IgG-oro). Obsérvese que el contenido de un endosoma se ha marcado con la técnica anterior (↑). **24** x13100; **a** x30125; **b** x23000.

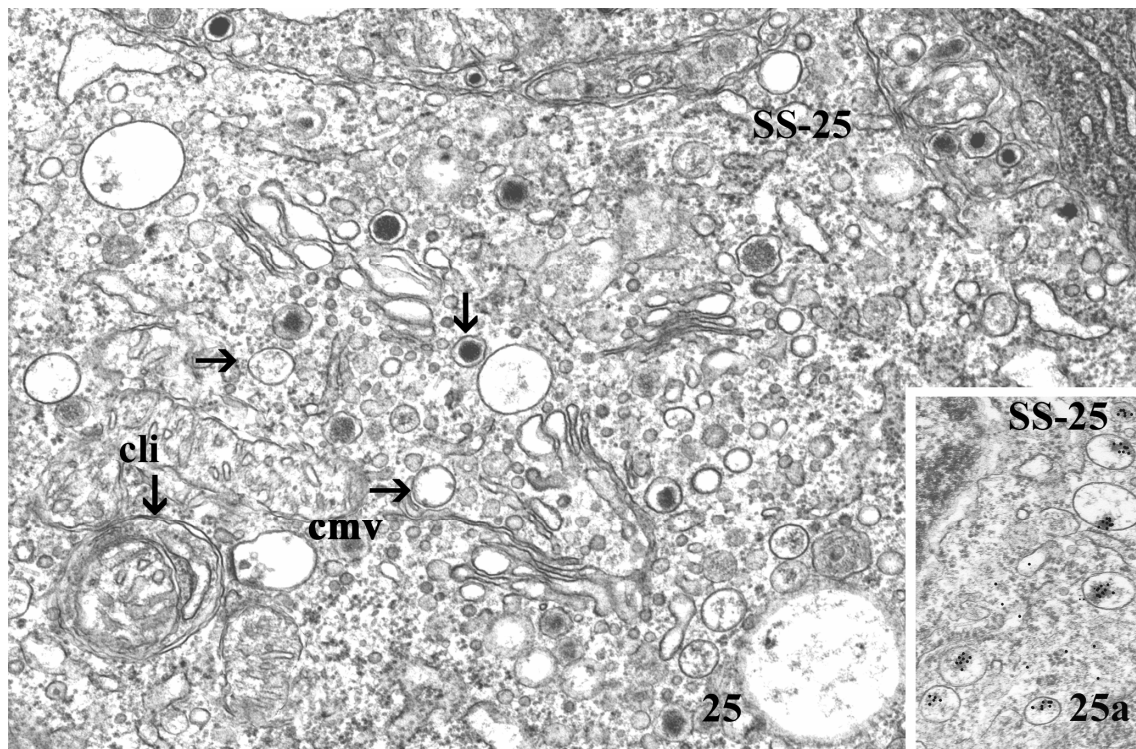


Fig. 25. Célula con somatostatina-25 (SS-25). Se puede observar un citolisoma (cli) que contiene órganos celulares, cuerpos multivesiculares (cmv) y gránulos de secreción, los que poseen un contenido de mediana electronodensidad que en ocasiones pueden parecer vacíos (→) y otros que presentan un centro muy electronodenso rodeado por un estrecho halo claro (↓). **25b.** Gránulos de secreción de SS-25 inmunomarcados con oro (técnica de IgG-oro). **25** x20300; **a** x22000.

Larvas de 12 días

En esta etapa se identifica, en el islote único, por la técnica inmunocitoquímica ultraestructural IgG-oro, otro tipo celular, que se corresponde con las células endocrinas GLU/GLP-1 descritas previamente con inmunocitoquímica en microscopía óptica. Se localizan en la región periférica junto a las células con SS-25 y en contacto con el páncreas exocrino (Fig. 26).

Ocupando la parte mas interna del islote se localizan las células con INS. Son de forma redondeada u ovoidea y poseen un núcleo ovoideo con algunas escotaduras (Figs. 26, 28), escasas mitocondrias con crestas tubulares, cisternas dispersas de rer y complejo de Golgi con cisternas dilatadas, en cuyas proximidades se disponen algunas vesículas cubiertas y lisosomas (Fig. 28). Los gránulos de secreción característicos de este tipo celular tienen un contenido central redondeado muy electronodenso rodeado por un amplio halo claro; entre ellos existen otros con un contenido denso e irregular que puede parecer estrellado o formando cordones irregulares (Figs. 27a y b). El tamaño de ambos tipos granulares oscila entre los 150 y los 300 nm (Figs. 26-28). Las partículas de oro se depositan sobre el material electronodenso (Fig. 28a).

Las células de SS-28 se localizan junto a las células con INS y GLU (Fig. 26). Son ovoideas, con núcleo también ovoideo y escasas y grandes mitocondrias, escaso rer, complejo de Golgi con cisternas cortas y dilatadas, vesículas cubiertas y cuerpos multivesiculares (Figs. 29a y b). Los gránulos de secreción son de diámetro menor que los de las células anteriores. Los más numerosos poseen un contenido central de mediana electronodensidad que ocupa casi la totalidad del gránulo; otros, más escasos, presentan un contenido muy electronodenso, el tamaño de ambos tipos de gránulos es similar, entre los 145 y los 180 nm (Figs. 26, 29a-c). El contenido de estos dos tipos granulares se marca con la técnica de IgG-oro con anti-SS-28 (Fig. 29d). Se han podido observar células en algunas etapas de mitosis (Fig. 29c).

Las células con SS-25 mantienen su localización en la periferia del islote (Fig. 26), son poco electronodensas, ovaladas o alargadas, con núcleo ovoideo, a veces con indentaciones profundas (Fig. 30a). Los orgánulos son escasos: se observan mitocondrias grandes con crestas tubulares, cisternas cortas de rer y complejo de Golgi formado por cortas cisternas (Figs. 30a y b).

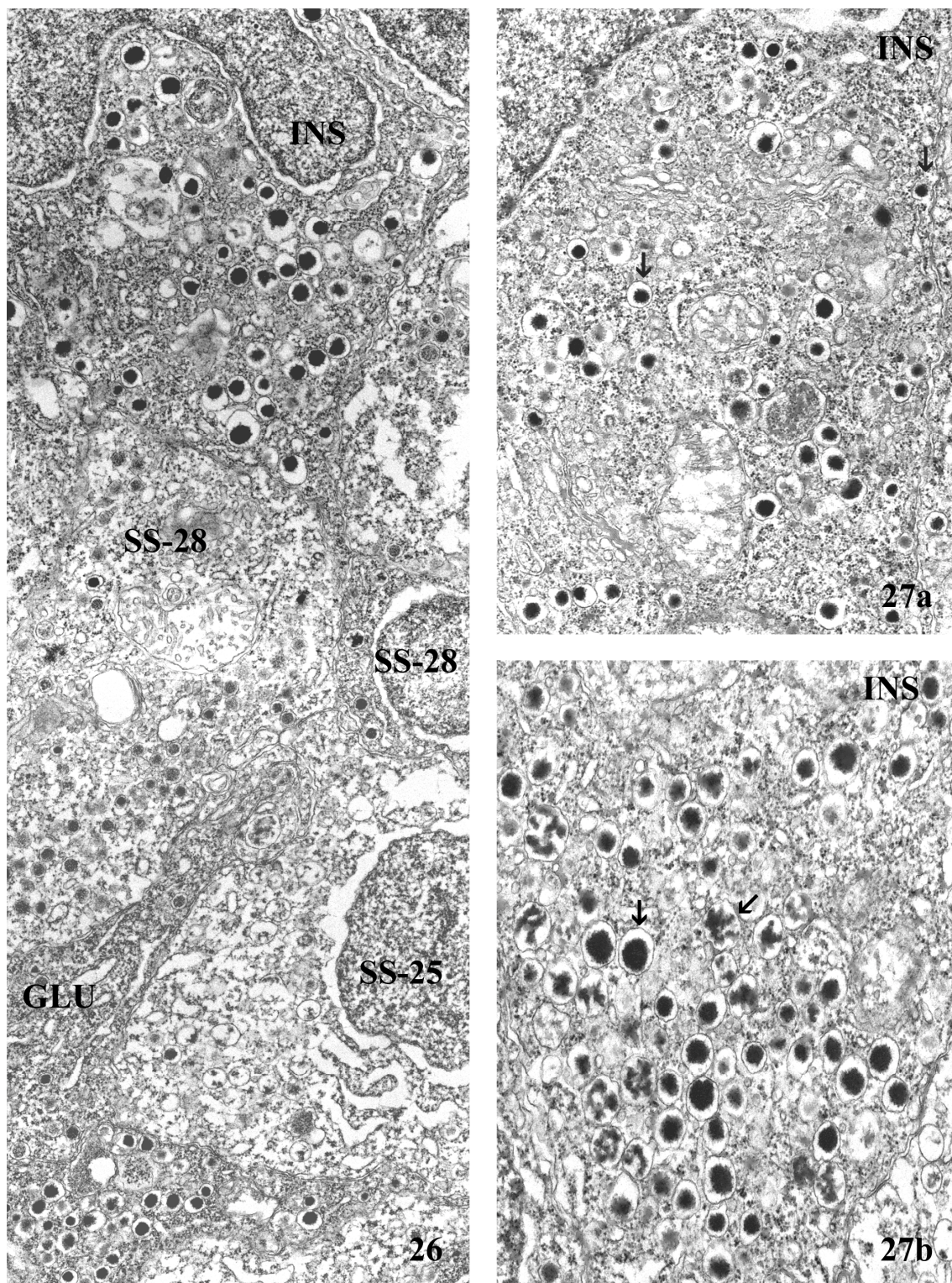


Fig. 26. Células endocrinas del islote único. Célula con glucagón (GLU), célula con insulina (INS), célula con somatostatina-28 (SS-28), célula con somatostatina-25 (SS-25). x4410.

Fig. 27. Secciones de células con insulina (INS). **27a.** Los gránulos de secreción presentan contenido central esférico muy electronodenso rodeado por un amplio halo claro (↓). **27b.** Entre los gránulos anteriores (↓) existen otros con un contenido denso e irregular que puede parecer estrellado o formando cordones irregulares (↯). **a** x14000; **b** x17000.

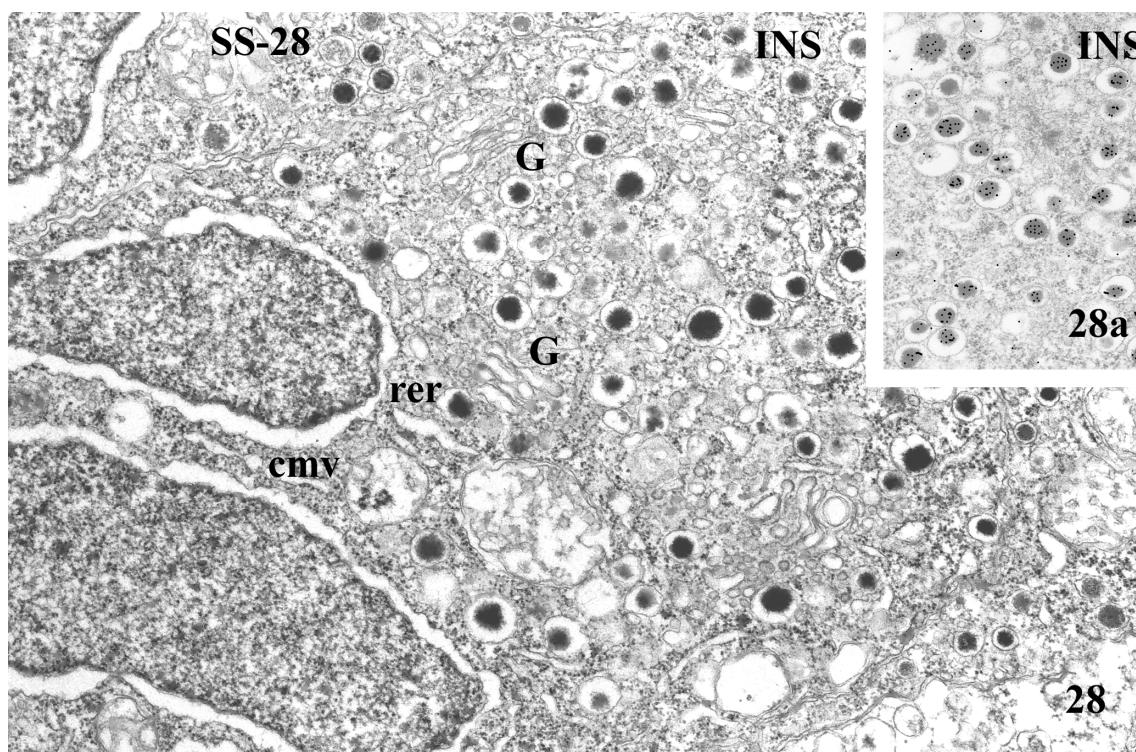


Fig. 28. Células con insulina (INS) y con somatostatina-28 (SS-28). Complejo de Golgi (G), retículo endoplasmático rugoso (rer) y cuerpos multivesiculares (cmv). Gránulos de secreción con contenido central muy electronodenso. **28a.** Gránulos de secreción de INS inmunomarcados con oro (técnica IgG-oro). **28** x18000; **a** x14000.

Los gránulos de secreción poseen un contenido granular de mediana electronodensidad, con un diámetro entre 165 y 200 nm, junto a los que destacan otros, más grandes (entre 180 y 284 nm), vacíos o con escaso contenido que se condensa en el centro o en la periferia del gránulo; entre ellos se observan algunos gránulos de contenido central muy electronodenso (Figs. 26, 30a-c). El contenido de todos estos gránulos se marca con la técnica de IgG-oro (Fig. 30d).

Las células con GLU/GLP-1 son alargadas con prolongaciones que se introducen entre las células vecinas. Poseen un núcleo eucromatínico, mitocondrias grandes y escasas con crestas tubulares, cisternas dispersas de rer, complejo de Golgi formado por cortas cisternas localizadas junto al núcleo, así como lisosomas (Figs. 26 y 31). Los gránulos de secreción tienen un contenido electronodenso central o excéntrico. Su diámetro oscila entre los 180 y los 245 nm (Figs. 31-32a). Con la técnica IgG-oro el contenido granular se marca con los anticuerpos contra GLU y GLP-1 (Figs. 32b y c).

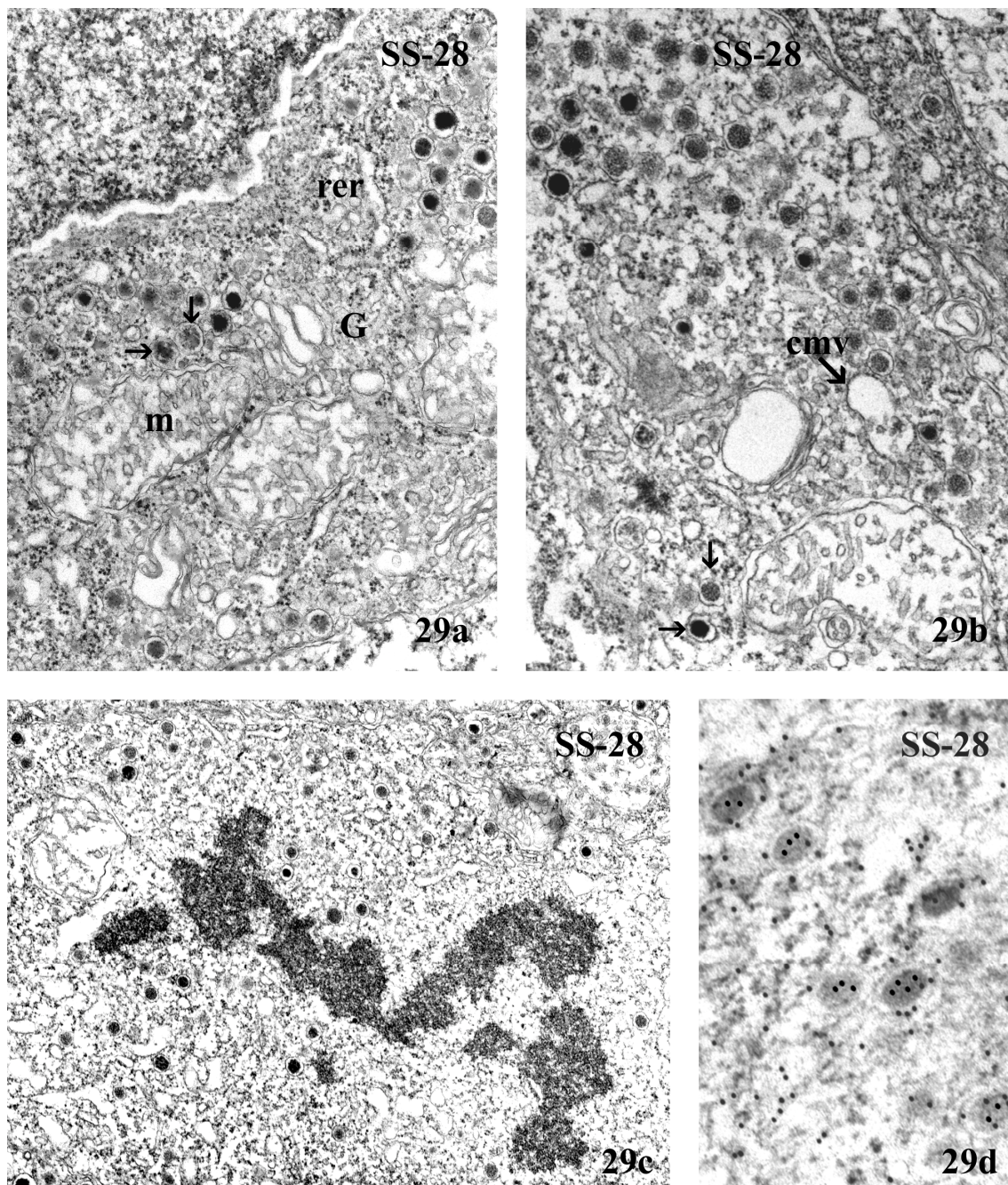


Fig 29. Células con somatostatina-28 (SS-28). **29a.** Se observan mitocondrias (m), complejo de Golgi (G) y retículo endoplasmático rugoso (rer). Nótese la presencia de dos tipos de gránulos de secreción, los que poseen un contenido central de mediana electronodensidad que ocupa casi la totalidad del gránulo (↓) y otros con un contenido muy electronodenso (→). **29b.** Detalle de los cuerpos multivesiculares (cmv) y gránulos de secreción, electronodensos (→) y de mediana electronodensidad (↓). **29c.** Célula en proceso de división. **29d.** El contenido de todos los gránulos de secreción queda inmunomarcado con oro (técnica IgG-oro). **a** x11200; **b** x17600; **c** x9600; **d** x24000.

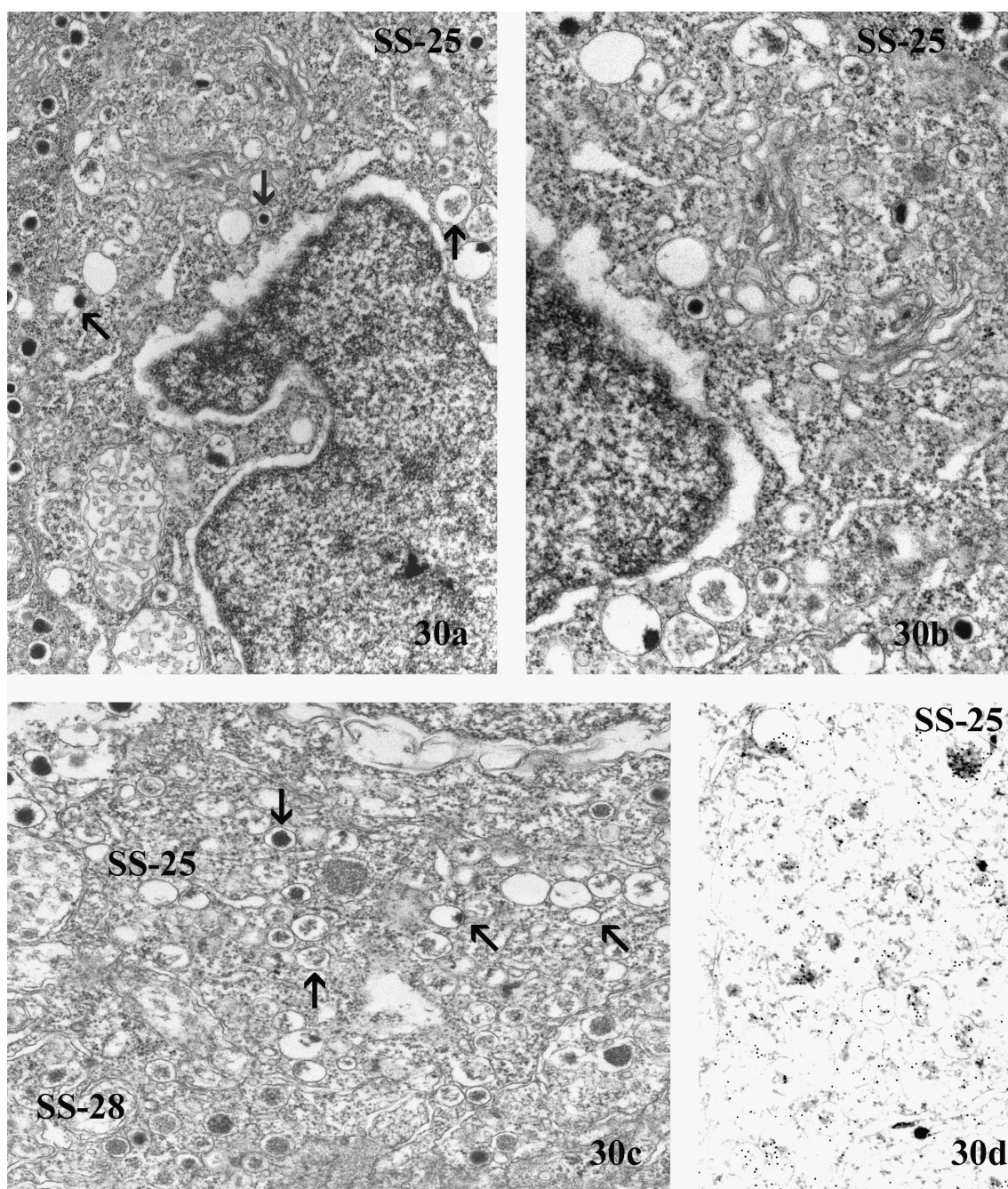


Fig. 30. Células con somatostatina-25 (SS-25). **30a.** Núcleo con indentaciones profundas. Gránulos de secreción: de contenido granular de mediana electronodensidad (↑), otros vacíos o con escaso contenido que se condensa en el centro o en la periferia del gránulo (↖) y entre ellos se observan algunos gránulos de contenido central muy electronodenso (↓). **30b.** Gránulos de secreción, obsérvese el poco desarrollo del complejo de Golgi. **30c.** Gránulos de secreción de una célula con somatostatina-25 (SS-25) en contacto con otra de somatostatina-28 (SS-28), en ella se señalan los diferentes tipos de gránulos. **30d.** El contenido interior del gránulo de SS-25, ya sea central o excéntrico, queda inmunomarcado con oro (técnica de IgG-oro). **a** x9600; **b** x17680; **c** x12600; **d** x15000.

