

Flexibilidad digestiva durante el ayuno en peces: análisis de los cambios en el caraciforme *Hyphessobrycon luetkenii*.



Autor:

Bach. Lucía Gaucher. Estudiante de la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo - Uruguay.
Mail: lgaucher@fcien.edu.uy

Orientador:

Dr. Daniel E. Naya. Departamento de Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias y Centro Universitario de la Regional Este, Universidad de la República, Montevideo – Maldonado, Uruguay.
Mail: dnaya@fien.edu.uy

Lugar de Ejecución:

Laboratorio de Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo - Uruguay. Iguá 4225, Piso 6, Ala Norte. Tel.: 5258618(7) Int142.

Tribunal:

Dr. Marcelo Loureiro. Departamento de Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

MSc. Franco Teixeira de Mello. Departamento de Ecología y Evolución, Centro Universitario de la Regional Este, Universidad de la República, Maldonado, Uruguay.

Resumen

La flexibilidad digestiva es un fenómeno generalizado en el reino animal. Además, la congruencia entre datos empíricos y los modelos de digestión óptima apoyan fuertemente la idea de que la misma es adaptativa, habiendo evolucionado por selección natural. Sin embargo, la serie de pasos concretos por la cual la flexibilidad digestiva evolucionó está lejos de ser comprendida plenamente. En este sentido, la evidencia existente para los vertebrados tetrápodos sugiere que existen dos estrategias principales para la regulación del tracto digestivo durante periodos de ayuno. En especies endotermas ocurre principalmente una disminución en el número de enterocitos que conforman el epitelio de la mucosa intestinal, mientras que en especies ectotermas ocurre una transición en la configuración del epitelio intestinal (de columnar simple a pseudoestratificado), en conjunto con una marcada hipotrofia de los enterocitos. Sin embargo, la flexibilidad digestiva en los peces, grupo basal a los vertebrados tetrápodos, ha sido muy poco analizada dentro de este contexto. Por ello, el presente trabajo está destinado a analizar los cambios en el intestino, a nivel morfológico e histológico, que ocurren luego de 7 y 14 días de ayuno en una especie de carácido (*Hyphessobrycon luetkenii*). Se encontró que el ayuno a corto plazo se correlaciona con una marcada disminución en el tamaño del tracto digestivo –i.e., la masa seca del intestino y de los ciegos pilóricos se redujo a 42.3%, mientras que el largo intestinal disminuyó a un 73.9% con respecto a los valores de alimentación– y que estos cambios fueron acompañados por un cambio en la organización del epitelio digestivo, el cual pasó de columnar simple a pseudoestratificado. Estos resultados, conjuntamente con datos previos sobre los cambios en las tasas de renovación celular en otras especies de peces, sugieren que la regulación del tracto digestivo en peces ocurre a ambos niveles, es decir, en la tasa de renovación celular y en la configuración del epitelio intestinal.

1. Introducción

La plasticidad fenotípica es el fenómeno por el cual un mismo genotipo produce diferentes fenotipos en diferentes contextos ambientales (Pigliucci 2001). La plasticidad en un rasgo dado es considerada un rasgo en sí mismo, que puede estar genéticamente controlado y por tanto es capaz de evolucionar independientemente de otros caracteres del organismo (Bradshaw 1965; Pigliucci 2001). Esta consideración sugiere un rol dual del ambiente en la evolución, ya que además de determinar el fenotipo sobre el cual actúa la selección, impone las presiones selectivas que actúan sobre el mismo (Whitman and Agrawal 2009).

En ambientes en los cuales las condiciones abióticas y bióticas varían más rápidamente de lo que se suceden las generaciones de una determinada especie, es esperable que los cambios fenotípicos sean reversibles. Esta sub-categoría de cambios fenotípicos recibe el nombre de flexibilidad fenotípica (Piersma and Drent 2003) y se consideran una estrategia de tipo generalista que permite afrontar cambios ambientales de alta frecuencia (Gianoli 2004). En términos generales, se acepta que aquellos individuos con mayor capacidad de ajustarse a los cambios ambientales pueden incrementar la explotación de los recursos limitantes y por tanto su adecuación biológica (Gianoli 2004).

El sistema digestivo representa la mayor interfase, en términos de materia y energía, de intercambio entre los organismos y su medio, y por tanto es esperable que dicho sistema esté sujeto a fuertes presiones selectivas (Secor 2001). En este sentido, la flexibilidad digestiva permite a los animales adecuarse a las variaciones en las demandas funcionales impuestas sobre este sistema, lo que es muy importante por dos razones. En primer lugar, permite maximizar la extracción de energía y nutrientes provenientes del alimento que está siendo consumido; en segundo lugar, disminuye el costo de mantenimiento asociado a uno de los sistemas más costosos en términos de

consumo de energía y proteínas. En línea con esto, decenas de trabajos empíricos han demostrado que el sistema digestivo responde de forma flexible a distintos niveles de organización (desde los genes a la morfometría) al cambiar las condiciones ambientales (Piersma and Lindstrom, 1997; Penisi, 2005; Naya 2008; Karasov et al., 2011). Por ejemplo, es sabido que: (1) Ocurre una regulación de “hacia arriba” de los atributos digestivos de forma paralela al aumento en la cantidad de material refractario en la dieta (e.g., Young Owl and Baltzi, 1998; Starck, 1999a; Liu and Wang, 2007); sin embargo, si la calidad de la dieta se reduce más allá de cierto punto, esta relación se revierte y los rasgos del tracto digestivo sufren una regulación “hacia abajo” (e.g., Loeb et al. 1991; German et al. 2010); (2) Ocurre una regulación de los atributos digestivos en paralelo a la variación en las demandas energéticas del organismo (e.g., Toloza et al., 1991; Hammond et al., 1994; Naya et al., 2007); sin embargo, cuando las demandas energéticas son muy altas esta relación se estabiliza, lo que probablemente esté relacionado con limitaciones fisiológicas a otros niveles (e.g., disipación de calor; Speakman and Krol, 2005; Krol et al., 2007); (3) Ocurre una regulación de los atributos digestivos “hacia abajo” al reducirse la cantidad de alimento consumido (Kristan and Hammond, 2001; Naya and Bozinovic, 2006), lo cual es particularmente notable durante los períodos de ayuno (e.g., Burrin et al., 1988; Secor and Diamond, 1998; Cramp et al., 2005).

En relación a los cambios digestivos observados durante el ayuno, se plantea la existencia de dos estrategias alternativas en los vertebrados (Secor et al. 2000; Starck, 2005; Starck et al., 2007). En especies endotermas, los ajustes en el tracto digestivo implican principalmente ajustes en la tasa de renovación celular, mientras la estructura del epitelio se mantiene intacta, i.e., un epitelio columnar simple (Burrin et al. 1988; Dunel-Erb et al., 2001; Hume et al., 2002). Los cambios en el tamaño de los enterocitos y en el largo de las microvellosidades son modestos, y consecuentemente sólo es posible una moderada modulación a nivel masa-especifico –mediante cambios

en las enzimas y la actividad y/o densidad de transportadores- (Hammond et al., 1994; Secor and Diamond 1998; Dunel-Erb et al., 2001). Es por esto que las tasas de absorción masa-especificas no varían, o incluso pueden aumentar, durante períodos de ayuno prolongados (Karasov and Diamond, 1983; Carey, 1990; Carey, 2005) .Por otra parte, en las especies ectotermas el numero de enterocitos parece mantenerse relativamente constante, pero la mucosa intestinal se modifica pasando de un epitelio columnar simple a un epitelio pseudoestratificado (Starck and Beese, 2001;; Christel et al., 2007; Secor, 2008; Naya et al., 2009 Esta transformación está relacionada con un descenso en la presión sanguínea del tejido conectivo en las vellosidades intestinales, y con una notable reducción en el tamaño de los enterocitos (Starck and Wimmer, 2005). Este cambio histológico es debido a una reducción muy importante en el tamaño de los enterocitos, la cual se asocia, a su vez, a la desaparición de gotas lipídicas supranucleares (Starck and Beese, 2001; Starck and Wimmer, 2005; Lignot et al., 2005; Starck et al., 2007). Finalmente, el largo de las microvellosidades intestinales se reduce de forma notable, principalmente en aquellas especies que experimentan largos periodos de ayuno en condiciones naturales (Secor et al. 2000; Secor, 2005a; Secor, 2005b; Christel et al. 2007; Cox and Secor, 2008).

Los modelos de regulación digestiva planteados en el párrafo anterior están basados en la evidencia proveniente de diferentes especies de mamíferos y aves (modelo endotérmico) o de especies de anfibios y reptiles (modelo ectotérmico) (Starck, 2005; Fig. 1). Sin embargo, la información existente a la fecha sobre los ajustes en el tracto digestivo durante el ayuno en los peces, grupo basal a los vertebrados, no ha sido considerada dentro de este marco teórico (Starck, 1999b; Starck, 2005).

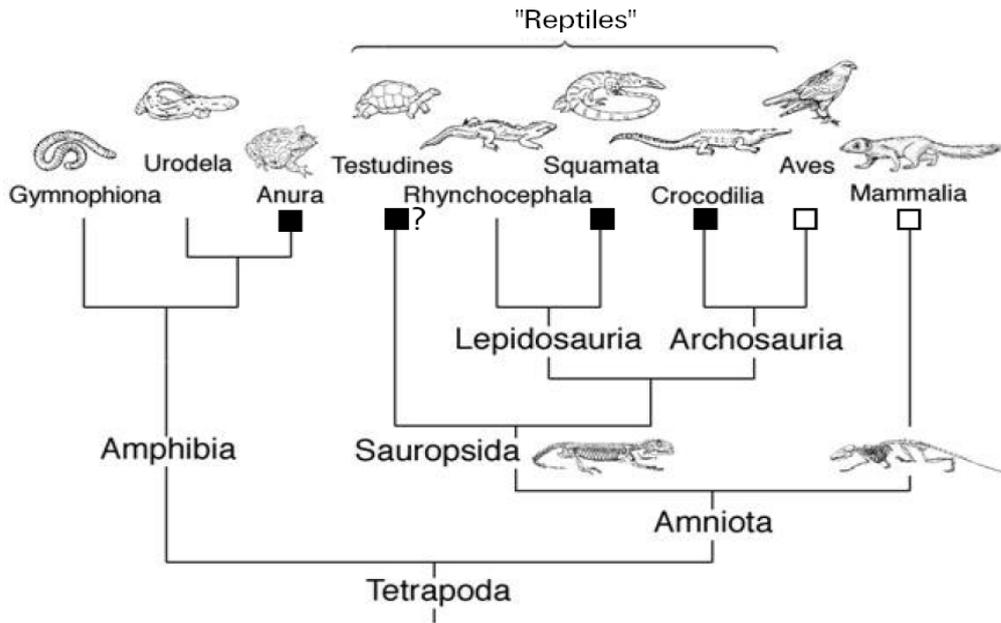


Figura 1. Cladograma de los vertebrados tetrápodos donde se indican los grupos en los que la regulación digestiva está basada en las tasas de recambio celular (cuadrados blancos) y los grupos en los cuales la regulación digestiva está basada en un cambio en la configuración del epitelio intestinal (cuadrados negros). Figura tomada de Starck (2005).

2. Hipótesis y Objetivos

Las hipótesis de este estudio son:

(1) Dado que *Hyphessobrycon luetkenii* es una especie ectoterma, se espera que ocurra la reducción en el tamaño del intestino durante el ayuno y ésta se encuentre asociada a un cambio en la configuración de la mucosa intestinal. En particular, se predice que los organismos en ayuno deberían presentar menores tamaños de las cámaras digestivas, una menor cantidad de pliegues intestinales (los cuales, a la vez, debieran ser de menor tamaño), y una configuración intestinal pseudoestratificada asociada a enterocitos de menor tamaño y con escasas vacuolas lipídicas en su interior.

(2) Dado que los peces son, en términos generales, organismos ectotérmicos se espera que los cambios digestivos durante el ayuno sean similares a los arriba descritos para *H. luetkenii*.

Los objetivos de este estudio son:

(1) Analizar los cambios en el intestino, a nivel morfológico e histológico, que ocurren durante el ayuno en una especie de caráciforme (*Hyphessobrycon luetkenii*).

(2) Analizar y discutir la evidencia previamente publicada sobre la regulación digestiva durante el ayuno en peces, a fin de lograr una mayor comprensión de la evolución de la flexibilidad digestiva en los vertebrados.

3. Materiales y Métodos

3.1. Modelo Animal

La familia characidae es un importante componente de la ictiofauna Neotropical. Dentro de esta familia, el género *Hyphessobrycon* incluye más de 100 especies validas, distribuidas desde Méjico hasta la provincia de Buenos Aires en Argentina (Miquelarena and López, 2006). Varias especies de este género han sido registradas en la cuenca del Río de la Plata, siendo *H. luetkenii* una especie común en la región (Marcelo Loureiro com. pers.) (Fig. 2). *Hyphessobrycon luetkenii* es una especie omnívora de pequeño tamaño, cuya dieta está principalmente compuesta por algas, detritos y pequeños invertebrados (Soneira et al., 2006).