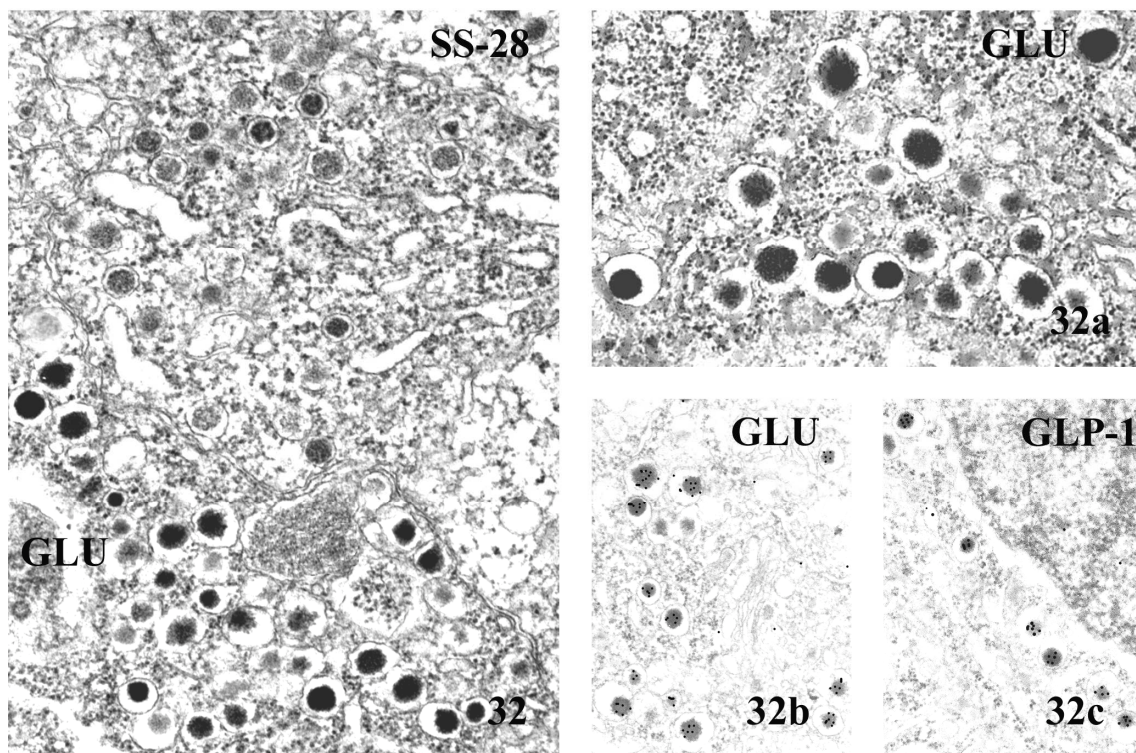
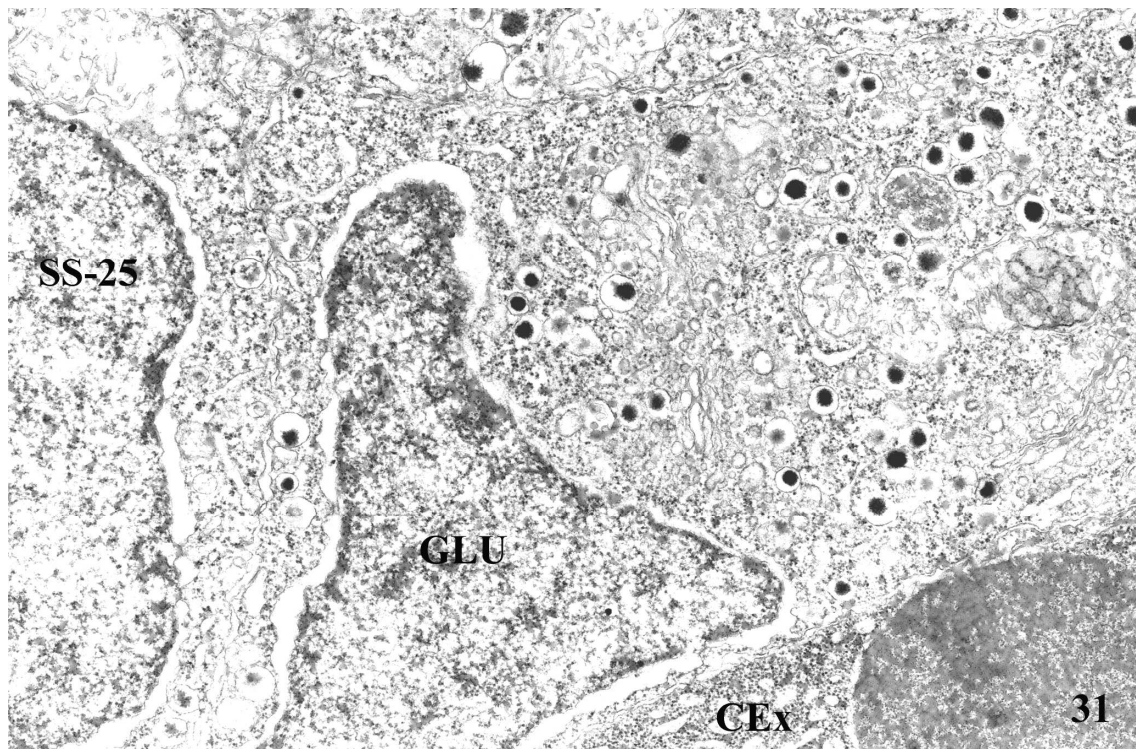


Fig. 31. Célula con glucagón (GLU) localizada junto a las células del páncreas exocrino (CEX) y células con somatostatina-25 (SS-25). Obsérvese que los gránulos de secreción tienen un contenido electronodenso central o excéntrico y un halo claro. x11440.

Fig. 32. Célula con glucagón (GLU) adyacente a una célula con somatostatina-28 (SS-28). Obsérvese la diferencia de tamaño de los gránulos de GLU frente a los de SS-28. **32a.** Gránulos de secreción de GLU. **32b y c.** El contenido granular de GLU y GLP-1 queda inmunomarcado con oro (técnica IgG-oro). **32** x15120; **a** x19200; **b** x11000; **c** x11000.

Larvas de 17 a 23 días

Durante los días 17 a 23, continúa apareciendo un islote único con la misma composición celular que en las etapas anteriores. Sin embargo, en esta etapa se ponen de manifiesto por primera vez, las células inmunorreactivas con anti-SS-14, así como algunas terminaciones nerviosas situadas entre las células endocrinas. Las células con SS-14 presentan la misma localización y las mismas características ultraestructurales que las células con SS-28 ya estudiadas y utilizando la técnica de IgG-oro marcan sus gránulos tanto los sueros de anti-SS-14 como anti-SS-28 (Figs. 33a y b). Estas células poseen las mismas características ultraestructurales de las etapas anteriores, con abundante cisternas dilatadas y dispuestas en hilera de rer, cuerpos multivesiculares, vesículas cubiertas y lisosomas secundarios, así como endosomas que contienen un material denso (Figs. 34 y 34a). Se observan dos tipos de gránulos, un tipo tiene un contenido de electronodensidad media y ocupa la casi totalidad del gránulo, con un estrecho halo claro, mientras que otro tiene un contenido más electronodenso (Figs. 33, 34 y 34a).

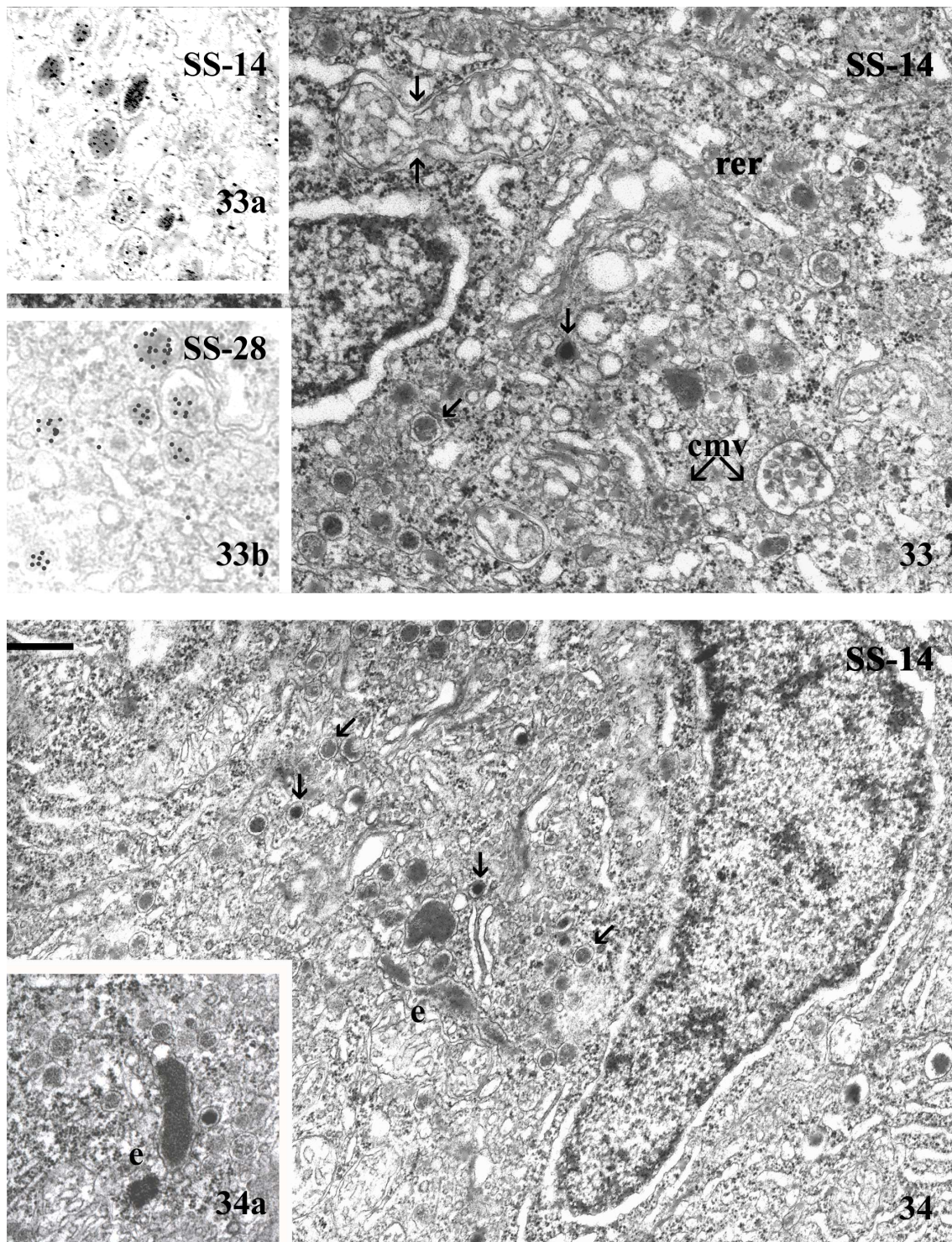


Fig. 33. Célula del islote único de larva de 19 días con somatostatina-14 (SS-14), mitocondria con estrangulamiento central (↓↑), retículo endoplasmático rugoso (rer), cuerpos multivesiculares (cmv) y gránulos de secreción, unos con contenido muy electronodenso (↓) y otros de mediana electronodensidad y un estrecho halo claro (↙). **33a y b.** Gránulos de secreción de SS28 y SS-14 inmunomarcados (técnica IgG-oro) (larva de 17 días). **33** x12350; **a** x24000; **b** x24000.

Fig. 34. Gránulos de secreción en una célula con somatostatina-14 (SS-14) (larva de 19 días), electronodensos (↓) y de mediana electronodensidad (↙), endosomas (e). **34a.** Detalle de un endosoma alargado en una célula de somatostatina-14 (SS-14) de una larva de 19 días. **34** x13000; **a** x20400.

Las células con SS-25 se localizan en la periferia del islote y están relacionadas con las células con GLU, como ocurre en los islotes de etapas anteriores (Fig. 35).

Las terminaciones nerviosas que aparecen entre células endocrinas se caracterizan por presentar neurotúbulos, neurofilamentos, algunas mitocondrias así como pequeñas vesículas de contenido electronolúcido de 100 nm de diámetro que reaccionan contra PYY con la técnica de IgG-oro (Figs. 35 y 36). Se observa inervación nerviosa tanto en la periferia, localizándose entre células de GLU y SS-25 (Fig. 35), como en el interior de los islotes, donde se localiza entre células de INS y SS-14 (Fig. 36) y entre las células de INS y las de SS-14 se observa además un capilar fenestrado y con diafragma (Fig. 36). Las células de INS, SS-25, GLU y GLP-1 muestran gránulos de secreción teñidos con IgG-oro (Figs. 36b-e).

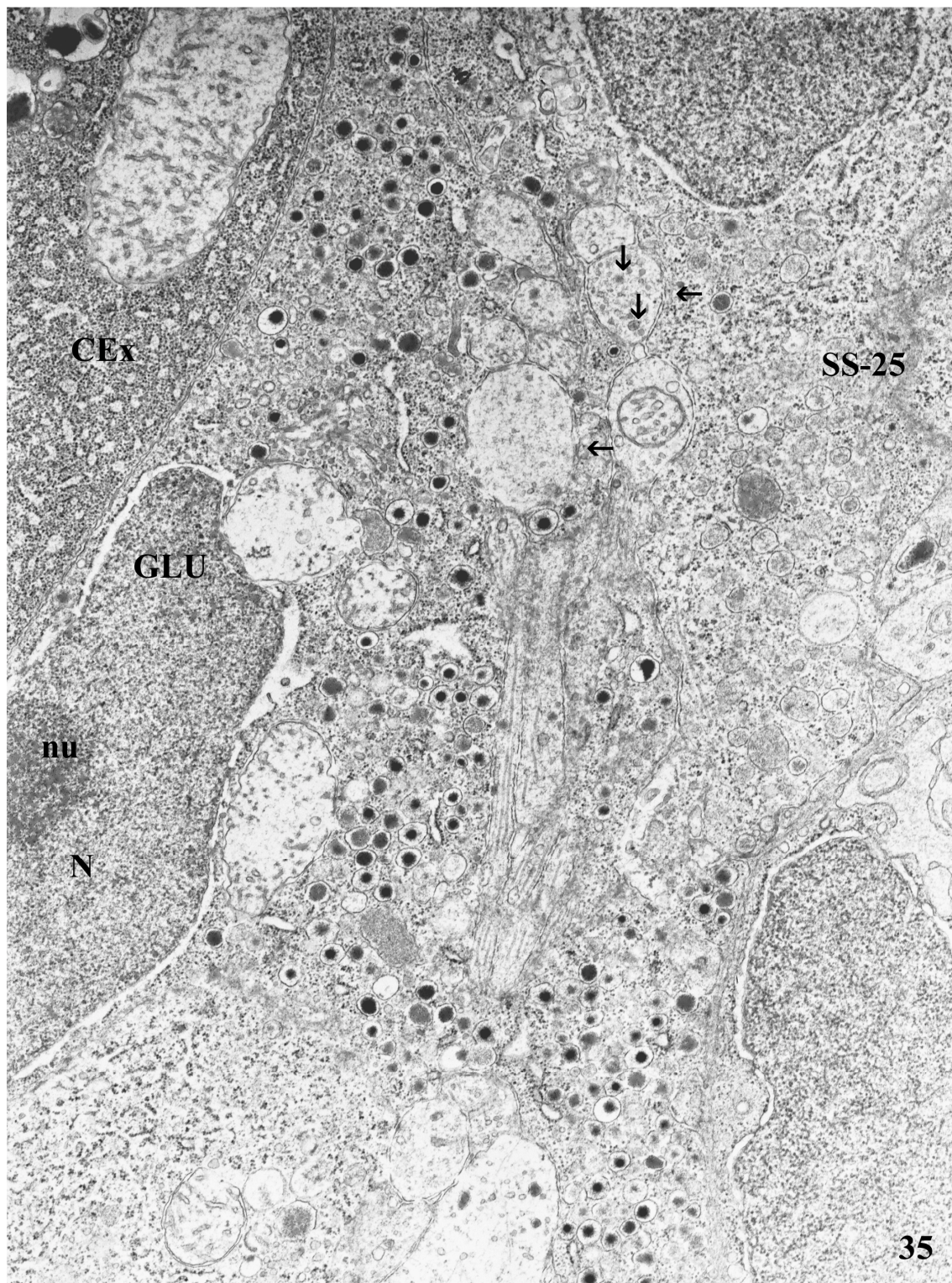


Fig. 35. Terminación nerviosa (↔) entre células de glucagón (GLU) y de somatostatina-25 (SS-25) en larvas de 23 días. La célula con GLU es adyacente a una célula exocrina (CEx) y su núcleo (N) presenta un nucléolo (nu). Obsérvense los neurotúbulos, neurofilamentos y las pequeñas vesículas de contenido electronolúcido de la terminación nerviosa (↓). x11025.

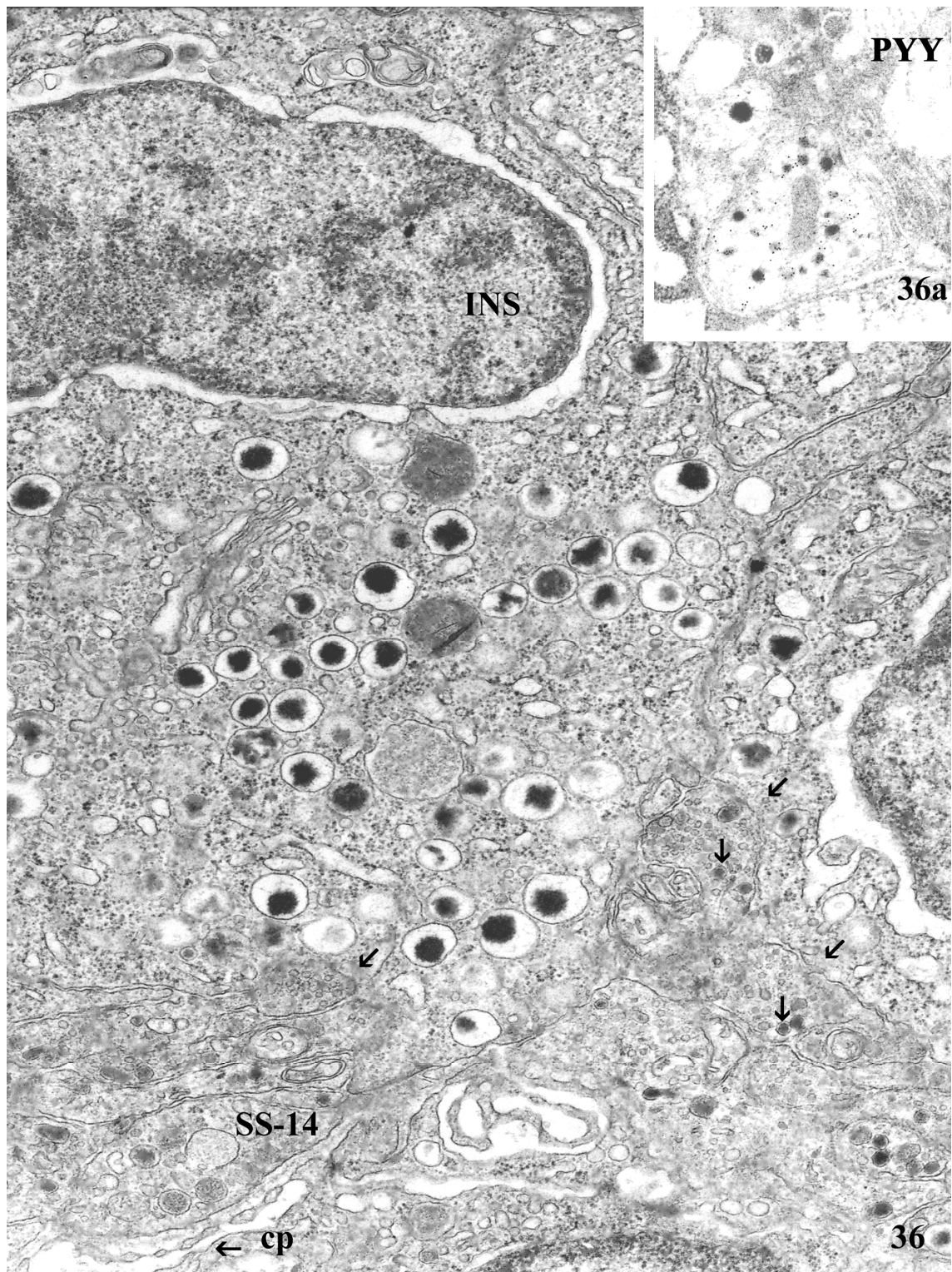


Fig. 36. Terminación nerviosa (↙) entre células de insulina (INS) y somatostatina-14 (SS-14) en una larva de 23 días, en el interior de las vesículas se pueden observar pequeños gránulos de secreción (↓). Se observa un capilar fenestrado (cp). **36a.** Los gránulos de PYY quedan inmunomarcados (técnica IgG-oro) en el interior de las terminaciones nerviosas. **36** x21700; **a** x30000.

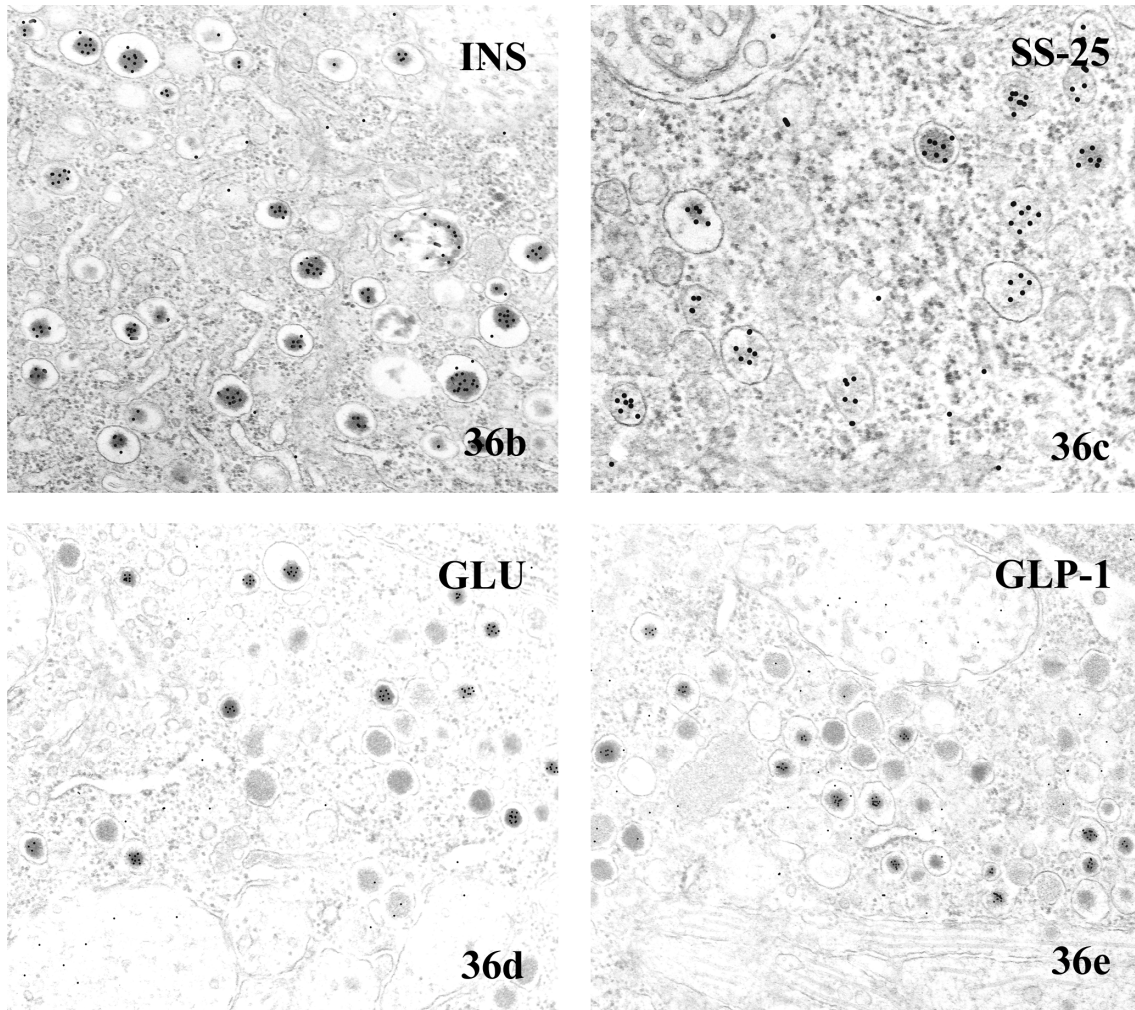


Fig. 36b. Gránulos de INS inmunomarcados con oro (técnica IgG-oro) (INS). **36c.** Gránulos de SS-25 inmunomarcados con oro (técnica IgG-oro) (SS-25). **36d.** Gránulos de GLU inmunomarcados con oro (técnica IgG-oro). **36e.** Gránulos de GLP-1 inmunomarcados con oro (técnica IgG-oro) (GLP-1). Todas las secciones pertenecen a una larva de 17 días. **b** x24000; **c** x18000; **d** x12000; **e** x12000.

Larvas de 24 a 51 días

A los 24 días aparece un islote grande y otro pequeño, el número de islotes pequeños va aumentando conforme avanza el desarrollo del páncreas. En el islote pequeño se han observado células endocrinas adyacentes o formando parte de los conductos pancreáticos, que están formados por células bajas relacionadas por estructuras de unión en su zona apical, la luz del conducto aparece ocupada por material de secreción que también se observa entre los espacios intercelulares de las células epiteliales que forman parte del conducto (Figs. 37-40).

Estas células presentan prominentes núcleos ovalados, grandes mitocondrias alargadas o redondeadas y cortas vesículas aisladas de rer, muestran estructuras de unión apicales (Figs. 37-40).

En algunas de estas células que forman parte del conducto se observan escasos y pequeños gránulos de secreción (Fig. 38).

Los islotes pequeños presentan la misma composición celular y localización de los distintos tipos celulares endocrinos que el islote grande, sin embargo, es en estos islotes donde aparecen por primera vez a los 30 días de desarrollo unas células alargadas, con prolongaciones, próximas a las células del páncreas exocrino, que presentan un núcleo ovalado, escasas mitocondrias redondeadas o alargadas con crestas tubulares y cortas cisternas de rer.

Los gránulos de secreción son pequeños y escasos, tienen un diámetro medio de 98 nm, presentan un contenido de electronodensidad media que pueden contener NPY/GLU/GLP-1 según los estudios con microscopía óptica (Figs. 37-40).

En el islote grande, las células endocrinas tienen la misma localización y ultraestructura que en etapas anteriores, variando el tamaño de los gránulos de secreción, los de INS tienen un diámetro medio de 200 nm, los de SS-25 entre 220 y 300 nm, SS-14/28 de 200nm y los de GLU/GLP-1 con un diámetro entre 150 y 200 (Fig. 41).

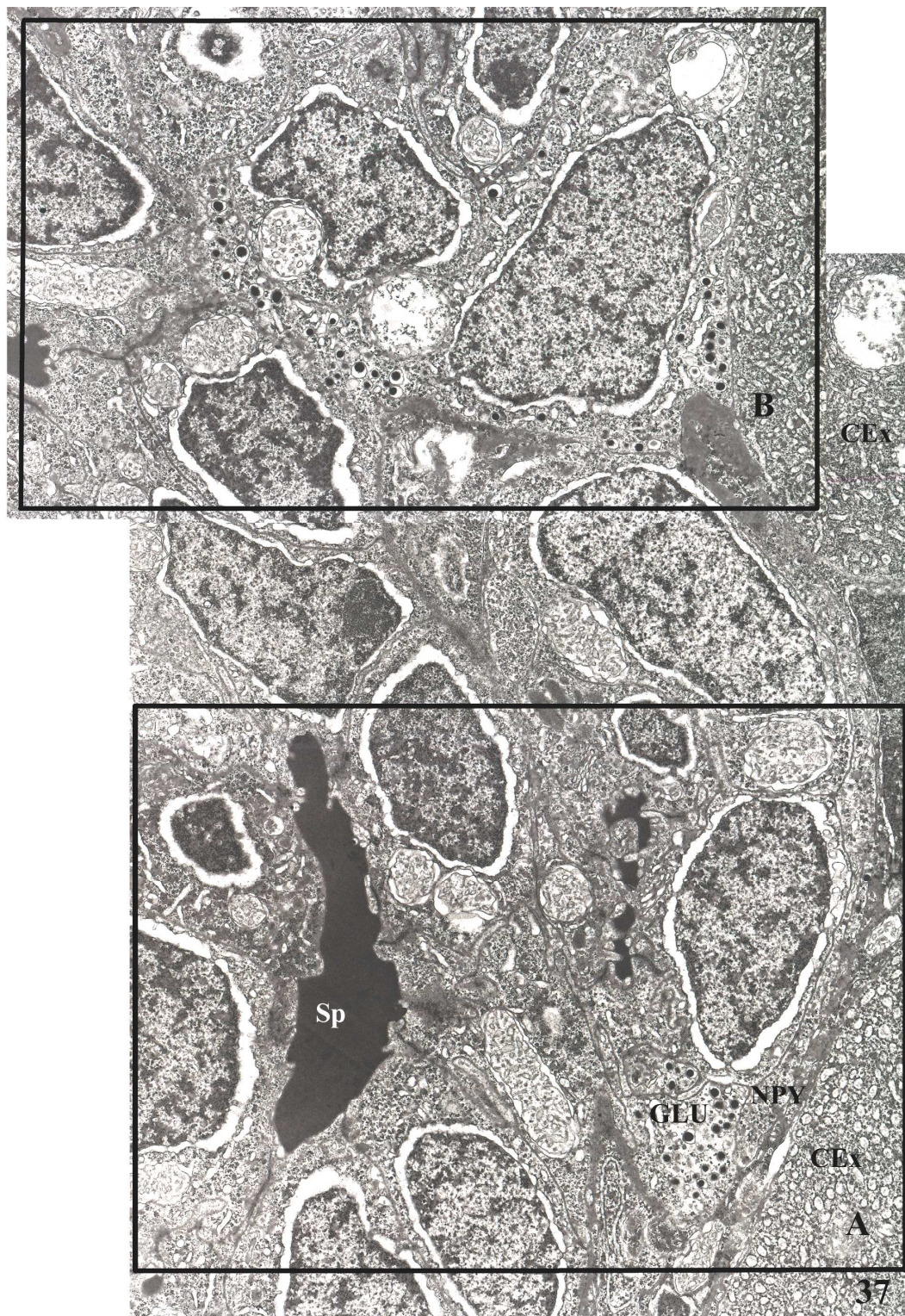


Fig. 37. Vista general de un islote pequeño pancreático de una larva de 37 días. Aparecen por primera vez células muy alargadas con gránulos de neuropéptido tirosina (NPY), próximas a las células del páncreas exocrino (CEX) y a células de glucagón (GLU). Obsérvese la secreción pancreática (sp). x5000.

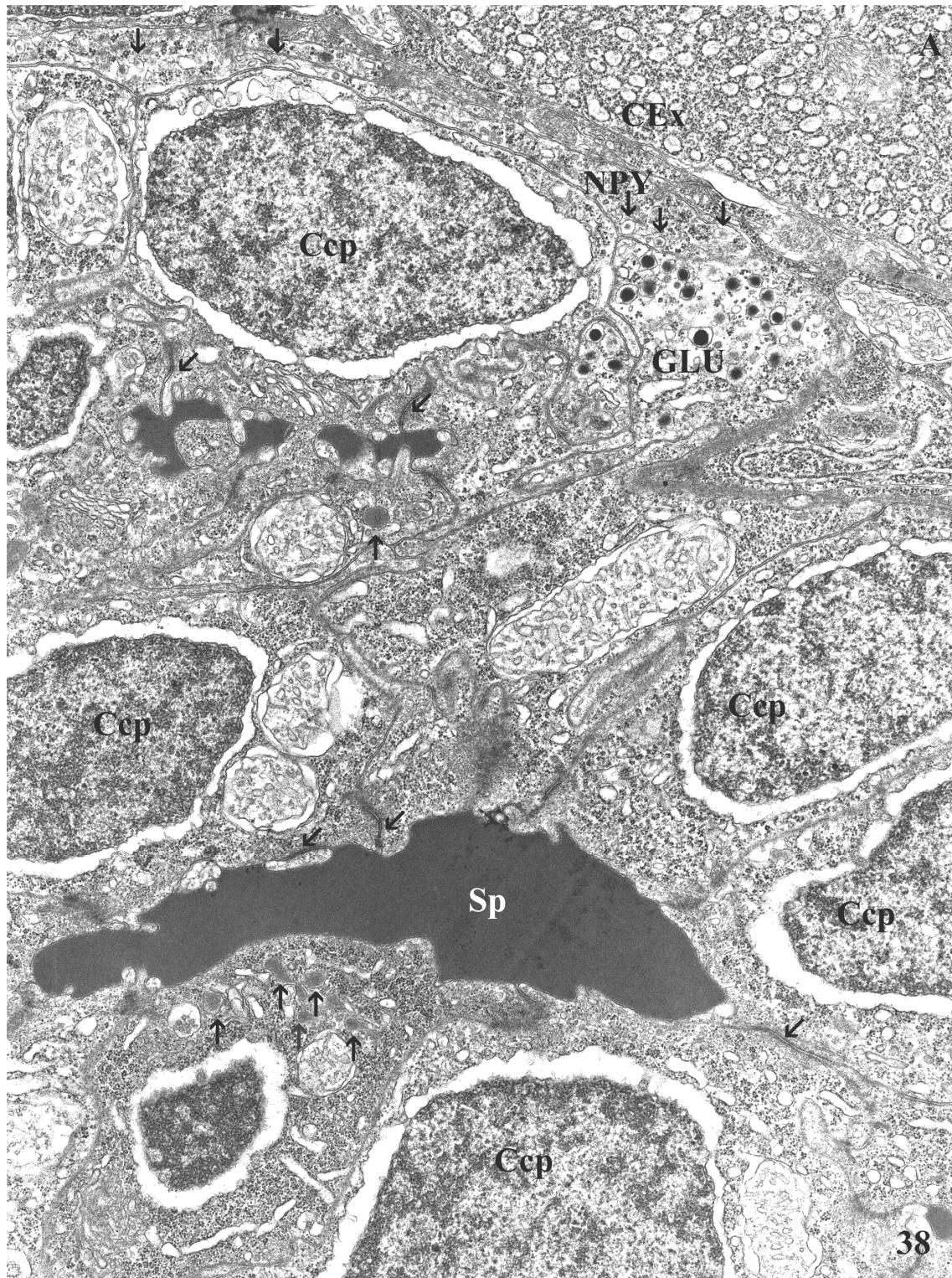


Fig. 38. Ampliación de la zona A de la Fig. 37, donde se observa la célula con neuropéptido tirosina (NPY) con gránulos de secreción pequeños y escasos y electronodensidad media (↓), próximas a las células de glucagón (GLU) y del páncreas exocrino (CEx). Obsérvese que las células que rodean al conducto pancreático (Ccp) presentan gránulos de secreción (↑) y se encuentran unidas mediante estructuras de unión (↔). Secreción pancreática (Sp). Larva de 37 días. x7500.

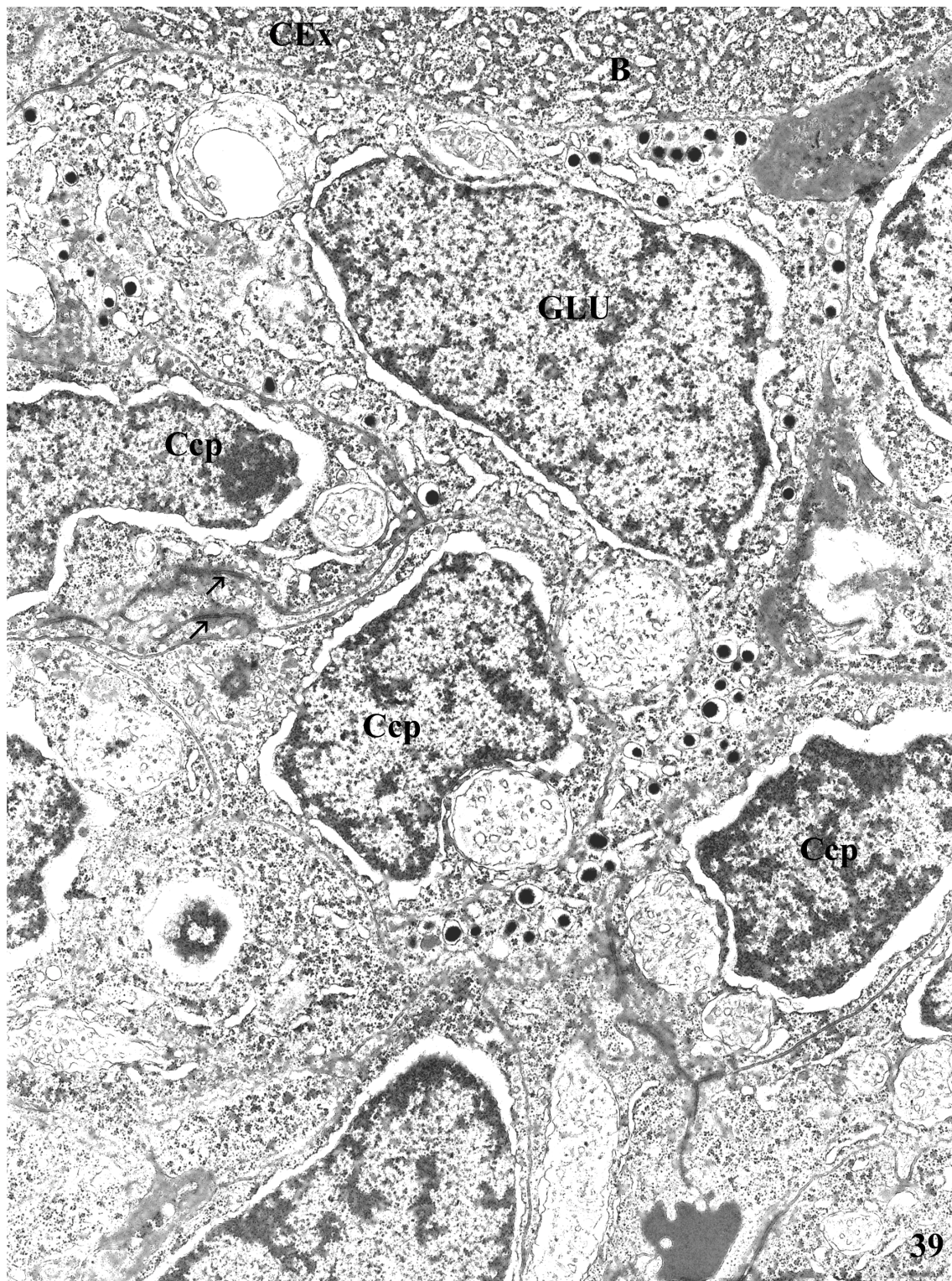


Fig. 39. Ampliación de la zona B de la Fig. 37, donde se observan una célula con glucagón (GLU) próxima a una célula exocrina (CEx) y a las células del conducto pancreático (Ccp) mostrando estructuras de unión apicales (↗) y grandes mitocondrias. Larva de 37 días. x8550.

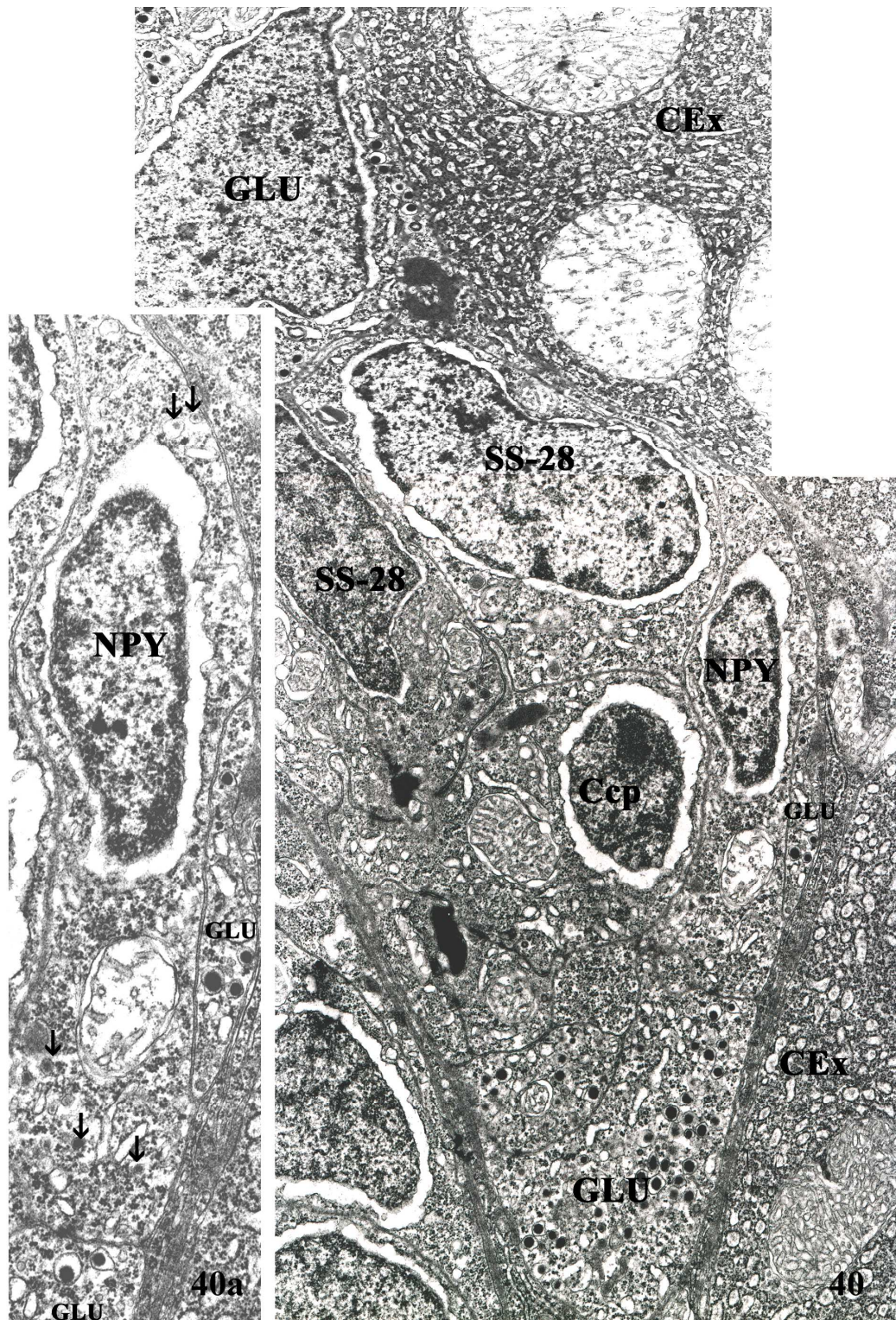


Fig. 40. Vista general de un islote pequeño del páncreas de una larva de 37 días donde se observan células del páncreas exocrino (CEx), células con glucagón (GLU), células con gránulos de somatostatina-28 (SS-28) y célula con neuropéptido tirosina (NPY). Nótese la forma alargada de la célula con NPY y la presencia de células del conducto pancreático (Ccp). **40a.** Ampliación de la célula con neuropéptido tirosina (NPY) donde se señalan los gránulos de secreción (↓) y la proximidad de la célula con glucagón (GLU). **40** x3465; **a** x9300.

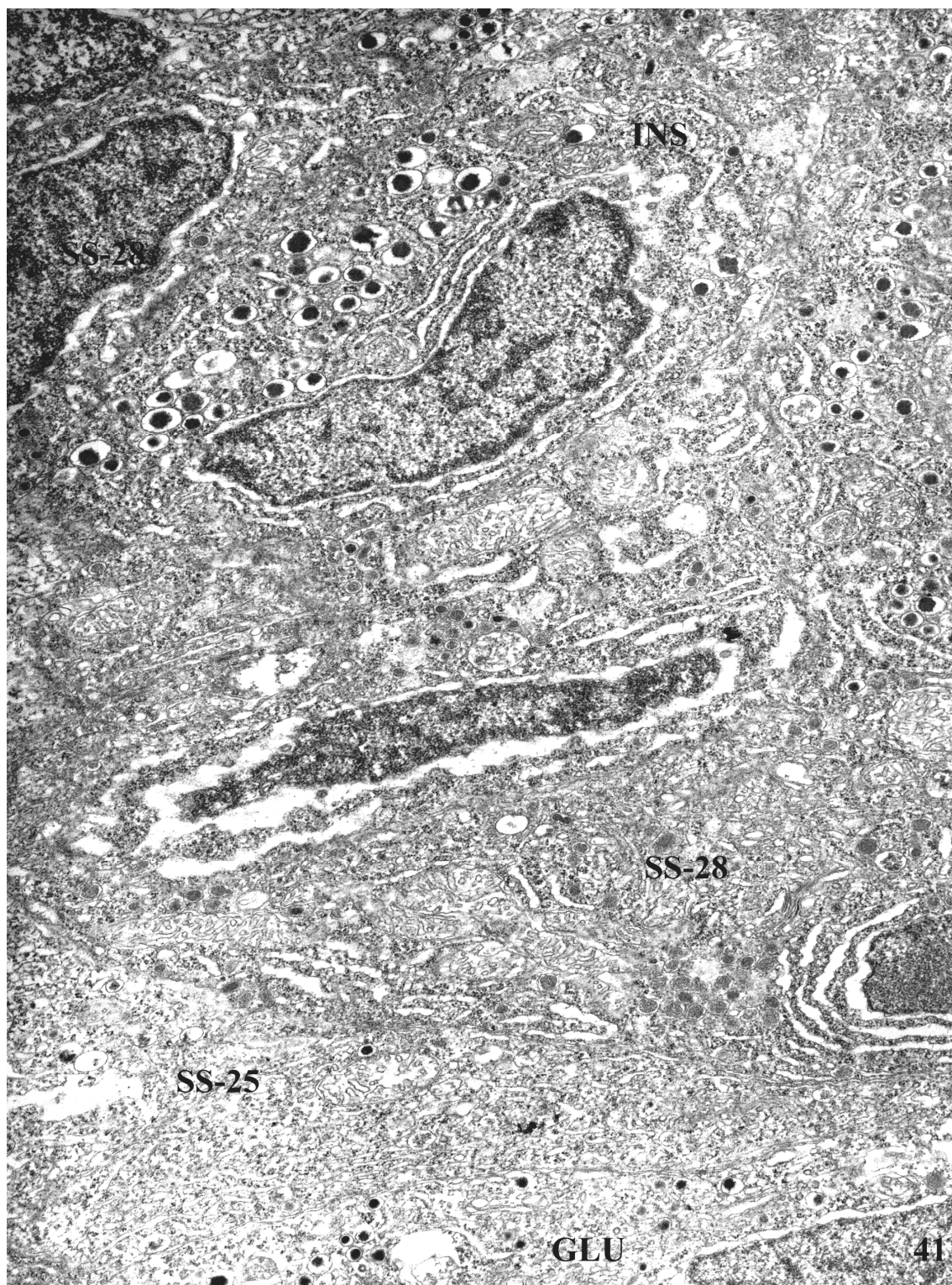


Fig. 41. Vista general del islote grande del páncreas endocrino de una larva de 40 días. Obsérvense los diferentes tamaños y electronodensidad de los gránulos de los distintos tipos celulares. Célula con glucagón (GLU), célula con gránulos de insulina (INS), célula con gránulos de somatostatina-25 (SS-25), célula con gránulos de somatostatina-28 (SS-28). x8250.