Figura 2. Vista lateral de un ejemplar de *Hyphessobrycon luetkenii*

3.2. Diseño experimental

Se colectaron quince individuos adultos, mediante una red de arrastre, el día 19 de Junio de 2010, en el arroyo de Punta Negra, Maldonado, Uruguay ($34^{\circ}53'S$ - $55^{\circ}13'W$; Fig. 3). Los peces fueron llevados al laboratorio el mismo día de la captura y asignados al azar a uno de tres grupos. Los peces del primer grupo fueron sacrificados mediante una sobredosis de 2 fenoxietanol luego de dos días de ayuno (grupo control, $n=5$), los peces del segundo grupo fueron sacrificados luego de 7 días de ayuno (grupo ayuno 7 días, $n=5$), y por último, los peces del tercer grupo fueron sacrificados luego de 14 días de ayuno (grupo ayuno 14 días, $n=5$). Los individuos del grupo control fueron privados de alimento por dos días para: (i) obtener tractos digestivos vacíos sin manipular demasiado el tejido, (ii) reducir las diferencias en el estatus nutricional entre individuos.

En el laboratorio, los animales fueron colocados en acuarios plásticos individuales (90 x 110 x 230 mm), y mantenidos sin alimento a una temperatura de $17 \pm 1^{\circ} C$, bajo fotoperiodo natural (11L:13O). Para cada individuo se midió la masa

corporal inicial (Im_b) con una balanza electrónica (± 0.0001 g) y los largos total y estándar (LT y LE, respectivamente) con una regla de plástico (± 1 mm).

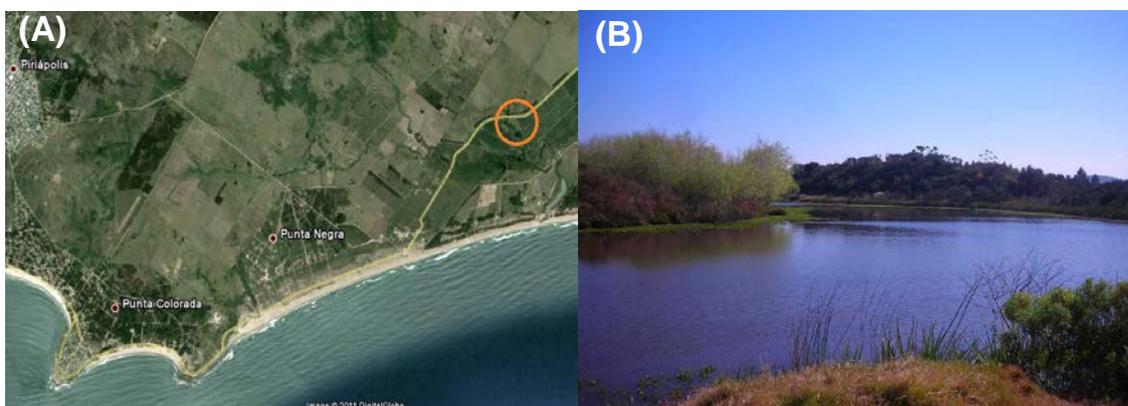


Figura 3. (A) Mapa del área de estudio indicando (con un círculo naranja) la ubicación de la Laguna Punta Negra. (B) Foto del lugar preciso en donde se colectaron los individuos para este estudio.

3.3. Determinaciones morfológicas.

Los peces fueron anestesiados con 2-phenoxyethanol y la masa corporal final (Fm_b) fue medida con una balanza electrónica (± 0.0001 g). Luego, los animales fueron sacrificados y disecados, removiéndose el estómago, los ciegos pilóricos, el intestino, el hígado, la grasa visceral y las gónadas. El estómago e intestino fueron diseccionados cuidadosamente para evitar que se estiren y luego se midió el largo con una regla (± 1 mm). Se contaron los ciegos pilóricos con la ayuda de un microscopio binocular (4 X). El estómago, los ciegos pilóricos y el intestino fueron lavados y enjuagados con una solución de NaCl 0.9%, secados con toallas de papel y pesados (± 0.0001 g). De cada individuo se obtuvo una porción de intestino (de la zona inmediatamente posterior al ciego pilórico mas distal) de aproximadamente un centímetro de largo, la cual fue inmediatamente fijada en formol buffer al 10% para los análisis histológicos (ver más adelante). Finalmente, todos los órganos, junto con las carcasas fueron secados en una estufa a 60° C durante 4 días, para luego pesarlos individualmente (± 0.0001 g). La masa seca total del intestino se estimó multiplicando

la masa húmeda total por la relación entre masa seca y húmeda calculada a partir de la sección de intestino delgado que no fue utilizada para los análisis histológicos.

3.4. Determinaciones histológicas

El tejido intestinal previamente fijado fue lavado en agua corriente, deshidratado mediante series progresivas de etanol, y fijado en cera de parafina, de acuerdo con técnicas comunes de microscopía óptica (Bancroft and Stevens, 1996). Los tejidos se seccionaron transversalmente a 6 μm de espesor y fueron montados en portaobjetos de vidrio. Entre ocho y doce secciones seriadas por individuo fueron teñidas con hematoxilina y eosina y fotografiadas a diferentes aumentos (40x, 100x, 200x y 400x) utilizando un microscopio óptico con una cámara digital montada. Las imágenes fueron capturadas digitalmente y subsecuentemente abiertas con el software NIS Elements AR version 3.1, con el cual se tomaron medidas lineales. Se seleccionó una sección de tejido de cada individuo para la cual se midió: (1) el diámetro intestinal, (2) el ancho de la capa muscular externa (incluyendo las capas musculares longitudinal y transversal), (3) el número total de pliegues intestinales, (4) la altura de cinco pliegues elegidos al azar, tomados desde el borde interno de la capa muscular a el borde externo de la mucosa, (5) el ancho de cinco pliegues elegidos al azar, tomado a la altura del punto medio de cada uno, y (6) la altura y diámetro de cinco enterocitos elegidos al azar de la punta de un pliegue intestinal.