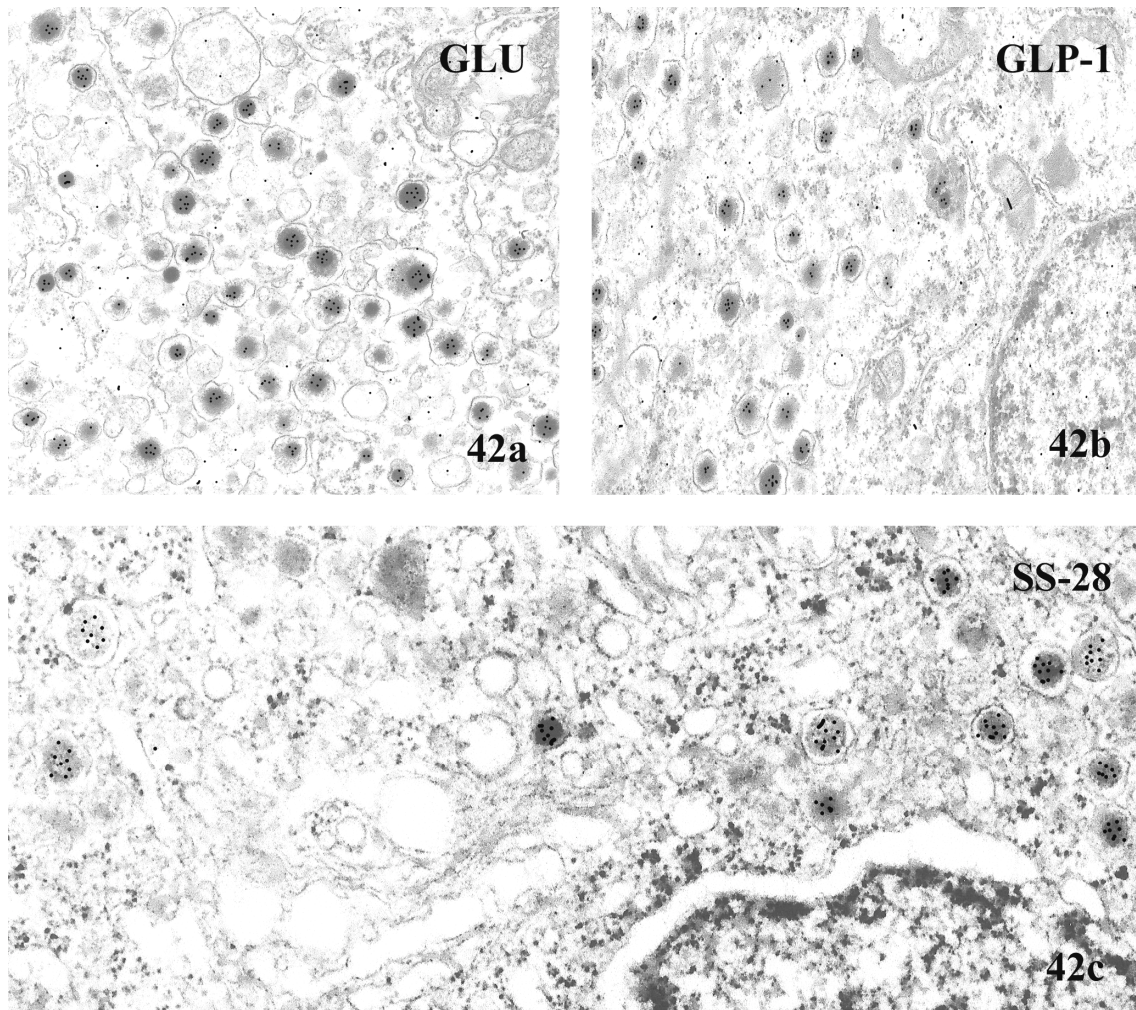


Fig. 42. Los gránulos de secreción en el islote grande de diferentes hormonas son inmunomarcados con oro por la técnica IgG-oro. **42a.** Célula de glucagón inmunorreactiva (GLU). **42b.** Célula de GLP-1 inmunorreactiva (GLP-1). **42c.** Célula de somatostatina-28 inmunorreactiva (SS-28). Todas las secciones pertenecen a una larva de 40 días. x16000.

Larvas de 51 a 114 días

A partir de los 51 días de desarrollo, el páncreas endocrino se encuentra completamente diferenciado, manteniéndose la localización y relación directa que venía observándose en etapas anteriores entre las células con INS y SS-28 situadas en la región central de los islotes (Fig. 43) y la existente entre las células con GLU y SS-25 dispuestas en la periferia (Figs. 44, 45, 47, 48, 51).

En esta etapa, se observan por primera vez en la periferia del islote principal, además de células con inmunorreactividad exclusivamente a GLU/GLP-1, escasas células endocrinas que muestran coexistencia a GLU, GLP-1, NPY y PYY. Estas células suelen ser de forma alargada y se presentan junto al páncreas exocrino o entre las células con SS-25 (Figs. 44 y 47). Poseen un núcleo excéntrico eucromatínico así como un desarrollado complejo de Golgi, pequeñas mitocondrias, escasas y cortas cisternas de rer y numerosos gránulos de secreción pequeños y dispersos por todo el citoplasma con un contenido electronodenso o de mediana electronodensidad que ocupa casi la totalidad del gránulo, dejando únicamente un estrecho halo claro de separación con la envoltura granular (Figs. 44 y 47). El contenido granular mostró inmunorreactividad positiva a GLU, GLP-1, NPY y PYY (Figs. 44a-d).

Los gránulos de secreción de las células que contienen sólo GLU son diferentes a los descritos, con dos tipos de gránulos de 292 nm de diámetro, unos de contenido central, altamente electronodenso rodeados por un contenido disperso de electronodensidad media y un estrecho halo claro y otros, similares a las células de coexistencia, muy electronodensos y con un halo claro, pero que tampoco reaccionan con la técnica de IgG-oro a otros polipéptidos de la familia del NPY (Figs. 45-48).

Se observan las características ultraestructurales propias de cada uno de los tipos celulares endocrinos descritos anteriormente pero con algunas modificaciones. Así, es frecuente encontrar endosomas de contenido homogéneo y distinta morfología pudiendo ser esféricos en células con INS y en forma de pesa en células con SS-28 (Figs. 43 y 49). Son numerosos los cuerpos multivesiculares (Figs. 46a, d, e y 48b) algunos de los cuales contienen el gránulo de secreción completo (Fig. 46d) o bien solamente el contenido granular (Fig. 46e). En los extremos dilatados de las cisternas de la cara de maduración que forman el complejo de Golgi destaca, en casi todos los tipos celulares, un material electronodenso semejante al que contienen algunos de los gránulos de secreción (Figs. 43 y 45) y lisosomas secundarios (Fig. 46a).

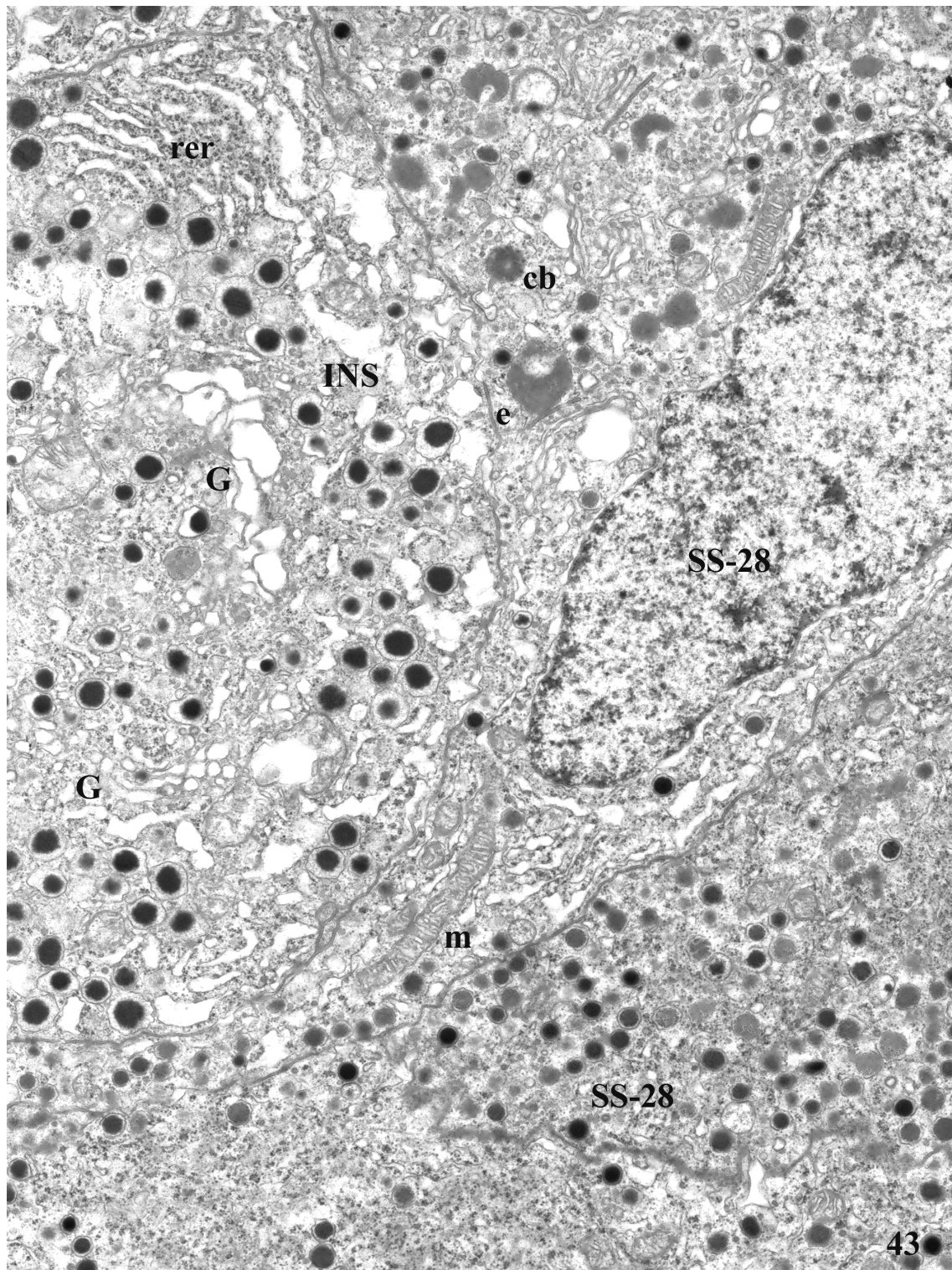


Fig. 43. Células de insulina (INS) y de somatostatina-28 (SS-28) en el islote principal de una larva de 56 días. En la célula de SS-28 destaca la presencia de varios endosomas (e), mitocondrias alargadas (m), corpúsculo basal (cb). En la célula con insulina (INS), destaca un complejo de Golgi (G) muy dilatado que a veces contiene un material electronodenso y largas cisternas paralelas de retículo endoplásmico rugoso (rer). x 8272.

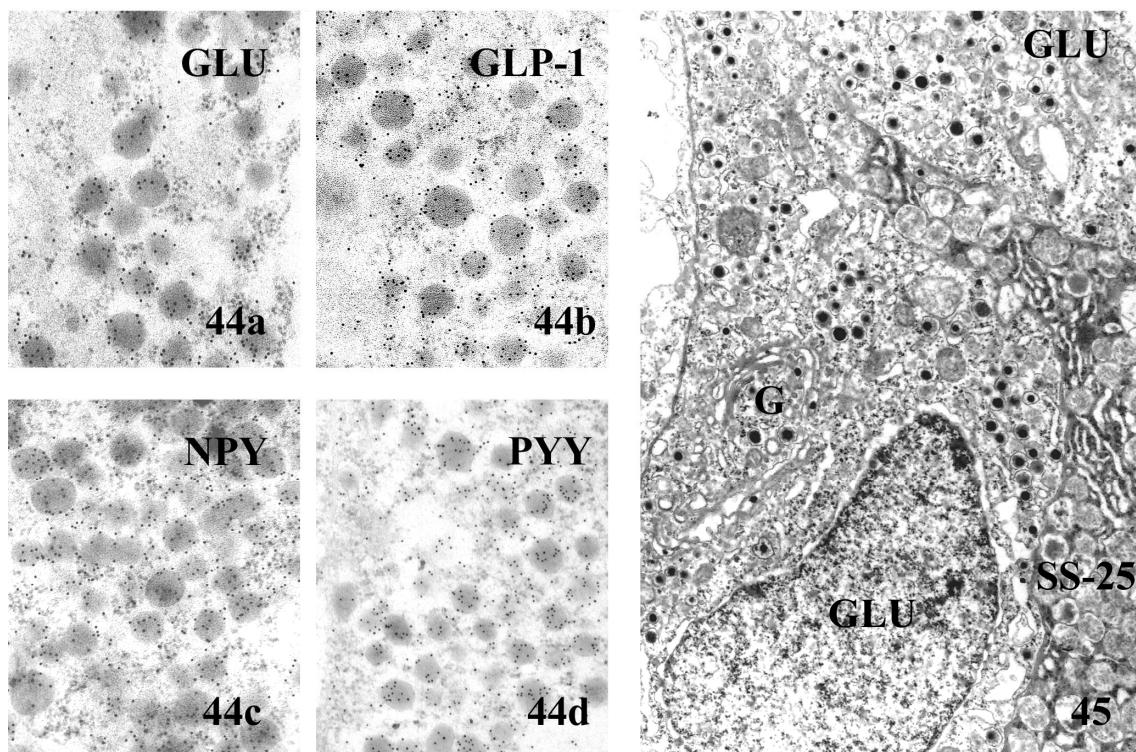
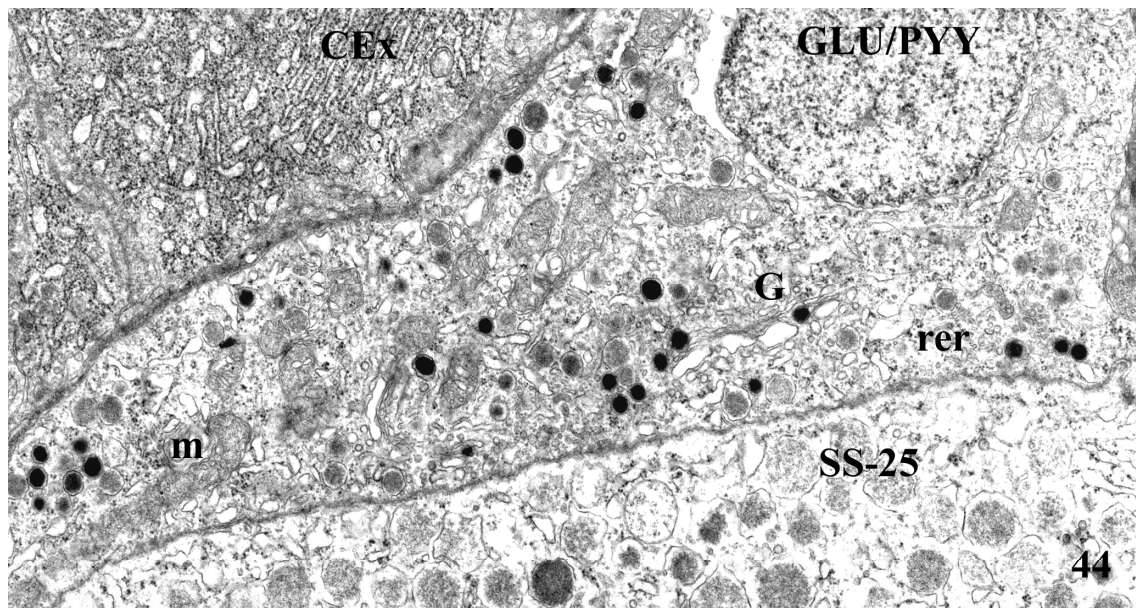


Fig. 44. Células con coexistencia glucagón/ neuropeptido tirosina (GLU/NPY), junto a células del páncreas exocrino (CEx) y de somatostatina-25 (SS-25), presentan gránulos de secreción muy electronodensos que ocupan la casi totalidad del gránulo y de electronodensidad media. Mitocondrias (m), retículo endoplasmático rugoso (rer) y complejo de Golgi (G) con material muy electronegativo en sus extremos. **44a-d.** Gránulos de secreción inmunomarcados con oro (técnica IgG-oro). **44a.** GLU. **44b.** GLP-1. **44c.** NPY. **44d.** PYY. Todas las secciones corresponden a larvas de 65 días. **44** x7500; **a** x12460; **b** x10600; **c** x10850; **d** x9.500; **e** x9450.

Fig. 45. Células con glucagón (GLU) en una larva de 65 días. Gránulos de secreción de contenido de media o elevada electronodensidad que a veces se dispersa, rodeados por un halo claro. Complejo de Golgi (G). Obsérvese una célula involutiva de somatostatina-25 (SS-25). x7040.

Las mitocondrias disminuyen en número en todos los tipos celulares endocrinos a lo largo de esta etapa, aunque en las células con GLU se han observado algunas con un estrangulamiento central que indicaría un posible proceso de división (Fig. 46b).

Junto a la membrana plasmática de varias células endocrinas, se aprecian corpúsculos basales (Fig. 43), relacionados con ellos se observan microtúbulos que discurren entre los gránulos de secreción de las células con GLU (Fig. 46c).

Los gránulos de secreción de las células con SS-25 ocupan completamente el citoplasma, tocándose unos gránulos con otros; tienen baja electronodensidad, algunos parecen vacíos y otros gránulos tienen contenidos muy electronodensos, el diámetro medio es de 557 nm (Figs. 44, 47 y 48a).

Con la técnica inmunocitoquímica IgG-oro, los diferentes anticuerpos marcados con las partículas de oro de 10 nm se observan en el contenido granular de los distintos tipos de células endocrinas (Figs. 44a-d y 50a-f).

Se han observado, en el islote principal, células endocrinas en diferentes estadios de involución posiblemente apoptóticos, las cuales se caracterizan por presentar una matriz citoplasmática electronodensa, núcleo alargado, a veces indentado, con grumos de heterocromatina y 1 ó 2 nucléolos prominentes, cisternas de retículo endoplásmico dilatadas y numerosos gránulos de secreción con halo que ocupan todo el volumen citoplasmático aprisionando a los orgánulos celulares (Figs. 45, 50b, 51-54). Algunas de estas células se han inmunomarcado con IgG-oro, como las de INS, SS-25, PYY y SS-28 (Figs. 50b, 52a, 53a y 54a).

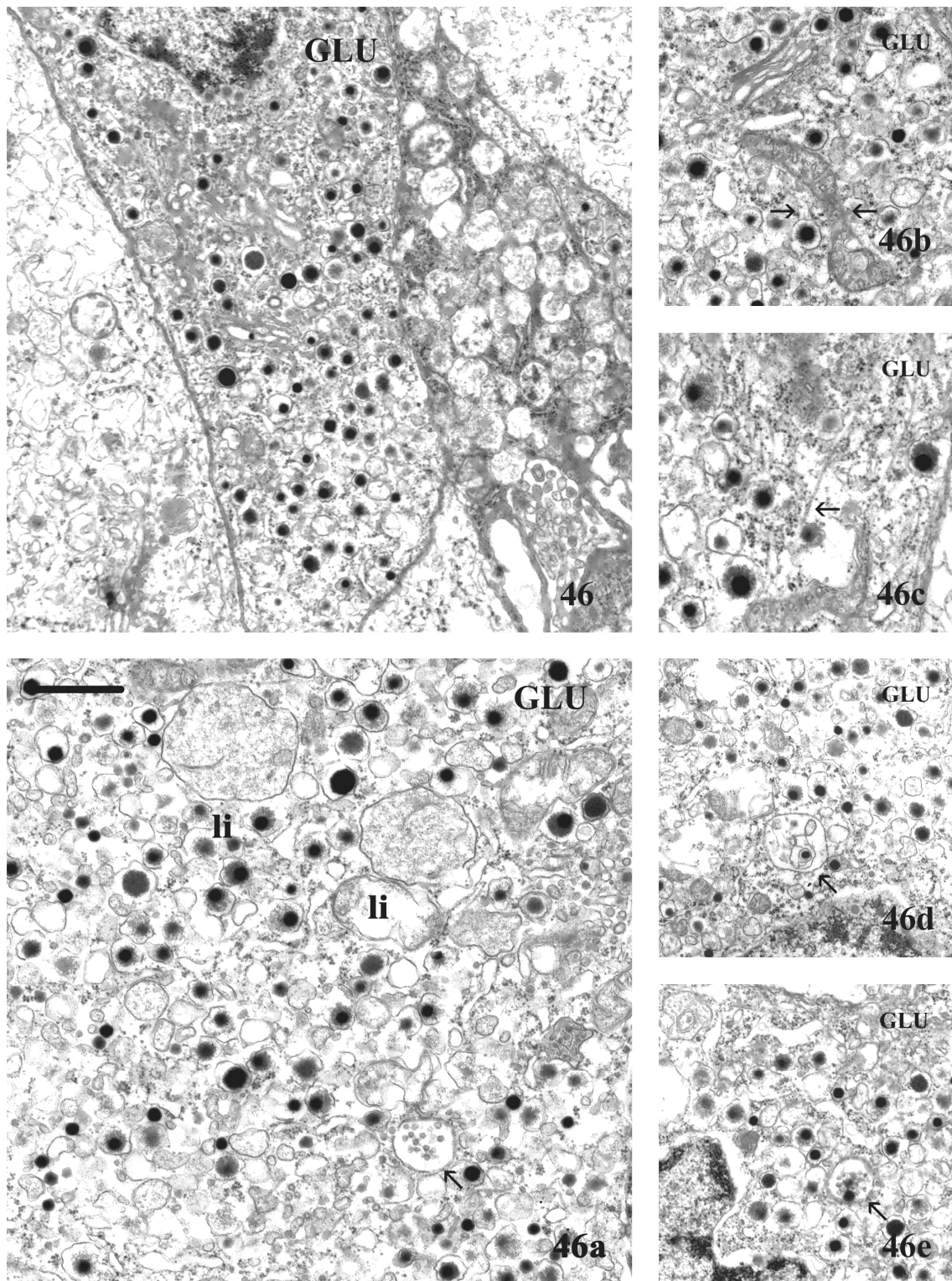


Fig. 46. Detalle de células con glucagón (GLU). **46a.** Lisosomas (li) y un cuerpo multivesicular (↗). **46b.** Mitocondria en proceso de división (↔). **46c.** Microtúbulos (←). **46d.** Cuerpo multivesicular con un gránulo de secreción completo (↗). **46e.** Cuerpo multivesicular con el contenido de un gránulo de secreción. Todas las secciones corresponden a una larva de 65 días. **46** x7500; **a** x12460; **b** x10600; **c** x10850; **d** x9500; **e** x9450.

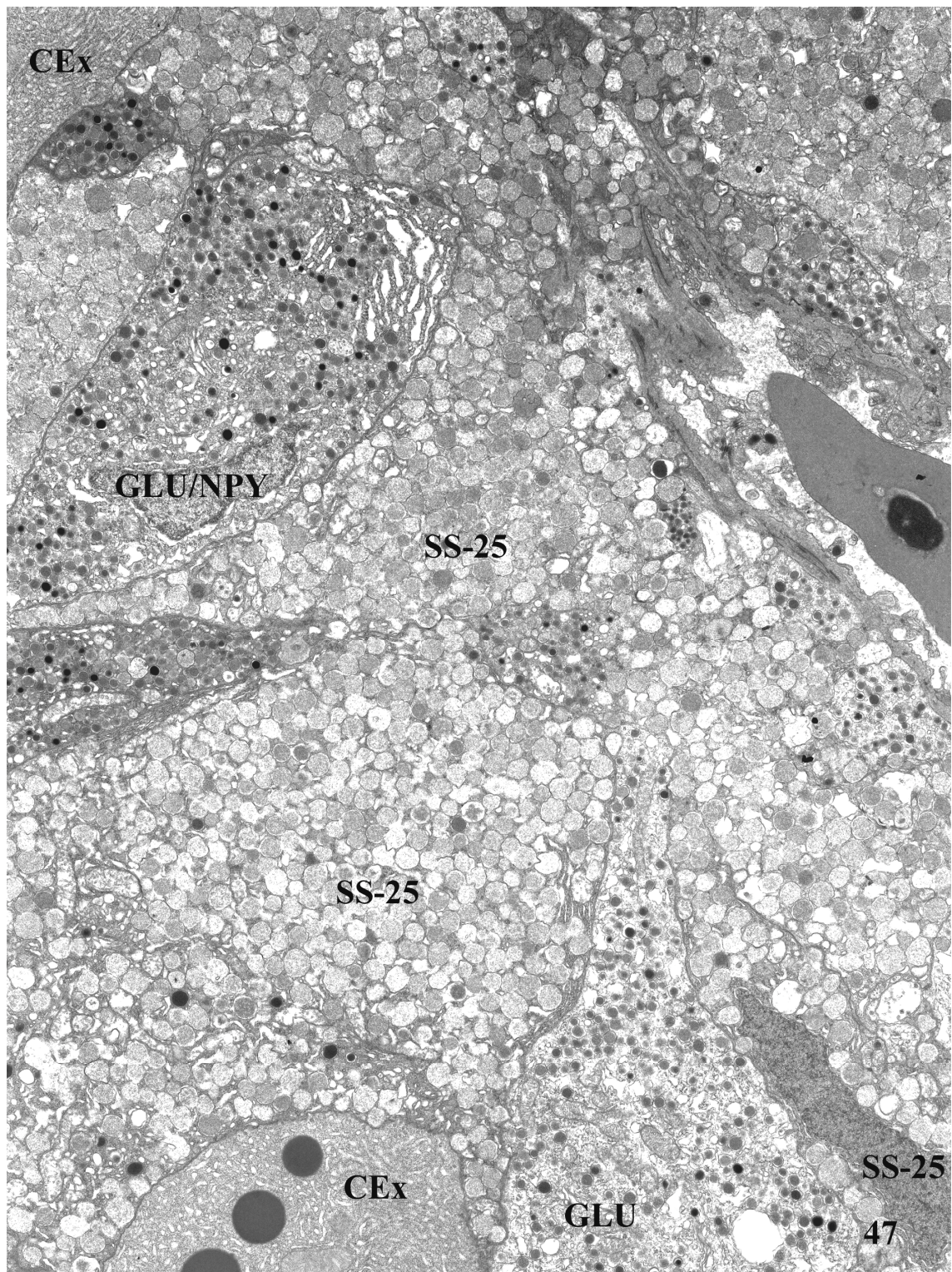


Fig. 47. Vista general de una sección pancreática con células del páncreas exocrino (CEX) y células endocrinas de una larva de 114 días. Obsérvese las diferentes características de los gránulos de secreción de las células con glucagón (GLU) y de las células con glucagón/ neuropéptido tirosina (GLU/NPY). Obsérvese que los gránulos de secreción de las células con somatostatina-25 (SS-25) ocupan la casi totalidad de la célula. x4150.