3.5. Análisis estadístico

Las diferencias entre grupos en tamaño corporal (Im_b , Fm_b , TL y SL), el índice de condición corporal ($\text{BCI} = \text{Fm}_b / \text{SL}^{2.028}$), el número de ciegos pilóricos, el ancho de la capa muscular externa, y número de pliegues intestinales, fueron evaluados por separado mediante ANOVAs de una vía. Las diferencias entre grupos en el diámetro intestinal, largo de los órganos digestivos y la masa seca de todos los órganos fueron evaluados mediante ANCOVAs de una vía, utilizando respectivamente Fm_b , SL y la

masa seca de la carcasa como co-variables. Las diferencias en el ancho y altura de los pliegues intestinales y en el diámetro de los enterocitos fueron analizadas mediante ANOVAS de medidas repetidas. En todos los casos comparaciones *a posteriori* entre los grupos fueron evaluadas mediante el test HSD de Tukey. Antes de todos los análisis estadísticos, los datos fueron examinados para evaluar las asunciones de normalidad y homogeneidad de la varianza, usando test de Kolmogorov - Smirnov y de Levene, respectivamente. En algunos casos los datos fueron transformados a la escala logarítmica (e.g., diámetro intestinal, masa seca de los órganos) para cumplir los supuestos del análisis. Los valores son presentados como medias \pm 1 error estándar y la significancia estadística fue establecida al nivel de 0.05. Todos los análisis fueron realizados utilizando el paquete estadístico Statistica versión 6.0.

3.6. Análisis de la evidencia existente sobre la flexibilidad digestiva en peces

Para abordar el segundo objetivo se realizó una búsqueda bibliográfica en la base de datos "ISI Web of Science" con las palabras claves "digestive flexibility" y "gut size" conjuntamente con la palabra "fish". A partir de estos trabajos y de la revisión de las referencias existentes en los mismos se construyó una base de datos. El total de trabajos recuperados fue de catorce artículos, en los cuales se reportaban datos sobre la morfometría e histología intestinal. En los casos en que se reportaban valores concretos, se estimó el cambio en las distintas variables digestivas como el porcentaje de decremento con respecto al grupo control (i.e., alimentación), para el resto de los artículos se estudió si la variación ocurría en la dirección esperada por la teoría.

4. Resultados

4.1. Resultados para *H. leutkenii*

No se encontraron diferencias significativas en la masa corporal inicial, en el largo total o en el largo estándar entre los tres grupos (Tabla 1). En cambio, la masa corporal final fue mayor para los animales alimentados, lo que se correspondía con una reducción en la masa corporal de 10% y 13% luego de 7 y 14 días de ayuno, respectivamente (Tabla 1). Del mismo modo, la condición corporal fue mayor en el grupo alimentado que en cualquiera de los grupos de ayuno (Tabla 1). El estómago e intestino fueron más largos en los peces del grupo control (Fig. 4), mientras que el número total de ciegos pilóricos no difirió entre los grupos (Tabla 2). El estómago, los ciegos pilóricos y el intestino fueron notablemente más pesados en los animales del grupo control que en cualquiera de los grupos de ayuno (Fig. 5).

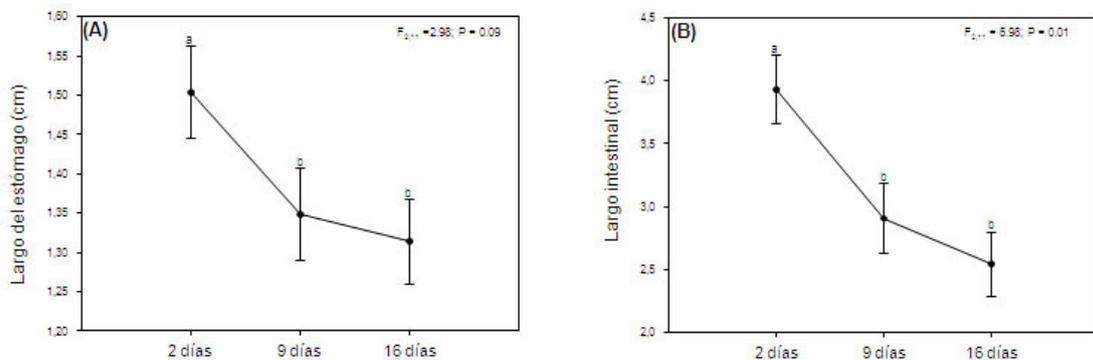


Figura 4. (A) Largo estomacal y (B) largo intestinal para cada grupo experimental. Los valores presentados son medias ajustadas por mínimos cuadrados (barras = 1 SE). Distintas letras representan diferencias significativas entre grupos.

En relación a los órganos no pertenecientes al tracto digestivo, se observó que la masa seca del hígado no se redujo luego de 7 días de ayuno, pero sí luego de 14 días de ayuno (Tabla 1). La grasa visceral, por su parte, si bien mostró la misma tendencia de disminución gradual durante el progreso del ayuno, las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas (Tabla 1).

Tabla 1. Masa corporal inicial (Im_b , en g), y final (Fm_b , en g), largo total (TL, en cm), largo estándar (SL, en cm), índice de condición corporal (BCI, en $g\ cm^{-3}$), pérdida de peso (WL, en %), y peso seco del hígado y de la grasa visceral (en mg), para cada grupo experimental. Los valores presentados corresponden a las medias ajustadas por mínimos cuadrados (masa del hígado y de la grasa) o a las medias absolutas (las demás variables). Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos.

	Control	Ayuno 7-días	Ayuno 14-días	Estadísticos
Im_b	2.54 (± 0.14)	2.10 (± 0.13)	2.33 (± 0.15)	$F_{2,12} = 2.38$; $P = 0.14$
Fm_b	2.54 (± 0.14) ^a	1.89 (± 0.11) ^b	2.02 (± 0.14) ^b	$F_{2,12} = 7.12$; $P = 0.01$
TL	6.2 (± 0.1)	5.7 (± 0.1)	6.0 (± 0.1)	$F_{2,12} = 2.72$; $P = 0.11$
SL	4.9 (± 0.1)	4.6 (± 0.1)	4.8 (± 0.1)	$F_{2,12} = 2.00$; $P = 0.18$
BCI	25.4 (± 1.3)	21.9 (± 1.0)	23.7 (± 1.3)	$F_{2,12} = 2.00$; $P = 0.18$
WL	-----	10.3 (± 0.9)	13.4 (± 1.5)	-----
Hígado	79 (± 4) ^a	73 (± 12) ^{a,b}	50 (± 12) ^b	$F_{2,11} = 4.09$; $P = 0.05$
Grasa	30 (± 9)	13 (± 8)	6 (± 7)	$F_{2,11} = 1.75$; $P = 0.22$

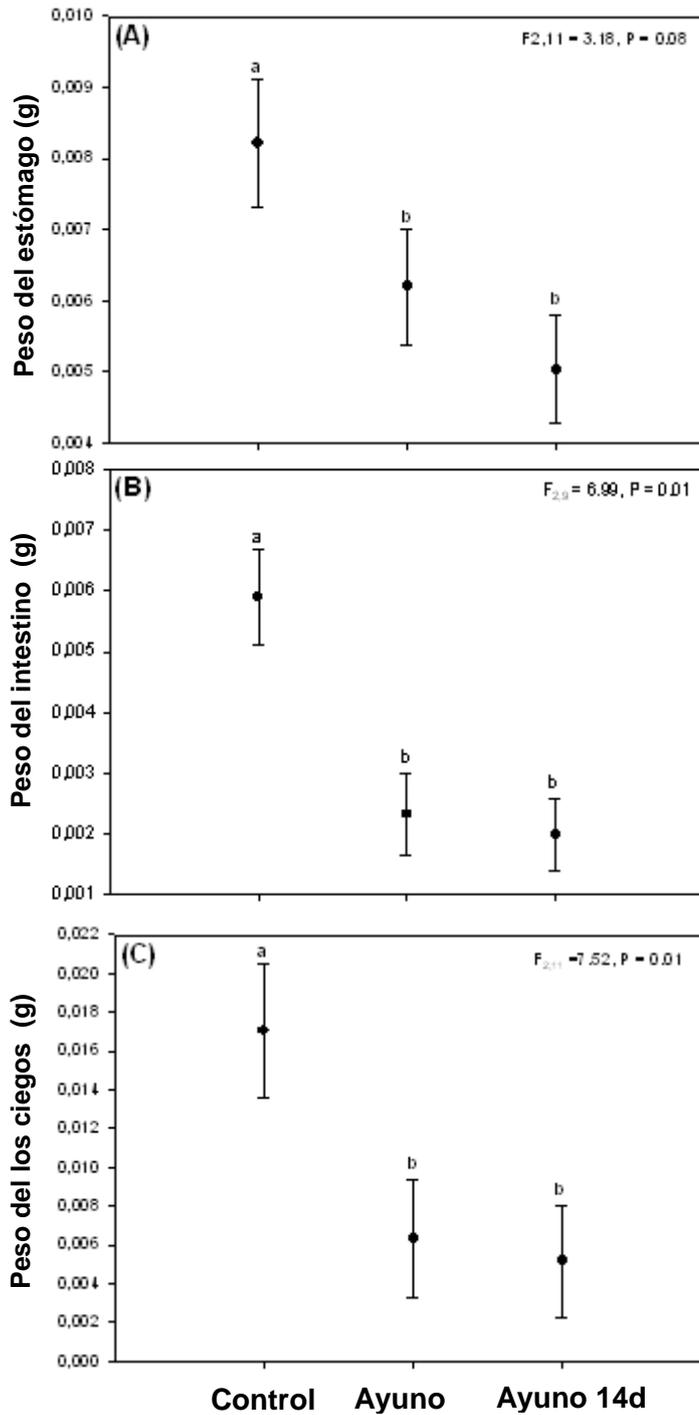


Figura 5. (A) Peso del estómago, (B) peso del intestino y (C) peso de los ciegos pilóricos para cada grupo experimental. Los valores presentados son medias ajustadas por mínimos cuadrados. Distintas letras representan diferencias significativas entre grupos.

A nivel microscópico, encontramos que el epitelio intestinal de los peces alimentados estaba constituido por un epitelio columnar simple, con los núcleos de los enterocitos ubicados en la parte media o basal (Fig. 6A). El citoplasma de los

enterocitos se encontraba lleno de gotas de lípidos supranucleares y translucidas, la membrana celular estaba bien definida, y se veía el “borde en cepillo” de forma clara (Fig. 6B). Durante el ayuno, el diámetro de la sección proximal del intestino se redujo en forma significativa (Tabla 2) y la mucosa intestinal cambió su apariencia a un epitelio pseudoestratificado (Fig. 6C). Además, se observó una menor cantidad de pliegues intestinales, los cuales, a su vez, fueron de menor tamaño (Tabla 2). El tamaño de los enterocitos se redujo notablemente, no observándose de forma clara gotas lipídicas supranucleares ni el “borde en cepillo” apical (Tabla 2; Fig. 6C). El ancho de la capa *muscularis externa* fue mayor en el grupo de ayuno de 14 días que en los individuos alimentados (Tabla 2).

Tabla 2. Número de ciegos pilóricos (NCP), diámetro de la parte proximal del intestino (DI, en mm), ancho de la capa muscular externa (AME, en μm), número de pliegues intestinales (NPI), largo de los pliegues intestinales (LPI, en μm), ancho de los pliegues intestinales (API, en μm), alto de los enterocitos (AE, en μm) y diámetro de los enterocitos (DE, en μm). Los valores presentados corresponden a las medias ajustadas por mínimos cuadrados (diámetro de la parte proximal del intestino) o a las medias absolutas (las demás variables). Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos.

	Control	Ayuno 7días	Ayuno 14 días	Estadísticos
NPC	9.6 (± 0.5)	9.2 (± 0.4)	9.0 (± 0.3)	$F_{2,12} = 0.56$; $P = 0.59$
DI	1.35 (± 0.09) ^a	0.87 (± 0.08) ^b	0.83 (± 0.07) ^b	$F_{2,11} = 13.1$; $P < 0.002$
AME	16.97 (± 1.76) ^a	21.94 (± 1.55) ^{a,b}	27.50 (± 3.80) ^b	$F_{2,12} = 4.18$; $P < 0.05$
NPI	17.2 (± 1.4) ^a	10.2 (± 0.7) ^b	9.2 (± 1.5) ^b	$F_{2,12} = 12.3$; $P < 0.002$
LPI	509.6 (± 52.5) ^a	275.3 (± 26.0) ^b	243.5 (± 26.4) ^b	$F_{10,16} = 3.25$; $P < 0.02$
API	114.9 (± 11.0)	94.0 (± 9.3)	88.7 (± 12.0)	$F_{10,16} = 1.96$; $P < 0.12$
AE	47.6 (± 3.7) ^a	30.7 (± 2.3) ^b	30.4 (± 2.2) ^b	$F_{10,16} = 3.59$; $P < 0.02$
DE	8.3 (± 0.7) ^a	5.3 (± 0.7) ^b	3.8 (± 0.8) ^b	$F_{10,16} = 2.10$; $P < 0.09$