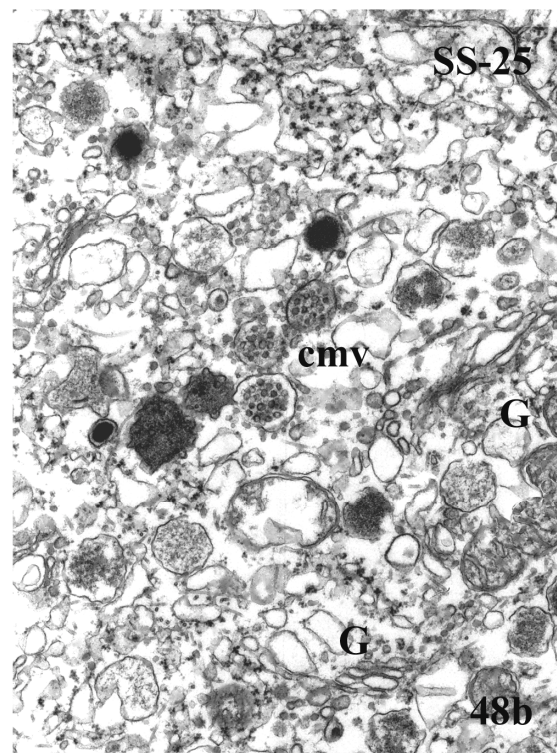
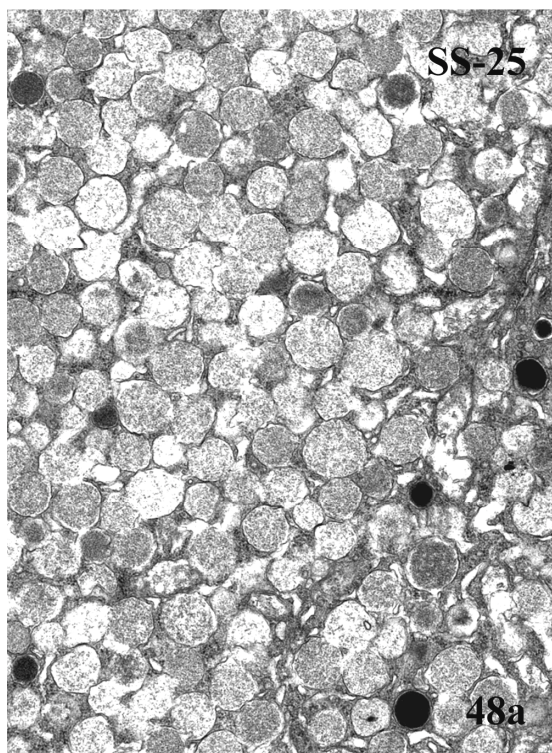
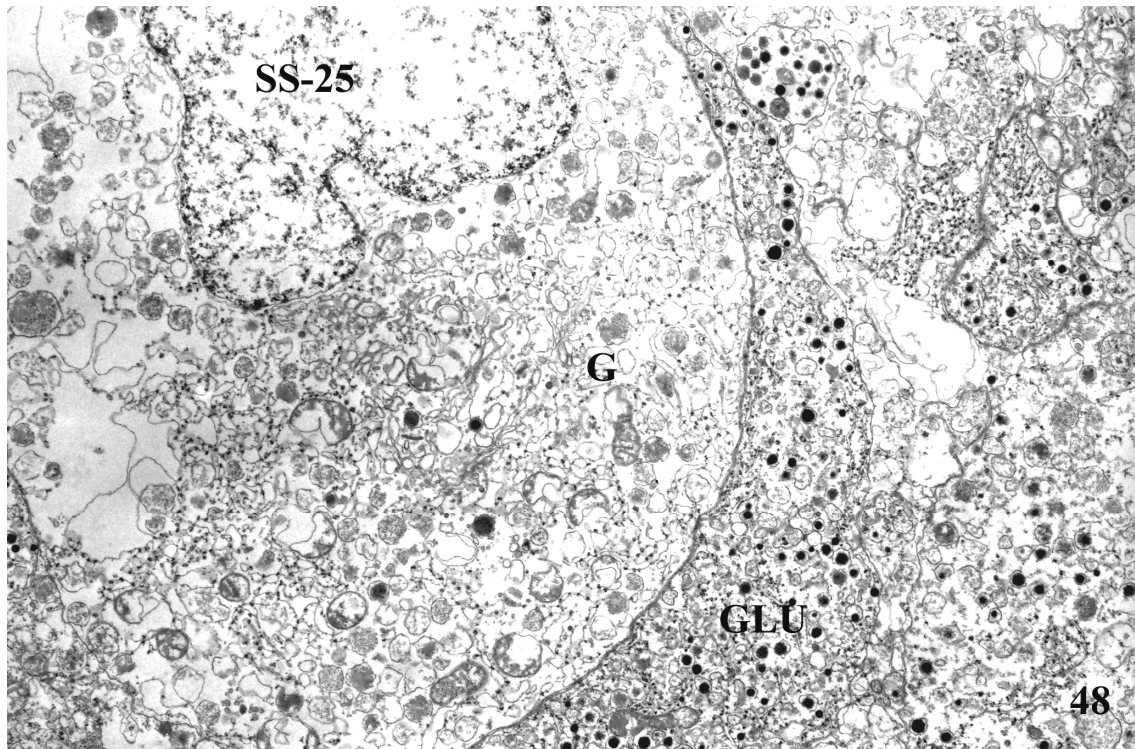


Fig. 48. Células con somatostatina-25 (SS-25). Nótese que los gránulos de SS-25 y los de las células con glucagón (GLU) tienen diferente tamaño (larva de 65 días). **48a.** Los gránulos más abundantes tienen electronodensidad media o baja y entre ellos destacan unos gránulos con electronodensidad muy alta (larva de 114 días). **48b.** Cuerpos multivesiculares (cmv) y complejo de Golgi (G) (larva de 65 días). **48** x5000; **a** x9500; **b** x10500.

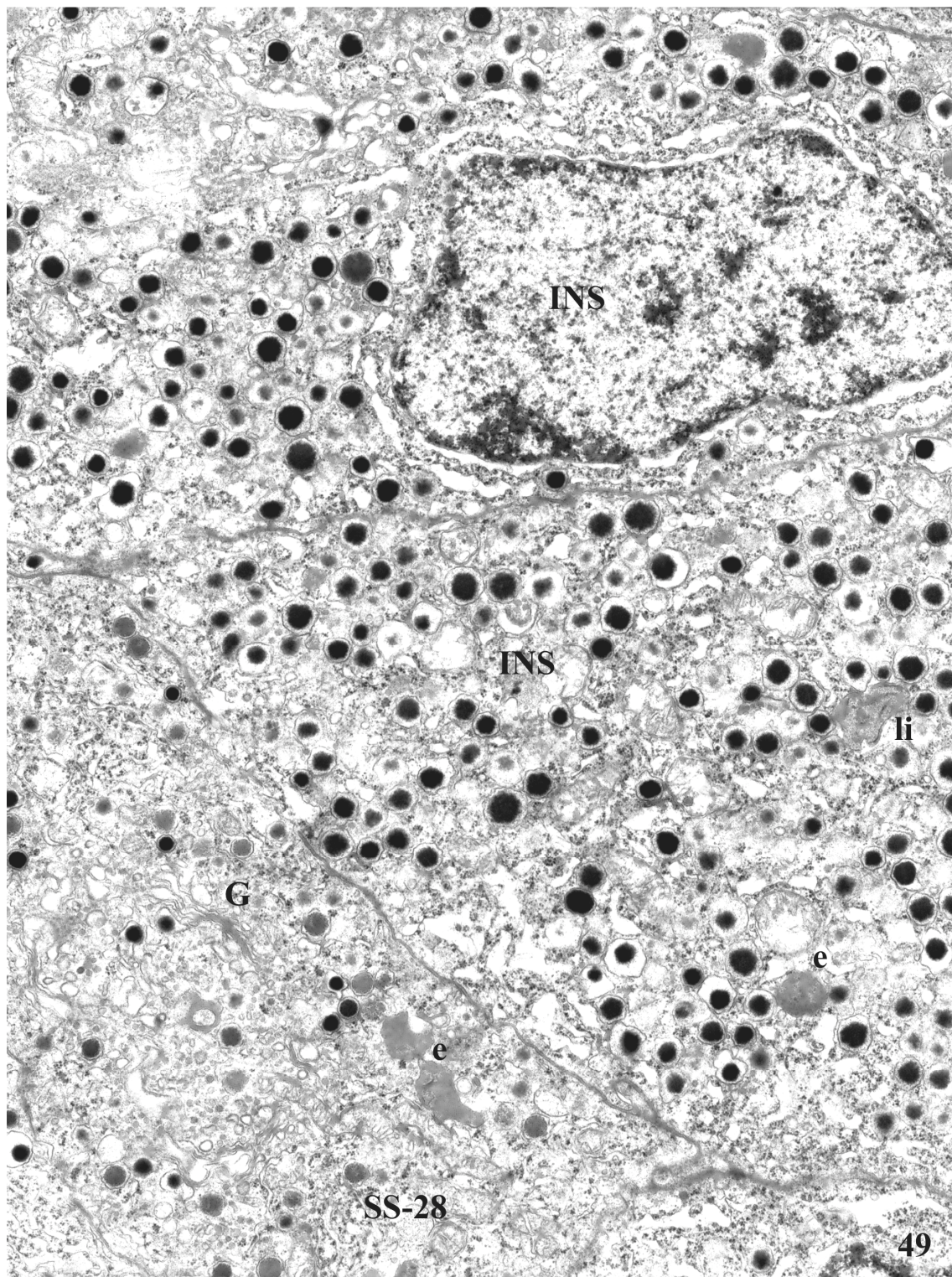


Fig. 49. Células con insulina (INS) y somatostatina-28 (SS-28) en una sección de una larva de 65 días. En la célula con SS-28 destacan los endosomas y el complejo de Golgi (G). En las de INS destacan el endosoma (e) y un lisosoma (li). x16000

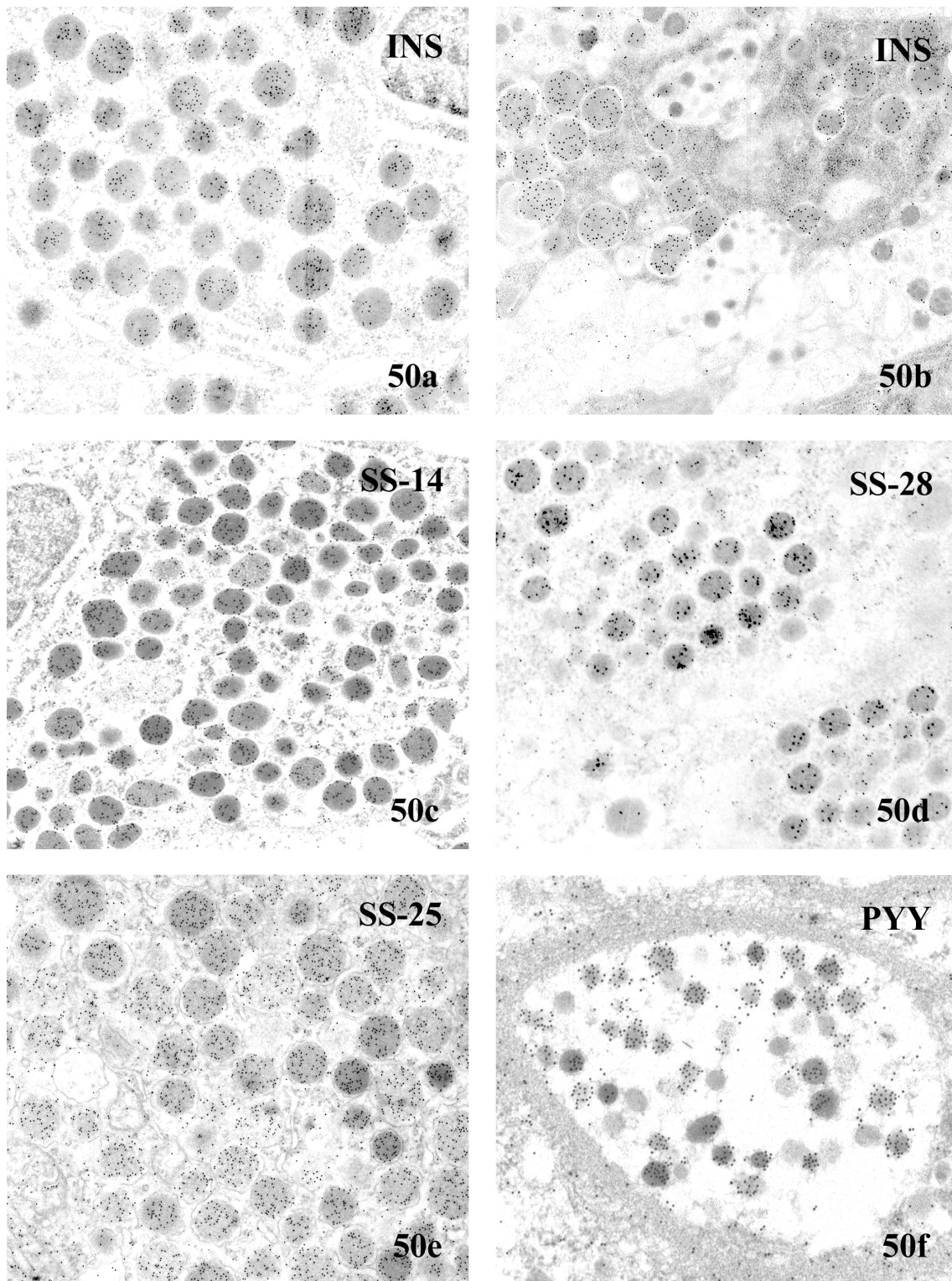


Fig. 50. Gránulos de secreción inmunomarcados con oro con la técnica IgG-oro en una larva de 114 días. **50a.** Insulina (INS). **50b.** Célula involutiva de insulina (INS) con gránulos inmunomarcados. **50c.** Somatostatina-14 (SS-14). **50d.** Somatostatina-28 (SS-28). **50e.** Somatostatina-25 (SS-25). **50f.** Inervación, gránulos inmunomarcados de PYY (PYY). **a** x8500; **b** x6550; **c** x13545; **d** x13420; **e** x17200; **f** x21300.

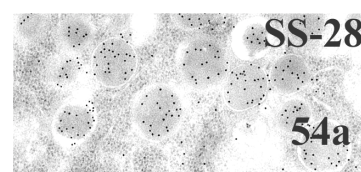
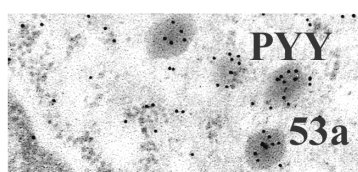
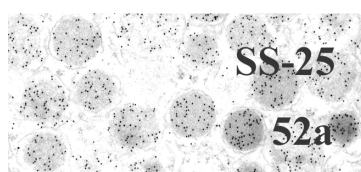
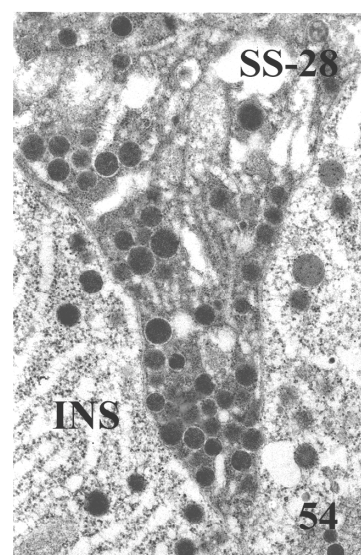
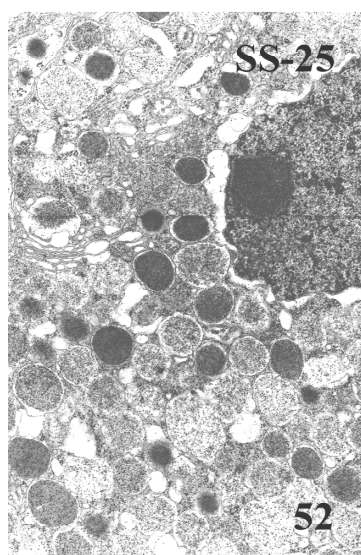
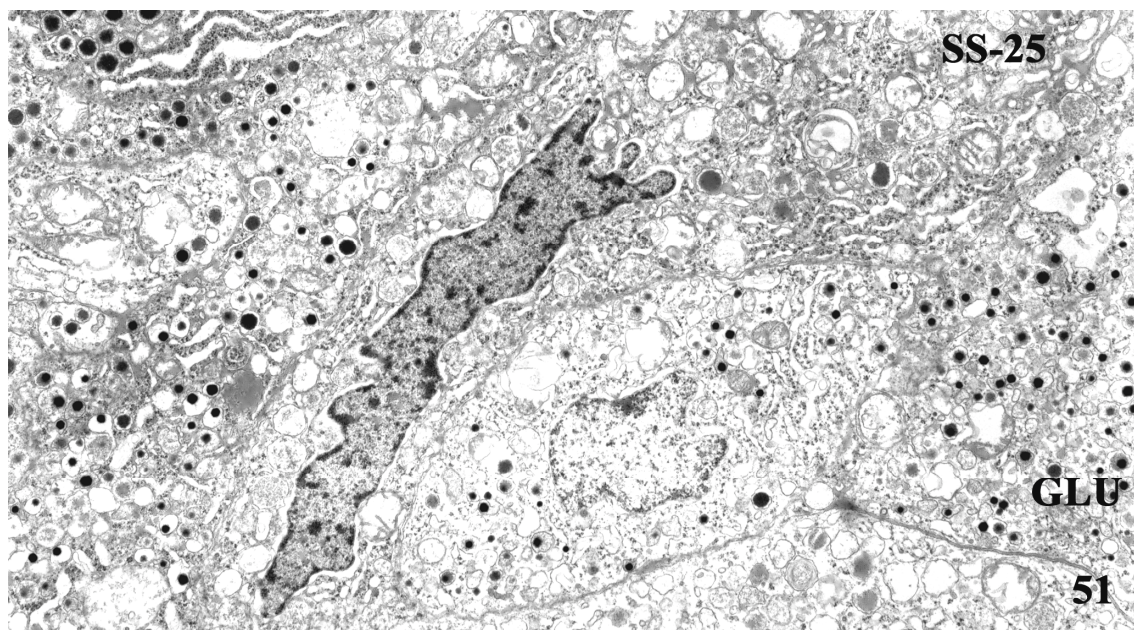


Fig. 51. Células involutivas de glucagón (GLU) y somatostatina-25 (SS-25). Obsérvese el núcleo denso eucromatínico de aspecto granular, envoltura nuclear dilatada citoplasma con cisternas y vesículas dilatadas. x5160.

Fig. 52. Célula con somatostatina-25 (SS-25) involutiva. **52a.** Gránulos de SS-25 inmunorreactivos (técnica IgG-oro). **52** x6560; **a** x15800.

Fig. 53. Célula involutiva de péptido tirosina tirosina (PYY). **53a.** Gránulos de PYY inmunomarcados con la técnica IgG-oro. **53** x8200; **a** x23800.

Fig. 54. Célula involutiva de somatostatina (SS-28). **54a.** Gránulos de SS-28 inmunomarcados con la técnica IgG-oro. **54** x9639; **a** x14500.

5. DISCUSIÓN

El presente trabajo se refiere al estudio morfológico e inmunocitoquímico de las células endocrinas pancreáticas de *S. aurata* desde la eclosión hasta los 114 días de desarrollo. Durante este periodo van apareciendo nuevos tipos de células endocrinas que se van organizando de manera característica.

Podemos encontrar en la literatura, cuando nos referimos al páncreas endocrino de teleósteos adultos, diferentes términos como “tejido del islote”, “tejido insular”, “órgano del islote o insular”, “islotes de Langerhans”, “cuerpos de Brockmann” e “islotes principales, intermedios o pequeños”. Algunas revisiones del tema consideran “órgano del islote” el homólogo del páncreas endocrino de algunas especies de teleósteos independientemente de si el órgano es grande o pequeño o si está concentrado o diseminado. (Epple y Brinn, 1986, 1987; Falkmer, 1995; Youson y Al-Mahrouki, 1999; Youson et al., 2006). “Islote principal” se define como la acumulación mayor de tejido endocrino en el páncreas rodeado por una delgada capa de tejido pancreático exocrino (Plisetskaya y Mommsen, 1996; Youson y Al-Mahrouki, 1999; Youson et al., 2006). Se denomina “cuerpo de Brockmann” a una concentración de islotes pancreáticos, algunos de los cuales pueden ser islotes principales, asociados con tejido del páncreas exocrino (Epple y Brinn, 1986, 1987; Youson y Al-Mahrouki, 1999; Youson et al., 2006). Sin embargo, cuerpos de Brockmann e islotes principales se suelen utilizar como sinónimos cuando el cuerpo de Brockmann consta de un único islote principal (Youson y Al-Mahrouki, 1999; Youson et al., 2006).

En el desarrollo de larvas de lubina (*D. labrax*), se denominó “cordón primordial” a un cordón de células endocrinas rodeadas por células indiferenciadas dispuestas en la pared dorsal de la parte anterior del intestino medio (desde la eclosión a 1 día); “islote primitivo” cuando las células endocrinas están agrupadas y rodeadas por células indiferenciadas (desde los 2 a los 5 días); “islote único” cuando el islote presenta cuatro tipos celulares (desde los 9 a los 13 días), “islotes primordiales” cuando hay pequeñas agrupaciones de células endocrinas con características similares a las células de los conductos pancreáticos (a partir de los 25 días) (García Hernández et al., 1994).

En el presente trabajo hemos denominado “cordón primordial” (en larvas recientemente eclosionadas) a un cordón de células endocrinas que se disponen junto al epitelio del área dorsal de la región anterior del intestino indiferenciado y en las que existe colocalización de INS y SS-25. “Islote primordial” (que aparece 1 día después de

la eclosión) es la agrupación de células endocrinas con colocalización INS y SS-25 que forman un pequeño islote rodeado por células indiferenciadas. “Islote único” (desde los 2 a los 24 días de desarrollo), cuando en la agrupación celular endocrina no hay colocalización de INS y SS-25, disponiéndose las células de INS en la parte central del islote endocrino y las de SS-25 en la parte externa, rodeadas por células del páncreas exocrino. “Islote grande” (desde los 24 a los 51 días) es un gran islote similar, en cuanto a situación y composición celular, al islote único descrito en las etapas anteriores; además aparecen algunos “islotes pequeños” y células endocrinas aisladas o agrupadas. De los 51 a los 114 días de desarrollo se encuentran islotes de diverso tamaño, llamados “islotes pequeños” o “islotes intermedios” y se llama “islote principal” al islote de mayor tamaño; en esta etapa aparece un nuevo tipo celular con inmunorreactividad a GLU/GLP-1(1-19)/PYY/NPY.