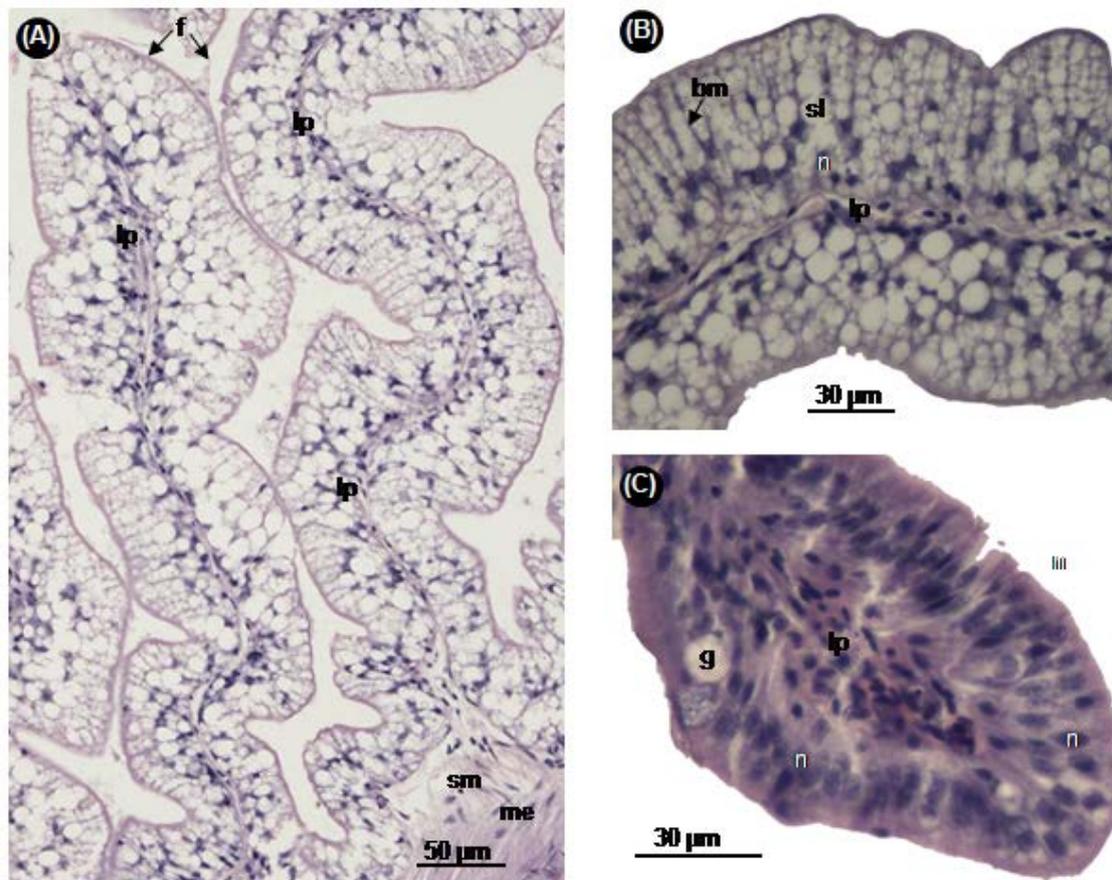


Figura 6. Secciones transversales de la parte proximal del intestino de un espécimen del grupo control (A-B) y de un espécimen del grupo ayuno 7 días (C). Abreviaturas: f = pliegue intestinal; g = célula de mucus; lp = lamina propia; me = capa muscular externa; n = núcleo; bm = membrana basolateral; sm = capa submucosa; sl = gota de lípidos. La escala es dada dentro de cada figura.

4.2. Resultados sobre la flexibilidad digestiva en peces

Estudios realizados en diversas especies de peces, indican que los cambios durante distintos periodos de ayuno, tanto a nivel de la morfometría como de la histología intestinal, concuerdan con los resultados reportados para *H.luetkenii* durante el presente estudio. En este sentido, cabe mencionar que en las especies estudiadas el porcentaje de disminución del largo intestinal varió entre 17.8 y 38.8 % y de la masa entre 40.2 y 62.3 %. A su vez, los análisis histológicos indican que ocurre una reducción el tamaño de los pliegues

intestinales, enterocitos y el área de la mucosa, lo que concuerda con los cambios esperados por la teoría de digestión óptima (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Efecto del ayuno sobre el largo y el peso intestinal para distintas especies de peces. Abreviaturas: PA = periodo de ayuno en días (entre paréntesis se da el periodo de ayuno al cual fueron sometidos los grupo control); RI = reducción intestinal (cantidad remanente al finalizar el experimento expresada como porcentaje del grupo control); (I)L = largo intestinal; (PC+I)L = largo del intestino más los ciegos pilóricos; (I)WM = peso húmedo del intestino; (PC+I)WM = peso húmedo del intestino más los ciegos pilóricos. En todos los casos los datos fueron ajustados por diferencias en el tamaño corporal entre los grupos control y experimentales (i.e., están basados en medias ajustadas por tamaño o en la relación entre el intestino y el tamaño corporal).

Especies	Variable	PA	RI	Fuente
<i>Pomacentrus coelestis</i> (Perciforme)	(I)L	13(1)	81.8	(2)
<i>Cyprinus carpio</i> (Cypriniforme)	(I)L	390(0)	82.2	(5)
<i>Hyphessobrycon luetkenii</i> (Caraciforme)	(I)L	14(2)	64.8	(1)*
<i>Hoplias malabaricus</i> (Caraciforme)	(PC+I)L	240(0)	61.2	(4)
<i>Salmo salar</i> (Salmoniforme)	(PC+I)L	40(0)	80.7	(3)
<i>Cyprinus carpio</i> (Cypriniforme)	(I)WM	390 (0)	55.9	(5)
<i>Pleuronectes platessa</i> (Pleuronectiforme)	(I)WM	32(3)	57.8	(7)
<i>Pterygoplichthys disjunctivus</i> (Siluriforme)	(I)WM	150(0)	56.0	(10)
<i>Salmo gairdneri</i> (Salmoniforme)	(I)WM	91(0)	47.9	(8)
<i>Salmo gairdneri</i> (Salmoniforme)	(I)WM	56(0)	43.2	(9)
<i>Salmo salar</i> (Salmoniforme)	(PC+I)WM	40(0)	55.0	(3)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Salmoniforme)	(PC+I)WM	126(21)	59.8	(13)
<i>Hyphessobrycon luetkenii</i> (Caraciforme)	(PC+I)WM	14(2)	37.7	(1) *

Fuentes: (1) El presente estudio; (2) Hall and Bellwood (1995); (3) Krogdahl and Bakke-McKellep (2005); (4) Rios et al. (2004); (5) Gas and Noailiac-Depeyre (1976); (7) Jobling (1980); (8) Weatherley and Gill (1981); (9) Boge et al. (1981); (10) German et al. (2010); (11) Blier et al. (2007); (12) Bélanger et al. (2002); (13) Simpkins et al. (2003). * Para fines comparativos los datos reportados en esta tabla para *H. luetkenii* son en una base húmeda y no seca.