Estudios con microscopio óptico

En teleósteos, los primeros estudios demostraron el doble origen de las células endocrinas pancreáticas, que proceden del intestino y de los conductos pancreáticos (Baron, 1934). Recientemente, algunos estudios han demostrado que el primer islote se desarrolla desde el intestino indiferenciado (Argenton et al., 1999; Assouline et al., 2002; Berwert et al., 1995; García Hernández y Agulleiro, 1992; Kurokawa et al., 2000), como ocurre en *S. aurata* (Guyot et al., 1998; presente estudio). Este islote o “islote único” en *S. aurata* se diferencia posteriormente en un “gran islote”. Los “islotes intermedios” y “pequeños” aparecen en el área de ventral del páncreas exocrino próximo al conducto pancreático, como en otros teleósteos (García Hernández y Agulleiro, 1992; Morrison et al., 2004), las células aisladas y agrupadas aparecen también en esa posición.

Los “islotes principales” de *S. aurata*, que está rodeado por una fina capa de tejido de exocrino y atravesado por septos de tejido conectivo que contienen células acinares (Abad et al., 1986), no está todavía diferenciado en las etapas estudiadas en el presente trabajo. Este “islote principal” se podría formar por la unión del “islote grande” y algunos “islotes intermedios” o “pequeños” como se ha sugerido en ejemplares juveniles de *D. labrax* (García Hernández y Agulleiro, 1992; García Hernández et al., 1994) y de *O. niloticus* (Morrison et al., 2004).

Los teleósteos poseen múltiples genes de somatostatina que dan lugar a varias formas moleculares. Cada uno de los genes de somatostatina codifica un precursor

distinto, preprosomatostatina (PPSS) (PPSS-I, PPSS-II y PPSS-III) que, por escisión proteolítica, producen péptidos de longitudes diferentes (Nelson y Sheridan, 2005; Sheridan et al., 2000).

La INS ha sido detectada en el primordio pancreático desde la eclosión en larvas de *S. aurata* (Guyot et al., 1998). En el presente estudio de *S. aurata*, las células endocrinas del cordón primordial y del islote primordial encontrado en larvas recientemente eclosionadas y de un día después de la eclosión, respectivamente, muestran la coexistencia de inmunorreactividades a INS y SS-25. Estos resultados sugieren la existencia de una célula precursora común para las células que contienen INS o SS-25.

En embriones de *D. rerio* de 24 y 48 h después de la fertilización, la técnica de doble inmunofluorescencia reveló la presencia de células inmunorreactivas tanto a INS como a SS-14 en el islote endocrino, así como células que expresan una única hormona (Argenton et al., 1999). Sin embargo, en *D. labrax*, las inmunorreactividades a INS y SS-25 o a SS-14 no estaban colocalizadas en las células que forman el “cordón primordial” y el “islote primordial” que aparecían en la eclosión y a los 25 días, respectivamente (García Hernández y Agulleiro, 1992). En el embrión de *D. rerio*, el gen de la INS es el primer gen de hormonas pancreáticas que se expresa en las células situadas dentro del endodermo dorsal, a las 17 horas de la fertilización; las células que expresan SS-25 se detectan más tarde (Argenton et al., 1999; Biemar et al., 2001; Devos et al., 2002). La detección temprana de INS se produce también en larvas de otras especies como en *O. niloticus* en la que aparece 1 día después de la fertilización (Morrison et al., 2001; 2004), en *D. labrax* está presente en larvas en eclosión (García Hernández et al., 1994), en *B. conchoniis* a los dos días después de la eclosión (Rombout et al., 1979) o en *S. maximus* en la que es la primera hormona que aparece al primer día después de la eclosión (Berwert et al., 1995).

En larvas de *S. aurata*, inmunorreactividad únicamente a SS-25 (no colocalizada con inmunorreactividad a INS) se detecta en las células periféricas de todos los tipos de islotes observados desde 2 días después de la eclosión en adelante, mientras que células que expresan SS-28 (1-12) se identifican en el área central, próximas a las células de INS desde los 4 días. Además, el antisuero utilizado contra SS-14 inmunorreacciona con células de la periferia y de áreas centrales de los islotes únicos que aparecen después del día 17. La coexistencia de inmunorreactividades a SS-14/SS-25 y SS-14/SS-28 indica la presencia de SS-25 y SS-28.

Las células del área externa del islote de *S. aurata* adulta también muestran inmunorreactividad a SS-25; no se ha detectado inmunorreactividad con antisuero a SS-28 (1-14) en otros estudios de la misma especie (Abad et al., 1986, 1990, 1992), a diferencia de lo observado en larvas en la presente investigación. Estos resultados divergentes podrían ser debidos a los antisueros utilizados o a los diferentes métodos técnicos (SS-28 (4-14) de mamífero, código 7232 de INSTAR en Abad et al., (1992) y SS-28 (1-12) código 7, Dr. O. Kah, Talence, Francia, en el presente trabajo). En *D. labrax* se emplearon dos diferentes antisueros contra SS-14, detectándose en eclosión inmunorreactividad a SS-14a, pero no a SS-14b, en etapas posteriores, células inmunorreactivas a SS-14a se encuentran en el área externa del islote y en el área interna se encuentran células que inmunorreaccionan con SS-14a y células con inmunorreacción a SS-14b (García Hernández y Agulleiro, 1992).

En los islotes de algunos teleósteos, como en salmónidos y *D. labrax* se han demostrado células que presentan péptidos con inmunorreactividad similar a SS-25, que se localizan próximas a las células con GLU en la zona periférica del área endocrina y, células con péptidos similares a SS-28 (4-14), localizadas en aposición a las células con INS, en la parte central del área endocrina de los islotes “principales”, “intermedios” y “pequeños” (Lozano et al., 1991b; Nozaki et al., 1988), como ocurre en las larvas de *S. aurata*. En larvas de *S. maximus*, las células con SS-14 estaban entremezcladas con células de INS en el centro del islote más grande mientras que se localizan principalmente en la zona periférica de los islotes más pequeños o secundarios (Berwert et al., 1995).

En las larvas de *S. aurata*, células endocrinas con INS y SS-25 aparecen primero en el tracto digestivo indiferenciado en la etapa de alimentación endógena que corresponde a 4 días después de la eclosión, coincidiendo con el final del periodo endotrópico con apertura de la boca (Elbal et al., 2004; Guyot et al., 1998), como ocurre en *D. labrax* (García Hernández y Agulleiro, 1992), mientras que SS-14 se detecta en etapas de alimentación exógena en larvas de *S. maximus* (Berwert et al., 1995).

En peces, la INS actúa principalmente como una hormona reguladora del metabolismo (Mommsen y Plisetskaya, 1991). Se ha sugerido que la INS podría estar implicada en el crecimiento de órganos y diferenciación (Guyot et al., 1998), mientras que las somatostatinas participarían en la modulación de la secreción de GH en la pituitaria y en la regulación de hormonas pancreáticas asociadas con el desarrollo y el metabolismo (Plisetskaya y Duguay, 1993; Sheridan, 1994; Sheridan y Kao, 1998). Se

ha sugerido que INS y SS-25 podrían interactuar en etapas tempranas del desarrollo para regular la diferenciación (García Hernández et al., 1994), como podría ocurrir en *S. aurata*.

En larvas de *S. aurata*, las inmunorreactividades a SS-25 y SS-28 se detectan antes de que sean identificadas las células con GLU; sin embargo, las células con SS-14 aparecen después de las células con GLU. Este resultado pudiera ser debido a la aparición de otra molécula de somatostatina de mayor longitud con una secuencia C-terminal similar a la molécula de SS-14. En *S. maximus* (Berwert et al., 1995), las células con SS-14 precedían a las células con GLU como ocurre en larvas *D. labrax* (García Hernández y Agulleiro, 1992) y en embriones del *D. rerio* (Argenton et al., 1999; Biemar et al., 2001). En larvas de *S. aurata*, la inmunorreactividad tanto a GLU como a GLP-1 se colocan en células endocrinas próximas a las células con SS-25 en el “islote único” y después en el “islote grande”, en los “islotos intermedios” y “pequeños”. El suero anti-GLP-1 utilizado en este estudio no discrimina entre GLU y GLP-1 ya que tanto el GLU como el GLP-1 anularon la inmunotinción con anti-GLP. Sin embargo, el mismo antisuero GLP-1 (código 1642; Hammersmith Hospital) que se ha aplicado en este estudio se ha usado para detectar GLP-1 en el intestino de *O. mykiss* (Beorlegui et al., 1992); el test de preabsorción demostró la especificidad de la reacción, ya que la inmunotinción se produjo después de la preabsorción con GLU. Los resultados del presente estudio podrían deberse a la presencia de formas moleculares similares de GLU y GLP-1 en los islotes de *S. aurata*, o al hecho de que hay un epítipo en una simple molécula de GLP-1 que es reconocido tanto por el antisuero contra GLU como el antisuero contra GLP-1.

La colocación de inmunorreactividades a GLU y GLP ha sido demostrada en islotes pancreáticos o en intestino de salmónidos y algunos osteoglosomorfos utilizando GLP antisalmón (Al-Mahrouki y Youson, 1998; Nozaki et al., 1988). Las células con GLU aparecen cuando las larvas de *S. aurata* muestran una reabsorción total del saco vitelino y solo tienen alimentación exógena (Elbal y Agulleiro, 1986), como también ocurre en *S. maximus* (Berwert et al., 1995). Sin embargo, el GLU se detectó antes en *D. labrax*, en la etapa donde coexisten la alimentación endógena y exógena (García Hernández y Agulleiro, 1992). La principal función del GLU en peces, y la mejor conocida, es la acción glucogenolítica en hígado (Mommsen y Moon, 1990).

La familia de péptidos del neuropéptido Y (NPY, neuropéptido tirosina) comprende el NPY, el péptido tirosina tirosina (PYY), el polipéptido pancreático (PP),

y el péptido pancreático de pez Y (PY) que se ha encontrado en el páncreas endocrino de algunas especies de teleósteos como *D. labrax* (Cerdá-Reverter y Larhammar, 2000; Conlon, 2002; Larhammar, 1996), *L. americanus* (Balasubramaniam et al, 1989) o *C. scorpius* (Conlon et al., 1986).

La presencia de péptidos de la familia NPY en células endocrinas durante el desarrollo del páncreas de teleósteos se ha estudiado utilizando antisueros contra PP, PYY y NPY de mamíferos. Las células PP no se encontraron en embriones de *D. rerio* aunque parecían estar presentes en el islote de larvas (Biemar et al., 2001).

En larvas de *S. aurata*, la inmunorreactividad a PYY se detecta primero en fibras nerviosas del islote principal y, posteriormente, coexistiendo con inmunorreactividades a NPY, GLU, y GLP-1, en células de todos los tipos de islotes. En larvas de *D. labrax*, células PP, y delgadas prolongaciones celulares o fibras nerviosas que muestran inmunorreactividad similar a PYY, como aparecen en adultos (Agulleiro et al., 1993), fueron primero detectadas en el “islote grande” y posteriormente, PP y PYY se encontraron coexistiendo con GLU y NPY en células de islotes “intermedios” y “pequeños” (García Hernández y Agulleiro, 1992).

En el presente estudio, PYY anuló la inmunorreacción a PYY y NPY, así el antisuero NPY utilizado parece no ser específico. Estos resultados sugieren que el PYY en fibras nerviosas y células puede tener diferente estructura molecular y que el péptido presente en las células puede ser PY. En el *S. maximus*, las primeras células con PP se disponen en las áreas externas del islote principal y dispersas por todos los islotes secundarios (Berwert et al., 1995).

En *P. olivaceus*, se detectan células que expresan PP y PY en la región periférica de los islotes pequeños, mientras que están ausentes en el islote principal (Kurokawa y Suzuki, 2002; Kurokawa et al., 2000). En las larvas de *O. niloticus* sólo unas pocas células de los islotes fueron PYY positivas (Morrison et al., 2004).

En larvas de *S. aurata*, células con GLU/GLP-1/PYY/NPY se localizan en una pequeña área periférica en el islote grande y en algunos islotes intermedios, y en la región externa de otros islotes intermedios y en los islotes pequeños en los cuales no hay ninguna célula con sólo inmunorreactividad a GLU. Esta disposición celular es similar a la que se describe en adultos de lubina (Agulleiro et al., 1993; Lozano et al., 1991b). Sin embargo, en adultos de *S. aurata*, a diferencia de lo observado en larvas, se ha descrito la completa coexistencia de GLU y PP sólo en los islotes secundarios, mientras que las células con PP estaban agrupadas en una limitada parte superficial del

islote principal (Abad et al., 1987, 1988). No había coexistencia de GLU y PP en el islote principal y en los secundarios en las larvas de *S. maximus* (Berwert et al., 1995) y de GLU y PYY en las de *O. niloticus* (Morrison et al., 2004).

Las células aisladas y agrupadas próximas a los conductos pancreáticos a partir de los 24 días son de los mismos tipos de células inmunorreactivas que en el cordón primordial que aparecen en la *S. aurata* en la eclosión y un día después de la eclosión, mostrando coexistencia en las inmunorreactividades a INS y a SSs. Similares resultados se han descrito en *D. labrax*, en donde algunos grupos celulares compuestos de células con INS y SS-25 han sido encontrados próximos a los conductos pancreáticos en los que se han visto células con INS, SS-25 y PYY (García Hernández y Agulleiro, 1992). En *O. niloticus*, se observan SS-14 y GLU también en los conductos pancreáticos (Morrison et al., 2004). Estas conclusiones apoyan las observaciones más tempranas sobre el origen de algunos islotes de teleósteos en los conductos pancreáticos (Baron, 1934; Belsare, 1974), como ocurre en mamíferos (Bonner-Weir, 2000a y b). Evidencias más recientes sugieren que en las primeras semanas de vida de *O. niloticus*, la neogénesis del islote tiene lugar desde el conducto pancreático, mientras que el posterior incremento en el número de islotes puede ser resultado de una hiperplasia del islote, sugiriendo que los islotes más grandes dan lugar a los islotes más pequeños por brotes a lo largo de la vida del pez (Morrison et al., 2004).

Con respecto al origen de los diferentes tipos de células endocrinas, se ha sugerido que se desarrollan independientemente, ya que las células en las cuales GLU y péptidos de la familia del NPY coexisten pueden proceder de los conductos pancreáticos exclusivamente; algunos tipos emigrarían para unirse al “gran islote” originado del intestino (García Hernández y Agulleiro, 1992). Puede ser, por lo tanto, que exista una célula precursora común para las células con GLU y péptidos similares al NPY. Los resultados obtenidos en este estudio apoyan esta conclusión y también sugieren la existencia de una célula precursora común para células que contienen INS y SS-25.

Estudios con microscopio electrónico

Los estudios ultraestructurales convencionales e inmunocitoquímicos establecen que el páncreas endocrino de larvas de *S. aurata* está formado por varios tipos celulares, como se ha descrito en el estudio previo inmunocitoquímico para microscopía óptica.

Células indiferenciadas

En larvas de *S. aurata* se identifican células indiferenciadas tanto en el cordón primordial de larvas en eclosión, como en el islote primordial de larvas de 1 día, siendo muy similares a las descritas en larvas de *D. labrax* (García Hernández et. al., 1994). Estas células son muy electronodensas debido a los numerosos ribosomas libres y polirribosomas, presentan mitocondrias y cilios intracelulares; en algunas células se observan figuras de mitosis. A diferencia de lo encontrado en *D. labrax*, son frecuentes las mitocondrias y los citolisosomas y no se encuentran gránulos de secreción que ocasionalmente se observaron en esa especie (García Hernández et. al., 1994).

Células endocrinas con coexistencia INS y SS-25

Los estudios realizados en larvas en eclosión de *S. aurata* con técnicas de microscopía electrónica convencional y con IgG-oro demostraron que sólo hay un tipo de células endocrinas en el cordón primordial en las que se colocan INS y SS-25 en sus gránulos de secreción, igual a lo que se ha puesto de manifiesto en el estudio previo realizado con inmunocitoquímica microscópica óptica. En estas células existen dos tipos de gránulos de secreción, unos cuyo diámetro está entre 186 y 286 nm con un contenido ligeramente electronodenso, poco condensado, que puede ocupar todo el gránulo o estar desplazado hacia la periferia que contiene SS-25 y otros con un diámetro entre 151 y 190 nm que presentan un contenido muy electronodenso central y un halo claro que contiene INS. Estos gránulos son semejantes a los que se encuentran en dos tipos celulares del cordón primordial de larvas en eclosión de *D. labrax*, que presentan diferentes gránulos, en los que se ha sugerido que unos tienen INS y otros SS-25 (García Hernández et al., 1994).

El islote primordial de las larvas de 1 día de *S. aurata* está formado por dos clases de células que se diferencian por su electronodensidad, en ambos se observan dos tipos de gránulos de secreción similares a los de la etapa anterior, puestos de manifiesto con la técnica IgG-oro, siendo los que se marcan con anti-SS-25, con contenido granular de mediana electronodensidad, más abundantes en las células más electronodensas y los gránulos inmunomarcados con anti-INS, con un centro muy electronodenso rodeado por un estrecho halo claro, más frecuentes en las células más claras. En esta etapa, las células presentan numerosas prolongaciones en las que se acumulan gránulos de secreción, que ya se observaron anteriormente en *D. labrax*, aunque en esta especie se pueden encontrar hasta la etapa de 9 a 13 días (García Hernández et al., 1994).

Células con INS

En el islote único de *S. aurata* de 2 a 4 días, la mayoría de los gránulos endocrinos de las células con INS presentan un contenido central y esférico, su tamaño oscila entre 171 y 252 nm, algunos son baciliformes; en la etapa de 4 días en ocasiones el contenido electronodenso se dispersa adquiriendo un aspecto estrellado. Con la técnica IgG-oro las partículas de oro se depositan principalmente sobre el contenido granular así como en el de algún endosoma relacionado con gránulos de secreción. En un primer estudio realizado sobre células endocrinas pancreáticas de larvas de *S. aurata* (Guyot et al., 1998), se detectaron gránulos secretores desde el día 1 después de la eclosión, pero las células no pudieron ser identificadas como formadoras de INS hasta el día 3 después de la eclosión, aplicando la técnica ELISA (Guyot et al., 1998). Estos gránulos de secreción son similares a los encontrados en el presente trabajo pero difiere en que algunos gránulos tienen un contenido en forma de varilla. En *D. labrax*, los gránulos de secreción de las células consideradas como formadoras de INS son similares desde la etapa del cordón primordial de larvas en eclosión hasta la del islote primitivo de 5 días (García Hernández et. al., 1994) y coinciden con los gránulos de secreción de células con INS de *S. aurata* hasta los 4 días, aunque tienen un diámetro menor.

En las células con INS de larvas de *S. aurata* de 12 días se encuentran dos tipos de gránulos, los primeros son similares a los que se encontraron en la etapa de 9 a 13 días de *D. labrax*, con un contenido central esférico muy osmiófilo rodeado por un amplio halo claro; pero a diferencia con la especie anterior, en *S. aurata* existen otros gránulos con un contenido denso e irregular. Las partículas de oro se depositan sobre el material electronodenso de ambos tipos. En estas células no se encuentran los gránulos descritos en etapas similares de *D. labrax* en los que se observaba un cristaloides en forma de barra (García Hernández et. al., 1994).

En las células con INS de *S. aurata* del islote único de 17 a 23 días y del islote grande de 24 a 114 días y en células consideradas como con INS en *D. labrax* de 25 a 60 días (Agulleiro et al., 1994), los gránulos de secreción son parecidos a las etapas anteriores, pero varían en su tamaño. El tamaño de los gránulos de secreción en los trabajos de Guyot et al., 1998, oscila entre los 160 nm y los 230 nm de diámetro a los 17 días. En la presente investigación, oscila entre 202 nm a los 17 días y los 350 nm en las larvas de 114 días. En *D. labrax* oscilaron entre 234 nm a 246 nm en las larvas de 32

días. A diferencia con *S. aurata*, se encontraron algunos gránulos más grandes de 356 nm de media que contenían un cristaloides en forma de aguja o barra, la proporción de este tipo de gránulos se incrementó con el desarrollo larvario (Agulleiro et al., 1994).

Los estudios de células con INS de ejemplares adultos de *D. labrax*, *S. aurata*, *M. auratus* y *M. saliens*, realizados mediante técnicas inmunocitoquímicas para microscopía electrónica en el caso de *D. labrax* (Agulleiro et al., 1993) y observadas con microscopía electrónica convencional en el caso de *S. aurata* y *M. auratus* y *M. saliens* (Abad et al., 1986; Lozano y Agulleiro, 1986), coincidieron en la descripción de los gránulos secretores de INS; la mayoría presentaron un centro denso y un estrecho halo claro y unos pocos tuvieron un halo ancho y un centro excéntrico o centrado que no estaba bien definido, pero se diferencian en que ocasionalmente en *D. labrax* se encontraron gránulos con cristaloides en forma de barra a veces embebidos en una fina matriz granular y en el tamaño de los gránulos, hasta 900 nm en *M. auratus* y *M. saliens*, 879 nm en *D. labrax* y de 410 nm en *S. aurata* (Abad et al., 1986; Agulleiro et al., 1993; Lozano et al., 1986). Las células de INS de osteoglosomorfos estudiadas con técnicas inmunocitoquímicas de microscopía electrónica presentan cisternas bien desarrolladas de rer y del aparato de Golgi, grandes vacuolas que contienen lípidos, pero hay una gran diferencia en cuanto al tamaño y ultraestructura de los gránulos de secreción entre las especies, siendo de un diámetro entre 93 y 337 nm en *P. buchholzi*, *N. chitala* y *G. petersii*, con un contenido denso en forma hexagonal o esférica; sin embargo, en *O. bicirrhosum*, el diámetro varía entre 154 y 338 nm y el contenido del gránulo puede ser redondeado, ovalado, rectangular, barra triangular y barra alargada (Al-Mahrouki y Youson, 1999).

Células con SSs

Las células con SS-25 en *S. aurata* que se observan a partir de los dos días después de la eclosión son alargadas, y no presentan las prolongaciones con acumulación de gránulos de secreción observadas en las células con coexistencia de INS y SS-25. Estas células presentan dos tipos de gránulos de secreción inmunomarcados con IgG-oro. Los más numerosos y de mayor tamaño poseen un contenido ligeramente electronodenso rodeado por un estrecho halo claro. Su diámetro varía desde los 200 nm de media a los 557 en larvas de 114 días. En el islote único de las larvas a partir de 12 días, este gránulo puede, además, aparecer vacío o con un escaso contenido que se condensa en el centro o en la periferia del gránulo y que es el que se marca con IgG-oro.

Otros, más escasos, contienen un centro esférico muy electronodenso de disposición central o excéntrica, la media de tamaño de estos gránulos es de 165 nm para pasar a ser de 500 a los 114 días. Las células con SS-25 de *D. labrax* (Agulleiro et al., 1994; García Hernández et al., 1994) presentaron gránulos secretores similares a los descritos en *S. aurata*, aunque más pequeños.

En larvas de 4 días después de la eclosión, se detectan por primera vez células inmunoteñidas en *S. aurata* utilizando anti-SS-28 (1-12) tanto en inmunocitoquímica para microscopía óptica como ultraestructural. Los gránulos de secreción tienen un diámetro medio de 150 nm observándose dos tipos: gránulos con contenido central muy electronodenso rodeado por un estrecho halo claro y gránulos con contenido de electronodensidad media que ocupa la casi totalidad del gránulo. El tamaño de grano se incrementa hasta llegar a 241 nm los 114 días.