Tabla 4. Efecto del ayuno sobre distintos parámetros de la histología intestinal para distintas especies de peces. Abreviaturas: PA = periodo de ayuno en días (entre paréntesis se da el periodo de ayuno al cual fueron sometidos los grupo control); LPI = largo de los pliegues intestinales; Área M/S = área de la capa mucosa en relación a la capa serosa; AE = alto de los enterocitos; GL = presencia de gotas lipídicas; Ancho M = ancho de la capa mucosa; Área MV = área de las microvellosidades. Con signos de adición (+) se marcan los cambios que ocurrieron en la dirección predicha por la teoría, pero para los cuales no se pudieron extraer los valores concretos.

Especie	Variable	PA	RI	Fuente
<i>Pomacentrus coelestis</i> (Perciforme)	LPI	13(1)	+	(1)
<i>Acipenser transmontanus</i> (Acipensiforme)	LPI	N/I	+	(2)
<i>Cyprinus carpio</i> (Cypriniforme)	LPI	390(0)	58.5	(3)
<i>Salmo gairdneri</i> (Salmoniforme)	LPI	48(3)	77.9	(4)
<i>Pomacentrus coelestis</i> (Perciforme)	Area M/S	13(1)	70.2	(1)
<i>Pterygoplichthys disjunctivus</i> (Siluriforme)	Area M/S	150(0)	50.0	(5)
<i>Pterygoplichthys disjunctivus</i> (Siluriforme)	Area MV	150(0)	47.9	(5)
<i>Ctenopharyngodon idella</i> (Cypriniforme)	Area MV	21(0)	+	(6)
<i>Cyprinus carpio</i> (Cypriniforme)	Ancho M	390 (0)	66.6	(3)
<i>Pomacentrus coelestis</i> (Perciforme)	AE	13(1)	+	(1)
<i>Acipenser transmontanus</i> (Acipensiforme)	GL	N/I	+	(2)
<i>Ctenopharyngodon idella</i> (Cypriniforme)	GL	21(0)	+	(6)

Fuentes: (1) Hall and Bellwood (1995); (2) Domeneghini et al. (2002); (3) Gas and Noailliac-Depeyre (1976); (4) Mcleod (1978); (5) German et al. (2010); (6) Stroband & Debets (1978)

5. Discusión

Como fue mencionado anteriormente, la evidencia actual para los vertebrados sugiere que existen dos mecanismos principales mediante los cuales se modula el tracto digestivo durante el ayuno: (1) Reducción en el número de enterocitos en el epitelio intestinal en las especies endotermas, y (2) La aparición de un epitelio de transición, en conjunto con una marcada reducción en el tamaño de los enterocitos, en las especies de ectotermos. En este trabajo discutiremos los resultados obtenidos para *H.luetkenii*, junto con información similar para otras especies de peces, dentro de este marco conceptual de la regulación de la función digestiva.

6. 1. Cambios morfométricos durante el ayuno en peces

Encontramos que el pez de la familia characidae *H.luetkenii* responde al ayuno mediante una reducción notable en el tamaño de los órganos del tracto digestivo. Específicamente, se observó que luego de una semana de ayuno la masa seca de los ciegos pilóricos e intestino se redujo hasta un 42.3% de los valores de alimentación, mientras que el largo intestinal se redujo a un 73.9% . Una semana adicional de ayuno produjo sólo cambios menores en ambas variables (32.3% y 64.8 % de los valores de alimentación, respectivamente).

Comparado con datos de otras especies de peces (Tabla 3), la regulación digestiva en *H.luetkenii* parece ser ligeramente mayor, lo que es notable al menos por dos razones. En primer lugar, el período de ayuno durante el experimento fue pequeño en comparación con la mayoría de los estudios en peces. En segundo lugar, nuestra estimación de la regulación es conservativa, ya que el grupo alimentación (i. e. la línea de base para las comparaciones) fue mantenido en condiciones de ayuno durante 48 horas antes del inicio del experimento. Aunque este es un procedimiento relativamente usual para estandarizar las condiciones de alimentación de los animales provenientes del terreno (e.g., Bélanger et al., 2002; Blier et al., 2007), se ha documentado que

durante los dos primeros días de ayuno pueden ocurrir importantes reducciones en el tamaño de los órganos digestivos (Krogdahl and Bakke-McKellep, 2005). Una posible explicación para el valor de regulación digestiva encontrado en *H. leutkenii* podría ser la temperatura a la cual se realizó el experimento (17°C), la cual fue superior a la temperatura registrada en terreno para esa altura del año (10-12°C). Es decir, la alta temperatura relativa en conjunción con la falta de alimento podría haber provocado una respuesta digestiva más marcada de lo esperado simplemente por la falta de alimento.

Por otro lado, cuando se analiza la dinámica temporal de la respuesta digestiva durante el ayuno en peces y se la compara con otras especies de vertebrados ectotermos se observan ciertas diferencias. Específicamente se observa que en los tetrápodos ectotermos para los cuales la respuesta digestiva ha sido estudiada durante periodos relativamente largos de ayuno (i.e., mayor a dos meses) la masa intestinal decae de forma exponencial con el tiempo de ayuno. Por ejemplo, la masa intestinal en pitones (*Python molurus*) a los diez días de ayuno es sólo un 10% mayor que luego de dos meses de ayuno (Starck and Beese, 2001); en caimanes (*Caiman latirostris*) nueve días de ayuno son suficientes para provocar la misma reducción en el grosor de la mucosa intestinal que tres meses de ayuno (Starck et al., 2007). Por el contrario, la reducción en la morfometría intestinal reportada para la mayoría de las especies de peces estudiadas a la fecha indica que una reducción bastante lineal al incrementarse el ayuno, aun para periodos muy largos de tiempo (Fig. 7A-C). Más aun, experimentos de re-alimentación luego de periodos de ayuno indican que el incremento en la masa intestinal también sigue una función lineal (Blier et al., 2007).

Todos estos resultados sugieren que el cambio temporal en el tamaño del intestino con el tiempo de ayuno en los peces parece ser más similar al observado en animales endotérmicos (Figura 7D), en los cuales los ajustes están basados en la tasa de división celular, que a otros tetrápodos ectotérmicos.

6. 2. Cambios histológicos durante el ayuno en peces

Los aspectos histológicos de la porción proximal del intestino de *H.luetkenii* son similares a aquellos reportados para otras especies de peces (e.g., Hall and Bellwood, 1995; Baeverfjord and Krogdahl, 1996). La zona muscular del intestino está compuesta por dos capas, la capa longitudinal externa y la capa circular interna; la capa submucosa es un tejido conectivo de soporte, que se extiende por debajo los pliegues intestinales formando la lamina propia; finalmente, la capa mucosa está compuesta principalmente por dos tipos de células: células epiteliales columnares, que cumplen con la función de absorción, y las células caliciformes secretoras de mucus. A diferencia de lo reportado para otras especies de peces, (e.g., Hellberg and Bjerkas, 2005) no observamos pliegues ramificados intrincados (rugae), ni estructuras similares a criptas.