Las células con SS-14 que se habían identificado con inmunocitoquímica microscópica óptica a los 17 días, también se demuestran a la misma edad con inmunocitoquímica microscópica electrónica. Son células con dos tipos de gránulos, los que tienen un contenido de electronodensidad media y ocupa la casi totalidad del gránulo, con un estrecho halo claro, mientras que otro tienen un contenido más electronodenso con una media de 115 nm, que se marcan con los sueros anti-SS-14 como anti-SS-28. En las larvas *D. labrax*, con microscopía electrónica, se identificaron las células que aparecieron en la etapa de 9 a 13 días como células con SS-14, con mayoría de gránulos de secreción de diámetro medio de 187 nm y con un fino y homogéneo material granular de media o alta electronodensidad cercano a la membrana granular o separado de ella por un estrecho halo claro; en larvas de más edad se sigue encontrando este tipo celular con gránulos de secreción similares, aunque de mayor tamaño (Agulleiro et al., 1994; García Hernández et al., 1994).

En los estudios realizados en ejemplares adultos de *S. aurata* con microscopía electrónica convencional (Abad et al., 1990) y con inmunocitoquímica microscópica electrónica (Abad et al., 1992), se encontraron dos tipos de células con SS en el islote principal. Las células con SS-25 presentaron grandes gránulos secretores con un centro de moderada a baja electronodensidad y un diámetro medio de 410 nm (Abad et al., 1992) y las células con SS-14 tenían pequeños gránulos secretores con centro electronodenso esférico de 220 nm de diámetro. En el páncreas de ejemplares adultos de *S. aurata*, no se encontró inmunorreacción de células con SS-28 (Abad et al., 1990), mientras que sí se ha demostrado en larvas en la presente investigación. Estos resultados

discrepantes podrían ser debidos al antisuero utilizado o a detalles de la técnica aplicada. En osteoglosomorfos aparecen dos tipos de células de SS dispersas por el islote, las células que inmunorreaccionan con anti-S14 y anti-SS-25 tienen gránulos esféricos de variada electronodensidad en las especies de *P. buchholzi*, *N. Chilapa* y *G. petersii*, pero en *O. bicirrhosum*, fueron menos electronodensos, para todas las especies estudiadas, el diámetro de los gránulos osciló entre 72 y 320 nm, también se localizaron células con SS-34, cuyos gránulos de secreción fueron muy electronodensos, alargados o en forma de lágrima con una membrana limitante cercana al contenido (Al-Mahrouki y Youson, 1999).

Células con GLU, NPY, PYY

En larvas de *S. aurata*, las células con GLU que se detectan a los 12 días, tienen gránulos de secreción con un contenido de mediana electronodensidad central o excéntrico y un halo de tamaño variable de electronodensidad baja a media, otros presentan un centro de electronodensidad elevada y un halo estrecho, el diámetro de estos gránulos es muy variable, de 180 y 245 nm y en larvas de 114 días es de 292nm con la técnica de IgG-oro sólo inmunorreaccionan con anti-GLU.

En larvas de 51 a 114 días se pueden encontrar, al igual que en los estudios inmunocitoquímicos con microscopía óptica, células que presentan coexistencia GLU/NPY/PYY. Estas células tienen gránulos de secreción pequeños y dispersos por todo el citoplasma con un contenido electronodenso o de mediana electronodensidad que ocupa casi la totalidad del gránulo, dejando únicamente un estrecho halo claro de separación con la envoltura granular, inmunomarcadas con oro mediante la técnica IgG-oro y los sueros anti-GLU, anti-GLP-1, anti-NPY y anti-PYY. Las pruebas de preabsorción muestran que el marcado de GLP-1 no es específico.

En larvas de *D. labrax*, se han identificado ultraestructuralmente las células de GLU que aparecen entre los 9 y los 13 días; las características de los gránulos de secreción son similares a los de *S. aurata* en larvas hasta 25 días, excepto el tamaño, ya que todos los gránulos son pequeños, de 124 nm diámetro y de mediana electronodensidad (García Hernández et al., 1994). A partir de 25 días la mayoría de los gránulos tienen un centro de muy elevada electronodensidad, pero siguen presentándose los gránulos de electronodensidad media, siendo el diámetro de los gránulos de 270 nm a los 55 días (Agulleiro et al., 1994).

Las células con GLU de ejemplares adultos de *D. labrax*, *S. aurata* y *M. auratus* y *M. saliens*, mostraron gránulos de secreción con muchas similitudes en todas las especies: redondeados con un centro electronodenso polimórfico, siendo algunas veces poliédrico, y un amplio halo claro que frecuentemente contenía un material de electronodensidad media; en *M. auratus* se encontraron ocasionalmente gránulos con varios centros electronodensos pequeños y redondos. La principal variación se encuentra en los tamaños de los gránulos, siendo mayores los de *Mugil sp.*, (1000 nm de diámetro), que los de otras especies como *D. labrax* (500 nm) y en *S. aurata* (300 nm) (Abad et al., 1986; Agulleiro et al., 1993; Lozano y Agulleiro, 1986).

En osteoglosomorfos, las células que forman GLU quedan inmunomarcadas con anti-GLU y presentan gránulos de moderada electronodensidad rodeados por una membrana limitante cercana al centro y una matriz circular u oval. El diámetro varió desde 93 a 385 nm (Al-Mahrouki y Youson, 1999).

En islotes pequeños de *S. aurata*, se identifican las primeras células con gránulos con NPY a los 30 días de desarrollo, son secreción escasos y de diámetro medio 98 nm. Gránulos con PYY se pueden observar en larvas de 17 días en las innervaciones nerviosas, caracterizándose por ser los de menor tamaño de los encontrados en esta etapa, con un diámetro medio de 125 nm; se pueden observar células con GLU/NPY/PYY en el islote principal en larvas de más de 51 días.

La aparición de esta familia de hormonas se ha descrito también en *P. olivaceus* donde células con PY aparecen a los 3 días en el epitelio intestinal y a los 30 días en los islotes pancreáticos accesorios (Kurokawa y Suzuki, 2002); los estudios por inmunocitoquímica microscópica óptica en larvas de *D. labrax*, muestran células con inmunorreactividad similar a NPY y PYY en el intestino a los 9 días y en el estómago a partir de 25 días, mientras que en los islotes pancreáticos células con inmunorreactividad similar a PP aparecen a partir de 55 días (Agulleiro et al, 1994); en larvas de *S. maximus*, la inmunorreacción a PP y NPY se produjo en el intestino a los 5 días (Reinecke et al., 1997) y en el páncreas endocrino a los 11 días después de la eclosión (Berwert et al., 1995).

Diferenciación celular

Los gránulos de secreción de todos los tipos de células endocrinas pancreáticas de *S. aurata* aumentan de tamaño conforme la larva se desarrolla; este proceso se observa en otros teleósteos como *D. labrax* (Agulleiro et al., 1994).

Fases tempranas de mitosis se muestran en células endocrinas pancreáticas de *S. aurata* desde la eclosión a los 4 días, como se aprecia por la característica cromatina condensada, lo que indica que estas células se encuentran en una etapa de activa proliferación celular. Este rasgo también se comprobó en larvas de hasta 13 días en *D. labrax* (García Hernández et al., 1994). También es frecuente encontrar hasta las etapas más avanzadas estudiadas, mitocondrias con una constricción central que indicaría un marcado incremento de las mismas.

Desde la eclosión a los 4 días, las células muestran características ultraestructurales semejantes a células indiferenciadas, con numerosos ribosomas libres y polirribosomas, grandes mitocondrias y cisternas de rer muy dilatadas, aisladas y dispersas por todo el citoplasma, descritas también anteriormente en células endocrinas de islotes pancreáticos de larvas de *D. labrax* hasta los 25 días (García Hernández et al., 1994) y en hipófisis de *S. aurata* hasta 2 días (Villaplana et al., 1996).

En las etapas iniciales se encuentran grandes mitocondrias redondeadas u ovaladas con crestas transversales, a veces agrupadas y próximas a la envoltura nuclear, relacionadas con cisternas de retículo endoplásmico y el complejo de Golgi.

El complejo de Golgi se encuentra muy desarrollado desde la eclosión a los 17 días, con numerosas cisternas, y es frecuente encontrar dilataciones centrales o laterales con un material electronodenso similar al centro de los gránulos de secreción; los mecanismos moleculares por lo que las proteínas pasan por el complejo de Golgi podrían ser por maduración-progresión de las cisternas (Nakano y Luini, 2010), como ocurre en *D. labrax* (García Hernández et al., 1994). A partir de los 17 días, las cisternas del complejo de Golgi se dilatan y las exteriores son de aspecto muy irregular.

Próximos al complejo de Golgi se encuentran numerosas vesículas cubiertas y cuerpos multivesiculares, así como endosomas formados por túbulos estrechos y algo sinuosos que se han marcado con IgG-oro y anti-INS en células con INS. En el citoplasma de las células pancreáticas endocrinas de larvas de *D. labrax*, se observaron también desde eclosión a 25 días, muy desarrollados estos orgánulos membranosos, aunque en *D. labrax* no se encuentran endosomas (García Hernández et al., 1994). La función de los endosomas parece ser el transporte de material que se acaba de incorporar a la célula por endocitosis. La mayor parte del material es transferido a los lisosomas para su degradación, aunque en teleósteos, como el *I. punctata*, se ha sugerido que puede ser una función de almacén de proteínas antigénicas (Vallejo et al., 1992); otros autores, afirman que pueden tener un papel importante en la defensa contra

microorganismos patógenos en teleósteos y otros animales no vertebrados (Satake y Sasaki, 2010). Recientes estudios bioquímicos y morfológicos muestran que los autofagosomas pueden fusionarse con los endosomas para formar los llamados anfisomas, estas estructuras representan compartimentos prelisosomiales donde convergen la autofagia y la endocitosis, la interacción endosoma - autofagosoma es necesaria para la maduración de los autofagosomas (Fader y Colombo, 2009).

Los citolisosomas se observan en todos los estados de evolución de las células endocrinas pancreáticas de *S. aurata*, ocasionalmente con orgánulos completos en su interior.

En casi todas las etapas del desarrollo de *S. aurata* se han encontrado en las células endocrinas pancreáticas, cuerpos multivesiculares, considerados como una clase especial de endosomas tardíos, intermediarios para la internalización de nutrientes, ligandos y receptores a través del sistema endolisosomal (Fader y Colombo, 2009) que presentan material electronodenso similar al contenido de los gránulos de secreción. Estos cuerpos multivesiculares también se encuentran en células endocrinas pancreáticas de *D. labrax* (Agulleiro et al., 1993).

Se encuentran centriolos, estructuras ciliares y cilios intracitoplásmicos en larvas de *S. aurata* desde la eclosión hasta las últimas etapas estudiadas. Estos cilios intracitoplásmicos también se describen en células endocrinas pancreáticas de *D. labrax* (Agulleiro et al., 1994; García Hernández et al., 1994) y en las células endocrinas de la hipófisis de *S. aurata* (Villaplana et al., 1996). Los cilios intracitoplásmicos parecen producirse de la inhibición de la emigración de los corpúsculos basales (Hagiwara et al., 2000). Los axonemas intracelulares se han descrito frecuentemente en las células epidérmicas de algunos invertebrados (Cifrian et al., 1992; Drobysheva, 2010).

Entre células adyacentes se encuentran estructuras de unión tipo desmosoma en todas las etapas estudiadas, pero son especialmente llamativas las estructuras de unión apicales en células endocrinas de los islotes pancreáticos secundarios de larvas *S. aurata* entre los 24 a los 51 días.

En la últimas etapas larvarias, desde 51 días en adelante, se han observado células involutivas, también encontradas en *D. labrax* (Agulleiro et al., 1994; García Hernández et al., 1994), que indican muerte celular inducida en respuesta a una gran variedad de procesos fisiológicos (Wyllie, 2010). La involución celular parece estar implicada en la renovación celular en muchos tejidos adultos sanos y es responsable de la eliminación localizada de las células durante el desarrollo embrionario normal (Kerr

et al., 1972). Los gránulos de secreción de estas células pancreáticas endocrinas involutivas de *S. aurata*, aparecen inmunomarcados con IgG-oro, utilizando antisueros contra los tipos de hormonas estudiados.

Relación del páncreas endocrino y el aparato digestivo

Se pueden relacionar etapas de desarrollo del tracto digestivo con etapas de desarrollo pancreático en larvas de *S. aurata*. Desde eclosión hasta larvas de 1 día, la alimentación es totalmente endógena; el tracto digestivo consiste en un tubo recto indiferenciado localizado en la parte dorsal del saco vitelino (Elbal et al., 2004). Respecto al páncreas endocrino correspondería a la fase donde las células endocrinas pancreáticas presentan coexistencia INS/SS-25.

De 2 a 3 días después de la eclosión, se abre el canal alimenticio en la parte posterior para formar el ano y se pueden distinguir tres regiones digestivas: esófago, presunto estómago e intestino (Elbal et al., 2004). En el desarrollo del páncreas correspondería a la diferenciación del páncreas exocrino.

De los 4 a los 7 días, se abre la boca y hay coexistencia de alimentación endógena y exógena, desapareciendo el saco vitelino (Elbal et al., 2004), en cuanto al desarrollo pancreático correspondería a la fase donde aparecen células con SS-28.

De 8 a 59 días, la alimentación es totalmente exógena; en el presunto estómago se observan pliegues mucosos con algunas fibras conectivas PAS-positivas; en el intestino se pudieron observar a los 23 días, escasas células caliciformes, que se incrementan hasta los 48 días (Elbal et al., 2004) y corresponden con fases del páncreas endocrino en las que aparecen nuevas hormonas como GLU y se pasa de un islote único, a un islote grande y algunos pequeños.

De 60 a 69 días surgen las glándulas gástricas, se diferencian cuatro ciegos pilóricos entre estómago e intestino y se produce el crecimiento del tracto gastrointestinal (Elbal et al., 2004). Se relaciona con la fase pancreática donde existe un islote principal y algunos islotes intermedios y pequeños, encontrándose células con coexistencia de GLU/PYY/NPY.

6. CONCLUSIONES

1. Las células endocrinas pancreáticas de la dorada, *Sparus aurata*, se organizan durante la ontogénesis en un “cordón primordial”, un “islote primordial”, un “islote grande”, e “islotos intermedios” y “pequeños”.
2. Con microscopía electrónica convencional y técnicas inmunocitoquímicas de microscopía óptica y electrónica, se identifican células con INS, SS-14, SS-25, SS-28 (1-12), GLU, NPY y PYY.
3. Se demuestra coexistencia de INS y diferentes somatostatinas en células aisladas y agrupadas próximas al conducto pancreático mediante técnicas de inmunocitoquímica microscópica óptica.
4. Cada inmunorreactividad a un péptido aparece desde la eclosión en adelante según un modelo establecido, siendo INS y SS-25 los primeros que se detectan y los similares a NPY los últimos.
5. La disposición de las células endocrinas en los islotes se mantiene a lo largo de todo el desarrollo, localizándose INS, SS-14 y SS-28 (1-12) en la zona interna, SS-25, GLU y NPY en el área periférica.
6. Las células con SS-14 y SS-28 (1-12) tienen características ultraestructurales semejantes.
7. En el transcurso de la ontogenia, aparecen nuevos islotes y células endocrinas en relación con los conductos pancreáticos.
8. El número de gránulos de secreción y su tamaño aumentan en todas las células endocrinas desde las primeras etapas de desarrollo hasta las últimas, siendo la población de gránulos de secreción de cada tipo celular heterogénea respecto a su ultraestructura.
9. Las células en las que INS y SS-25 coexisten en el cordón y en el islote primordiales tienen dos tipos de gránulos de secreción, que se marcan con la técnica IgG-oro, unos con anti-INS y otros con anti-SS-25.
10. En la última etapa estudiada se encuentran células con GLU y células con coexistencia de GLU, GLP-1, NPY y PYY estas últimas presentan además de los gránulos de secreción similares a los de las células con GLU, otros de ultraestructura característica.
11. Se sugiere que las células con INS y somatostatina procederían de una célula precursora común cuyo origen es el intestino indiferenciado, mientras que las

células con GLU y péptidos similares al NPY podrían proceder de células de los conductos pancreáticos.

12. Todos los tipos de células endocrinas presentan las organelas correspondientes a vía de secreción regulada.
13. En las primeras etapas ontogenéticas, las cisternas de rer están aisladas o asociadas longitudinalmente en todos los tipos celulares endocrinos. Posteriormente aparecen apiladas.
14. En todas las etapas de desarrollo se observan en las células citolisosomas y cuerpos multivesiculares con materiales electronodensos similares a los de los gránulos de secreción que podrían indicar un reajuste en la población de gránulos de secreción.
15. En las primeras etapas del desarrollo se encuentran células endocrinas en mitosis lo que indica hiperplasia.
16. En la última etapa del desarrollo se observan células involutivas de todos los tipos celulares, posiblemente apoptósicas, lo que puede indicar un inicio de homeostasis celular.
17. Hay relación entre las diferentes etapas del desarrollo del aparato digestivo y la aparición de hormonas pancreáticas. Así, el tracto digestivo indiferenciado se corresponde a células con coexistencia de INS y SS-25; la apertura de la boca con la aparición de células con SS-28 (1-12); el desarrollo del estómago con detección de células con GLU y el desarrollo de glándulas gástricas con células en las que coexisten GLU y GLU/PYY/NPY.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abad ME, Agulleiro B, Rombout JHWM, 1986. An immunocytochemical and ultrastructural study of the endocrine pancreas of *Sparus auratus* L. (Teleostei). Gen. Comp. Endocrinol. 64, 1-12.

Abad ME, Binkhorst FM, Elbal MT, Rombout JHWM, 1987. A comparative immunocytochemical study of the gastro-enteropancreatic (GEP) endocrine system in a stomachless and stomach-containing teleost. Gen. Comp. Endocrinol. 66, 123-136.

Abad ME, García Ayala A, Lozano MT, Agulleiro B, 1992. Somatostatin 14- and somatostatin 25-like peptides in pancreatic endocrine cells of *Sparus aurata* (Teleost): a light and electron microscopic immunocytochemical study. Gen. Comp. Endocrinol. 86, 445-452.

Abad ME, Lozano MT, Taverne-Thiele JJ, Rombout JHWM, 1990. Identification of two somatostatin-immunoreactive cell types in the principal islet of *Sparus auratus* L. (Teleostei) by immunogold staining. Gen. Comp. Endocrinol. 77, 1-8.

Abad ME, Taverne-Thiele JJ, Rombout JHWM, 1988. Immunocytochemical and ultrastructural characterization of coexistence of pancreatic polypeptide and glucagon-like immunoreactivity in the pancreatic endocrine cells of *Sparus auratus* L. (Teleostei). Gen. Comp. Endocrinol. 70, 9-19.

Agulleiro B, García Hernández MP, Lozano MT, 1994. Ontogeny of the endocrine pancreas in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): an ultrastructural study. II. The big and secondary islets. Cell Tissue Res. 276, 323-331.

Agulleiro B, Lozano MT, Abad ME, García Hernández MP, 1993. Electron-microscopic immunocytochemical study of the endocrine pancreas of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Cell Tissue Res. 274, 303-314.

Albalat A, Gutiérrez J, Navarro I, 2005. Regulation of lipolysis in isolated adipocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): the role of insulin and glucagon. Comp. Biochem. Physiol. 142, 347-54.

Al-Mahrouki AA, Youson JH, 1998. Immunohistochemical studies of the endocrine cells within the gastro-entero-pancreatic system of Osteoglossomorpha, an ancient teleostean group. Gen. Comp. Endocrinol. 110, 125-139.

Al-Mahrouki AA, Youson JH, 1999. Ultrastructure and immunocytochemistry of the islet organ of Osteoglossomorpha (Teleostei). Gen. Comp. Endocrinol. 116, 409-421.

Andrews PC, Hawke D, Shively JE, Dixon JE, 1985. A nonamidated peptide homologous to porcine peptide YY and neuropeptide YY. Endocrinology 116, 2677-2681.

APROMAR, 2009. Informe de Asociación de Productores de Cultivos Marinos. www.apromar.es.

Argenton F, Zecchin E, Bortolussi M, 1999. Early appearance of pancreatic hormone-expressing cells in the zebrafish embryo. Mech. Dev. 87, 217-221.

Assouline B, Nguyen, SM, Bourrat F, Scharfmann R, 2002. Development of the pancreas in medaka. Mech. Dev. 117, 299-303.

Balasubramaniam A, Rigel DF, Chance WT, Fischer JE, 1992. Central and peripheral effects of sculpin pancreatic polypeptide and anglerfish peptide Y in rats. Pept. Res. 106-109.

Balasubramaniam A, Rigel DF, Chance WT, Stein M, Fischer JE, King D, Plisetskaya EM, 1990. Salmon pancreatic polypeptide exhibits neuropeptide Y-like activities in rats. Peptides 11, 673-677.

Balasubramaniam A, Knittel JJ, Gil C, Andrews PC, 1989. Detection of conformational isomers of anglerfish peptide YG (aPY) by reversed phase chromatography. Int. J. Pept. Protein Res. 34, 158-160.

Batten TF, Wigham T, 1984. Effects of TRH and somatostatin on releases of prolactin and growth hormone in vitro by the pituitary of *Poecilia latipinna*. II. Electron-microscopic morphometry using automatic image analysis. Cell Tissue Res. 237, 595-603.

Barnett P, 2003. Somatostatin and somatostatin receptor physiology. Endocrine 20, 255-264.

Baron H, 1934. Insel- und Zymogengewebe in ihren gegenseitigen Beziehungen bei *Gasterosteus aculeatus* und einigen anderen Teleostiern. Z. Wiss Zool. 146, 1-40.

Batten TF, Wigham T, 1984. Effects of TRH and somatostatin on releases of prolactin and growth hormone in vitro by the pituitary of *Poecilia latipinna*. II. Electron- microscopy morphometry using automatic image analysis. Cell Tissue Res. 237, 595- 603.

Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghatei MA, Cone RD, Bloom SR, 2002. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418, 650-654.

Beccaria C, Díaz JP, Gabrion J, Connes R, 1990. Maturation of the endocrine pancreas in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. (Teleostei): an immunocytochemical and ultrastructural study. I. Glucagon-producing cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78, 80-92.

Belsare DK, 1974. Studies on the development of endocrine glands in fishes. III. Morphogenesis of the endocrine pancreas in *Clarias batrachus*. L. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 88, 981-986.

Beorlegui C, Martínez A, Sesma P, 1992. Endocrine cells and nerves in the pyloric caeca and the intestine of *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei). *Gen. Comp. Endocrinol.* 86, 483-495.

Bern H, Pearson D, Larson BA, Nishioka RS, 1985. Neurohormones from fish tails: the caudal neurosecretory system. I. "Urophysiology" and the caudal neurosecretory system of fishes. *Recent Prog. Horm. Res.* 41, 533-552.

Bernier NJ, Bedard N, Peter RE, 2004. Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 230-240

Berwert L, Segner H, Reinecke M, 1995. Ontogeny of IGF-1 and the classical islet hormones in the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Peptides* 16, 113-122.

Biemar F, Argenton F, Schmidteke R, Epperlein S, Peers B, Driever W, 2001. Pancreas development in zebrafish: early dispersed appearance of endocrine hormone expressing cells and their convergence to form a definitive islets. *Dev. Biol.* 230, 189-203.

Bishop AE, Polak JM 1997. The anatomy, organisation and ultrastructure of the islets of Langerhans. In *Textbook of diabetes*. Ed. Pickup and Williams, Oxford, UK.

Blomqvist AG, Söderberg C, Lundell I, Milner RJ, Larhammar D, 1992. Strong evolutionary conservation of neuropeptide Y: sequences of chicken, goldfish, and *Torpedo marmorata* DNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 2350-2354.

Blundell TL, Pitts JE, Tickle IJ, Wood SP, 1981. The conformation and receptor binding of pancreatic hormones. *Biochem. Soc. Trans.* 9, 31-32.

Bonner-Weir S, 2000a. Islet growth and development in the adult. *J. Mol. Endocrinology*. 24, 297-302.

Bonner-Weir S, 2000b. Perspective: postnatal pancreatic β cell growth. *Endocrinology* 141, 1926-1929.

Broglia F, Gottero C, Benso A, Prodam F, Volante M, Destefanis S, Guana C, Muccioli G, Papotti M, Lely AJ, Ghigo E, 2003. Ghrelin and the endocrine pancreas. *Endocrine* 22, 19-24.

Carbajo Vasco D, 2005. Acuicultura marina mediterránea: producción, comercialización. Competencia internacional del sector español de la lubina y la dorada. Ed. Mundi-Prensa Libros.

Caruso MA, Kittilson JD, Raine J, Sheridan MA, 2008. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess two insulin-encoding mRNAs that are differentially expressed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 695-704.

Cerdá-Reverter JM, Martínez-Rodríguez G, Zanuy S, Carrillo M, Larhammar D, 2000. Molecular evolution of the neuropeptide Y (NPY) family of peptides: cloning of three NPY-related peptides from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Regul. Pept.* 24, 25-34.

Cerdá-Reverter JM, Larhammar D, 2000. Neuropeptide Y family of peptides: structure, anatomical expression, function, and molecular evolution. *Biochem. Cell Biol.* 78, 371-392.

Chan SJ, Steiner DF, 2000. Insulin through the ages: phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. *Amer. Zool.* 40, 213-222.

Cifrian B, García-Corrales P, Martínez-Alos S, 1992. Intracytoplasmic ciliary elements in epidermal cells of *Syndesmis echinorum* and *Paravortex cardii* (Platyhelminthes, Dalyellioida). *J. Morphol.* 213, 147-57.

Conlon JM, 2001. Evolution of the insulin molecule: insights into structure-activity and phylogenetic relationships. *Peptides* 22, 1183-1193.

Conlon JM, 2002. The origin and evolution of peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP). *Peptides* 23, 269-278.

Conlon JM, Bjénning C, Hazon N, 1992. Structural characterization of neuropeptide Y from the brain of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *Peptides* 13, 493-497.

Conlon JM, Schmidt WE, Gäwitz B, Falkmer S, Thim L, 1986. Characterization of an amidated form of pancreatic polypeptide from the daddy sculpin (*Cottus scorpius*). Regul. Pept. 16, 261-268.

Conlon JM, Tostivint H, Vaudry H, 1997. Somatostatin- and urotensin II-related peptides: molecular diversity and evolutionary perspectives. Regul. Pept. 69, 95-103.

Cook AF, Peter RE, 1984. The effects of somatostatin on serum growth hormone levels in goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol. 54, 109-113.

Davis MS, Shuttleworth TJ, 1985. Pancreatic peptides regulate Cl⁻ secretion in the marine teleost gill. Peptides. 6, 379-382.

Devos N, Deflorian G, Biemar F, Bortolussi M, Martial JA, Peers, B, Argenton F, 2002. Differential expression of two somatostatin genes during zebrafish embryonic development. Mech. Dev. 115, 133-137.

Drobysheva IM, 2010. Replication of basal bodies during ciliogenesis in the epidermis of Prolecithophora and Lecithoepitheliata (Plathelminthes). Belg. J. Zool., 140, 127-131.

Drucker DJ, 2001. The glucagon-like peptides. Endocrinology 142, 521-527.

Drucker DJ, 2002. Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. Gastroenterology 122, 531-544.

Duan C, 1998. Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. J. Nutr. 128, 306-314.

Duan C, Ren H, Gao S, 2010. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF binding proteins: Roles in skeletal muscle growth and differentiation. Gen Comp Endocrinol. 167, 344-351

Duguay TJ, Mommsen TK, 1994. Molecular aspects of pancreatic peptides. In: Fish Physiology, Sherwood NM, Hew CL (Eds.). Academic Press, London, Vol. 13, pp. 225-271.

Eilertson CD, Kittilson JD, Sheridan MA, 1995. Effects of insulin, glucagon, and somatostatin on the release of somatostatin-25 and somatostatin-14 from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, pancreatic islets in vitro. Gen. Comp. Endocrinol. 99, 11-20.

Eilertson CD, Sheridan MA, 1993. Differential effects of somatostatin-14 and somatostatin-25 on carbohydrate and lipid metabolism in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol. 92, 62-70.

Elbal MT, Agulleiro B, 1986. An immunocytochemical and ultrastructural study of endocrine cells in the gut of a teleost fish, *Sparus auratus* L. Gen Comp Endocrinol. 64, 339-354.

Elbal MT, García Hernández MP, Lozano MT, Agulleiro B, 2004. Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. Aquaculture. 234, 215-238.

Epplé A, Brinn JE, 1986. Pancreatic Islets. In “Vertebrates Endocrinology: Fundamental and Biochemical Implications” Vol. 1. “Morphological Considerations”. Ed. Academic Press. Orlando. pp. 279-317.

Epplé A, Brinn JE, 1987. The comparative Physiology of the Pancreas islets. Ed. Springer-Verlag.

Fader CM, Colombo MI, 2009. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. Cell Death Differ. 16, 70-78.

Falkmer S, 1961. Experimental diabetes research in fish. Acta Endocrinol. 37, 1-122.

Falkmer S, 1995. Origin of the parenchymal cells of the endocrine pancreas: Some phylogenetic and ontogenetic aspects. In “Endocrine Tumors of the pancreas.” Vol. 23, Frontiers in Gastrointestinal Research. Eds. Mignon and Jansen. Karger, Basel. pp. 2-29.

García Hernández MP, Agulleiro B, 1992. Ontogeny of the endocrine pancreas in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). An immunocytochemical study. Cell Tissue Res. 270, 339-352.

García Hernández MP, Lozano MT, Agulleiro B, 1994. Ontogeny of the endocrine pancreas in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): an ultrastructural study. I. The primordial cord and the primitive, single and primordial islets. Cell Tissue Res. 276, 309-322.

Guyot E, Diaz JP, Romestand B, Connes R, 1998. Insulin during the early postembryonic development of the gilthead sea bream, *Sparus aurata*: ultrastructural, immunohistochemical and biochemical studies. Gen. Comp. Endocrinol. 110, 147-156.

Hagiwara H, Obwada N, Aoki T, Takata K, 2000. Ciliogenesis and ciliary abnormalities. Med. Electron. Microsc. 33, 109- 114.

Harmon JS, Rieniets LM, Sheridan MA, 1993. Glucagon and insulin regulate lipolysis in trout liver by altering phosphorylation of triacylglycerol lipase. Am. J. Physiol. 265, 255-260.

Harmon JS, Sheridan MA, 1992. Effects of nutritional state, insulin, and glucagon on lipid mobilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol. 87, 214-221.

Hazelwood RL, 1984. Pancreatic hormones, insulin/glucagon molar ratios, and somatostatin as determinants of avian carbohydrate metabolism. J. Exp. Zool. 232, 647-652.

Hrytsenko O, Wright JR, Pohajdak B, 2008. Regulation of insulin gene expression and insulin production in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Gen. Comp. Endocrinol. 155, 328-340.

Ince BW, Thorpe A, 1977. Plasma insulin and glucose responses to glucagon and catecholamines in the European silver eel (*Anguilla anguilla* L). Gen. Comp. Endocrinol. 33, 453-459.

Irwin DM, Wong K, 2005. Evolution of new hormone function: loss and gain of a receptor. J. Hered. 96, 205-211.

Jensen J, Conlon JM, 1992. Characterization of peptides related to neuropeptide tyrosine and peptide tyrosine-tyrosine from the brain and gastrointestinal tract of teleost fish. Eur. J. Biochem. 210, 405-410.

Jiang G, Zhang BB, 2003. Glucagon and regulation of glucose metabolism. Am. J. Physiol. 284, 671-678.

Kachra Z, Barash I, Yannopoulos, C, Khan, MN, Guyda, HJ, Posner BI, 1991. The differential regulation by glucagon and growth hormone of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins in cultured rat hepatocytes. Endocrinology 128, 1723-1730.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer. 26, 239-257.

Kieffer TJ, Habener JF, 1999. The glucagon-like peptides. Endocr. Rev. 20, 876-913.

Kimmel JR, Plisetskaya EM, Pollock HG, Hamilton JW, Rouse JB, Ebner KE, Rawitch AB, 1986. Structure of the peptide from coho salmon endocrine pancreas with homology to neuropeptide Y. Biochem. Biophys. Res. Commun. 141, 1084-1091.

Klein SE, Sheridan MA, 2008. Somatostatin signaling and the regulation of growth and metabolism in fish. Mol. Cell Endocrinol. 286, 148-54.

Kurokawa T, Suzuki T, 2002. Development of neuropeptide Y- related peptides in the digestive organs during the larval stage of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Gen. Comp. Endocrinol. 126, 30-38.

Kurokawa T, Suzuki T, Andoh T, 2000. Development of cholecystokinin and pancreatic polypeptide endocrine systems during the larval stage of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Gen. Comp. Endocrinol. 120, 8-16.

Larhammar D, 1996. Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. Regul. Pept. 62, 1-11.

Lin X, Otto CJ, Cardenas R, Peter RE, 2000. Somatostatin family of peptides and its receptors in fish. Can. J. Physiol. Pharmacol. 78, 1053-1066.

Lin X, Otto CJ, Peter RE, 1999a. Expression of three distinct somatostatin messenger ribonucleic acid (mRNAs) in goldfish brain: characterization of the complementary deoxyribonucleic acids, distribution and seasonal variation of the mRNAs, and action of a somatostatin-14 variant. Endocrinology 140, 2089-2099.

Lin X, Peter RE, 2001. Somatostatins and their receptors in fish. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 129, 543-550.

Lou DS, McKeown BA, Rivier J, Vale W, 1990. In vitro responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) somatotrophs to carp growth hormone-releasing factor (GRF) and somatostatin. Gen. Comp. Endocrinol. 80, 288-298.

López-Patiño MA, Guijarro AI, Isorna E, Delgado MJ, Alonso-Bedate M, de Pedro N, 1999. Neuropeptide Y has a stimulatory action on feeding behavior in goldfish (*Carassius auratus*). Eur. J. Pharmacol. 377, 147-153.

Lozano MT, Agulleiro B, 1986. Immunocytochemical and ultrastructural study of the endocrine pancreas of *Mugil auratus* and *Mugil saliens* L. (Teleostei). J. Submicrosc. Cytol. 18, 85-98.

Lozano MT, García-Ayala A, Abad ME, Agulleiro B, 1991a. Pancreatic endocrine cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) I. Immunocytochemical characterization of glucagon- and PP-related peptides. Gen. Comp. Endocrinol. 81, 187-197.

Lozano MT, García-Ayala A, Abad ME, Agulleiro B, 1991b. Pancreatic endocrine cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). II. Immunocytochemical study of insulin and somatostatin peptides. Gen. Comp. Endocrinol. 81, 198-206.

Lozano y Rey, 1952. Ictiología Ibérica. Tomo III. Peces Fisoclistos, Subserie torácicos. Primera Parte. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

Luft JH, 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 409-414.

Magnoni LJ, Míguez JM, Soengas JL, 2001. Glucagon effects on brain carbohydrate and ketone body metabolism of rainbow trout. *J. Exp. Zool.* 290, 662-671.

Marchant TA, Dulka JG, Peter RE, 1989. Relationship between serum growth hormone levels and the brain and pituitary content of immunoreactive somatostatin in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73, 458-468.

Marchant TA, Fraser RA, Andrews PC, Peter RE, 1987. The influence of mammalian and teleost somatostatins on the secretion of growth hormone from goldfish (*Carassius auratus* L.) pituitary fragments in vitro. *Regul. Pept.* 17, 41-52.

Migliorini RH, Lima-Verde JS, Machado CR, Cardona GM, Garofalo MA, Kettelhut IC, 1992. Control of adipose tissue lipolysis in ectotherm vertebrates. *Am. J. Physiol.* 263, 857-862

Milewsky WM, Duguay SJ, Chan SJ, Steiner DF, 1998. Conservation of PDX-1 structure, function, and expression in zebrafish. *Endocrinology* 139, 1440-1449.

Mommsen TP, Moon TW, 1990. Metabolic response of teleost hepatocytes to glucagon-like peptide and glucagon. *J. Endocrinol.* 126, 109-115.

Mommsen TP, Plisetskaya EM, 1991. Insulin in fishes and agnathans: history, structure, and metabolic regulation. *Rev. Aquat. Sci.* 4, 225-259.

Moon TW, 2004. Hormones and fish hepatocyte metabolism: "The good, the bad and the ugly!". *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 139, 335-45.

Moore CA, Kitilson JK, Dah, SK, Sheridan MA, 1995. Isolation and characterization of cDNA encoding for preprosomatostatin containing [Tyr⁷, Gly¹⁰]-SS-14 from endocrine pancreas of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 98, 253-261.

Moore CA, Kitilson JK, Ehrmazn MM, Sheridan MA, 1999. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) posses two somatostatin mRNAs that are differentially expressed. *Am. J. Physiol.* 277, 1553-1561.

Morrison CM, Miyake T, Wright JR, 2001. Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) *J. Morphol.* 247, 172-195

Morrison CM, Pohajdak B, Tam J, Wright JR, 2004. Development of the islets, exocrine pancreas, and related ducts in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *J. Morphol.* 261, 377-389.

- Nakano A, Luini A. 2010. Passage through the Golgi. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 22, 471-478.
- Narnaware YK, Peyon PP, Lin X, Peter RE, 2000. Regulation of food intake by neuropeptide Y in goldfish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, 1025-1034.
- Nelson LE, Sheridan, MA, 2005. Regulation of somatostatin and their receptors in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 117-133.
- Nelson LE, Sheridan MA, 2006. Gastroenteropancreatic hormones and metabolism in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 48, 116-24.
- Noe BD, Milgram SL, Balasubramanian A, Andrews PC, Calka J, McDonald JE, 1989. Localization and characterization of neuropeptide Y-like peptides in the brain and islet organ of the anglerfish (*Lophius americanus*). *Cell Tissue Res.* 257, 303- 311.
- Novoa S, Capilla E, Rojas P, Baró J, Gutiérrez J, Navarro I., 2004. Glucagon and insulin response to dietary carbohydrate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 139, 48-54.
- Nozaki M, Miyata K, Oota Y, Gorbman A, Plisetskaya EM, 1988. Different cellular distributions of two somatostatins in brain and páncreas of salmonids and their associations with insulin- and glucagonsecreting cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 69, 267-280.
- Oyama H, Martin J, Sussman K, Weir GC, Permutt A, 1981. The biological activity of catfish pancreas somatostatin. I. *J. Biol. Chem.* 255, 2251-2254.
- Pack M, Solnica-Krezel L, Malicki J, Neuhauss SC, Schier AF, Stemple DL, Driever W, Fishman MC, 1996. Mutations affecting development of zebrafish digestive organs. *Development.* 123, 321-328.
- Patel YC, 1999. Somatostatin and its receptors family. *Front. Neuroendocrinol.* 20, 157-198.
- Planas JV, Capilla E, Gutiérrez J, 2000. Molecular identification of a glucose transporter from fish muscle. *FEBS Lett.* 481, 266-270.
- Plisetskaya EM, 1990. Glucagon and related peptides (an overview). *Prog. Clin. Biol. Res.* 342, 67-72.
- Plisetskaya EM, Duguay SJ, 1993. Pancreatic hormones and metabolismo in ectothermic vertebrates: current views. In: Schreibman MP, Scanes CG, Pang PKT (Eds.). *The Endocrinology of Growth, Development, and Metabolism in Vertebrates.* Academic Press, New York, pp. 265-287.

Plisetskaya EM, Mommsen TP, 1996. Glucagon and glucagon-like peptides in fishes. *Int. Rev. Cytol.* 168, 187-257.

Plisetskaya EM, Ottolenghi C, Sheridan MA, Mommsen TP, Gorbman A, 1989. Metabolic effects of salmon glucagon and glucagon-like peptide in coho and chinook salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73, 162-165

Plisetskaya EM, Pollock HG, Elliott WM, Youson JH, Andrews PC, 1988. Isolation and structure of lamprey (*Petromyzon marinus*) insulin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 69, 46-55.

Plisetskaya EM, Pollock HG, Rouse JB, Hamilton JW, Kimmel JR, Andrews EC, Gorbman A, 1986. Characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) islet somatostatins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 63, 252-263.

Reinecke M, Müller C, Segner H, 1997. An immunohistochemical analysis of the ontogeny, distribution and coexistence of 12 regulatory peptides and serotonin in endocrine cells and nerve fibers of the digestive tract of the turbot, *Scophthalmus maximus* (Teleostei). *Anat. Embryol.* 195, 87-101.

Reynolds ES, 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-212.

Rivas R J, Nishioka RS, Bern H A, 1986. In vitro effects of somatostatin and urotensin II on prolactin and growth hormone secretion in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 63, 245-251.

Rombout JHWM, Rademakers LHPM, Hees JP, 1979. Pancreatic endocrine cells of *Barbus conchoni* (Teleostei, Cyprinidae), and their relation to the enteroendocrine cells. *Cell Tissue Res.* 203, 9-23.

Rombout JHWM, Taverne-Thiele JJ, 1982. An immunocytochemical and electron-microscopical study of endocrine cells in the gut and pancreas of a stomachless teleost fish, *Barbus conchoni* (Cyprinidae). *Cell Tissue Res.* 227, 577-593.

Rousseau K, Le Belle N, Pichavant K, Marchelidon J, Chow BK, Boeuf G, Dufour S, 2001. Pituitary growth hormone secretion in the turbot, a phylogenetically recent teleost, is regulated by a species-specific pattern of neuropeptides. *Neuroendocrinology* 74, 375-385.

Sarasquete MC, Polo A, González de Canales ML, 1993. A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of sea bream, *Sparus aurata*. *L. Histochem. J.* 25, 430-437.

Satake H, Sasaki N. 2010. Comparative overview of toll-like receptors in lower animals. *Zool. Sci.* 27, 154-161.

Shahbazi F, Holmgren S, Larhammar D, Jensen J, 2002. Neuropeptide Y effects on vasorelaxation and intestinal contraction in the Atlantic cod *Gadus morhua*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282, 1414-1421.

Sheridan, MA, 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 107, 495-508.

Sheridan MA, Hagemeister AL, 2010. Somatostatin and somatostatin receptors in fish growth. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167, 360-365.

Sheridan MA, Kao YH, 1998. Regulation of metamorphosis-associated changes in the lipid metabolism of selected vertebrates. *Am. Zool.* 38, 350-368.

Sheridan MA, Kittilson JD, Slagter BJ, 2000. Structure–function relationships of the signaling system for the somatostatin peptide hormone family. *Am. Zool.* 40, 269-286.

Sheridan MA, Plisetskaya EM, Bern HA, Gorbman A, 1987. Effects of somatostatin-25 and urotensin II on lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 66, 405-414.

Silverstein JT, Bondareva VM, Leonard JB, Plisetskaya EM, 2001. Neuropeptide regulation of feeding in catfish, *Ictalurus punctatus*: a role for glucagon-like peptide-1 (GLP-1)? *Comp. Biochem. Physiol.* 129, 623-631.

Silverstein JT, Breininger J, Baskin DG, Plisetskaya EM, 1998. Neuropeptide Y-like gene expression in the salmon brain increases with fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110, 157-165.

Silverstein JT, Plisetskaya EM, 2000. The effects of NPY and insulin on food intake regulation in fish. *Amer. Zool.* 40, 296-308.

Stange EF, Schneider A, Schusdziarra V, Ditschuneit H, 1984. Inhibitory effects of somatostatin on growth and differentiation in cultured intestinal mucosa. *Horm. Metab. Res.* 16, 74-48.

Stefan Y, Falkmer S, 1980. Identification of four endocrine cell types in the pancreas of *Cottus scorpius* (Teleostei) by immunofluorescence and electron microscopy. *Gen. Comp. Endocrinol.* 42, 171-178.

Sternberger L, 1986. Immunocytochemistry. Ed. Wiley, New York.

Sweeting RM, McKeown, BA, 1987. Somatostatin reduces plasma growth hormone levels during seawater adaptation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Can. J. Zool. 64, 2062-2063.

Tan K, Atabani G, Marks V, 1985, Divergent effect of glucagon antibodies on arginine and glucose-stimulated insulin secretion in the rat. Diabetologia. 28, 441-444.

Uesaka T, Yano K, Yamasaki M, Nagashima K, Ando M, 1994. Somatostatin-related peptides isolated from the eel gut: effects on ion and water absorption across the intestine of the seawater eel. J. Exp. Biol. 188, 205-216.

Unger RH, 1983. The berson memorial lecture. Insulin-glucagon relationships in the defense against hypoglycemia. Diabetes 6, 575-83.

Unger RH, Orci L, 1981a. Glucagon and the A cell: physiology and pathophysiology. N. Engl. J. Med. 304, 1575-1580.

Unger RH, Orci L, 1981b. Glucagon and the A cell: physiology and pathophysiology. N. Engl. J. Med. 304, 575-580.

van Bergen en Henegouwen PMP, Leunissen JLM, 1986. Controlled growth of colloidal particles and implications for labelling efficiency. Histochemistry 85, 217-229.

Vallejo AN, Miller NW, Harvey NE, Cuchens MA, Warr GW, Clem LW. 1992. Cellular pathway(s) of antigen processing and presentation in fish APC: endosomal involvement and cell-free antigen presentation. Dev Immunol. 3,51-65.

Very NM, Knutson D, Kittilson JD, Sheridan MA, 2001. Somatostatin inhibits growth of rainbow trout. J. Fish Biol. 59, 157-165.

Very NM, Sheridan MA, 2002. The role of somatostatinsin the regulation of growth in fish. Fish Physiol. Biochem. 27, 217-226.

Villaplana M, García Ayala A, García Hernández MP, Agulleiro B, 1996. Early organization of the pituitary gland in *Sparus aurata* L. (Teleostei). An ultrastructural study. Anat Embryol. 193, 441-452.

Volkoff H, Canosa LF, Unniappan S, Cerdá-Reverter JM, Bernier NJ, Kelly, SP, Peter RE, 2005. Neuropeptides and the control of food intake in fish. Gen. Comp. Endocrinol. 142, 3-19.

Volkoff H, Unniappan S, Kelly S, 2009. The Endocrine Regulation of Food Intake. Fish Physiol. 28, 421-465.

Vona-Davis LC, McFadden DW, 2007. NPY family of hormones: clinical relevance and potential use in gastrointestinal disease. Curr. Top Med. Chem. 7, 1710-1720.

Wang BL, Larsson LI, 1985. Simultaneous demonstration of multiple antigens by indirect immunofluorescence or immunogold staining. Novel light and electron microscopical double and triple staining methods employing primary antibodies from the same species. *Histochemistry* 83, 47–56.

Weiss RE, Reddi AH, Nimin ME, 1981. Somatostatin can locally inhibit proliferation and differentiation of cartilage and bone precursor cells. *Calcified Tissue Int.* 33, 425-430.

Wyllie AH, 2010. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol. Neurobiol.* 42, 4-9.

Woods SC, Lutz TA, Geary N, Langhans W, 2006. Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philos Trans. R. Soc. Lond.* 361, 1219-1235.

Yang H, Morrison CM, Conlon JM, Laybolt K, Wright JR, 1999. Immunocytochemical characterization of the pancreatic islets cells of the Nile tilapia. (*Oreochromis niloticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 114, 47-56.

Youson JH, Al-Mahrouki AA, 1999. Ontogenetic and phylogenetic development of the endocrine pancreas (islet organ) in fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 116, 303-335.

Youson JH, Al-Mahrouki AA, Amemiya Y, Graham LC, Montpetit CJ, Irwin DM, 2006. The fish endocrine pancreas: review, new data, and future research directions in ontogeny and phylogeny. *Gen. Comp. Endocrinol.* 148, 105-115.

Youson JH, Potter IC, 1993. An immunohistochemical study of enteropancreatic endocrine cells in larvae and juveniles of the southern-hemisphere lampreys *Geotria australis* and *Mordacia mordax*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 92, 151-67.

Yunker WK, Smith S, Graves C, Davis PJ, Unniappan S, Rivier JE, Peter RE, Chang JP, 2003. Endogenous hypothalamic somatostatins differentially regulate growth hormone secretion from goldfish pituitary somatotropes in vitro. *Endocrinology* 144, 4031-4041.

Zhou L, Irwin DM, 2004. Fish proglucagon genes have differing coding potential. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 137, 255-264.