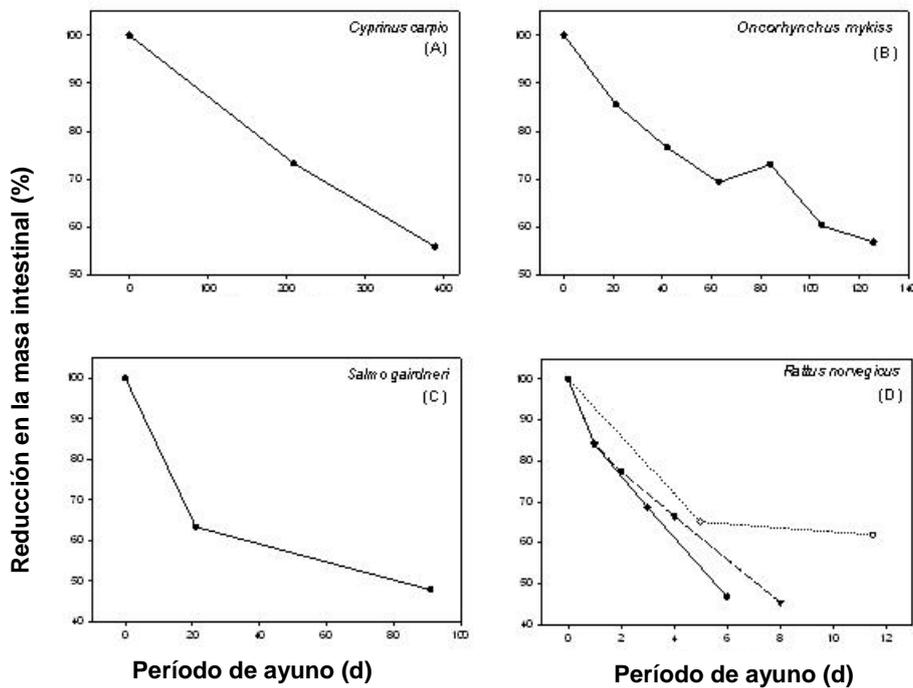


Figura 7. Reducción en la masa intestinal en función del periodo de ayuno para tres especies de peces (A-C) y para una especie de mamífero (D). Los datos para los peces fueron tomados de Gas and Noailliac-Depeyre (1976), Simpkins et al. (2003), y Weatherley and Gill (1981), mientras que los datos para la rata fueron tomados de Ju & Nasset (1959; triangulos blancos), Dunel-Erb et al. (2001; círculos blancos), y MacManus & Isselbacher (1970), Burrin et al. (1988) and Steiner et al. (1968; círculos negros).

Al igual que ocurrió con las variables morfométricas, no se encontraron diferencias significativas a nivel histológico entre los dos grupos de ayuno. En ambos casos ocurrió una notable reducción en el diámetro de la zona proximal del intestino, y la apariencia de la mucosa epitelial paso de ser columnar a pseudoestratificada. Además, en ambos casos la altura de las vellosidades se redujo a la mitad de los valores del grupo control y el tamaño de los enterocitos se redujo notablemente, lo que se correlacionó con la desaparición de las gotas lipídicas. Todos estos cambios han sido documentados para otras especies de peces (Tabla 4), así como, para otros vertebrados ectotermos (ver introducción). De hecho, los peces de los grupos de ayuno mostraron otras características histológicas que se corresponden bien con lo descrito previamente para otras especies de vertebrados ectotermos en ayuno: (1) Un aumento en el número de células secretoras de mucus fue evidente en todos los cortes histológicos (Baeverfjord and Krogdahl, 1996; Gas and Noailliac-Depeyre, 1976); (2) Se observó un ligero aumento del grosor de la capa muscular externa (McLeod, 1978; Cramp et al., 2005; Naya et al., 2009). (3) Ocurrió una Infiltración moderada de células mono nucleares (e.g., linfocitos, leucocitos y macrófagos) en la capa submucosa y en la lamina propia (Gas and Noailliac-Depeyre, 1976; Baeverfjord and Krogdahl, 1996; Domeneghini et al., 2002; Cramp et al., 2005). En cuanto a este último cambio, el aumento en el número de células inflamatorias durante el ayuno ha sido típicamente relacionada con un aumento en la función defensiva (e.g., Baeverfjord and Krogdahl, 1996; Domeneghini et al., 2002). Sin embargo, un estudio reciente en el pez lobo común (*Anarhichas lupus*, *Perciforme*) sugiere que el aumento en la cantidad de macrófagos durante el ayuno, podría relacionarse con la apoptosis programada (Hellberg and Bjerkas, 2005), como ha sido previamente planteado para aves y mamíferos (Hall et al., 1994; Mayhew et al., 1999). Esta observación sugiere, a su vez, que la tasa de renovación de los enterocitos en peces podría ser ajustada a los

cambios en las demandas energéticas de los organismos, durante los ciclos de ayuno y alimentación.

6.3. Información sobre las tasas de recambio de los enterocitos en peces

Aunque tanto los cambios morfométricos como los cambios histológicos observados durante el ayuno en peces concuerdan con el modelo propuesto para los tetrápodos ectotermos, la dinámica temporal de la respuesta (nivel morfométrico) y el aumento de macrófagos en la lamina propia durante el ayuno (nivel histológico) hacen pensar que cambios en la tasa de recambio de los enterocitos podrían ser parte de la respuesta digestiva observada. En este sentido, al revisar la evidencia existente para peces sobre la tasa de recambio de los enterocitos se observa que: (1) En algunas especies la tasa de recambio celular es relativamente breve y –aunque más larga que aquellas observadas para mamíferos (e.g., ratones y ratas: 2-3 días, hombres: 3-6 días, Williamson and Chir, 1978; corderos: 2-6 días, Attaix and Meslin, 1991)– no son diferentes de las reportadas para algunas especies de aves (e.g., codornices: 9-17 días, estorninos: 8-10 días; Starck, 1996). En este sentido, el tiempo de renovación ha sido estimado en 6-9 días en *Carassius auratus* (Vickers, 1962), 8 días en *Cyprinus carpio* (Gas and Noaillac-Depeyre, 1974), 10-15 días en *Ctenopharyngodon idella* (Stroband and Debets, 1978), todos representantes del orden de los cypriniformes, y en 9-14 días para la especie de lamprea *Petromyzon marinus* (Petromyzontiforme) (Youson and Langille, 1981). (2) Al menos para una especie de pez, *Pseudopleuronectes americanus* (Pleuronectiforme), la tasa de recambio celular es mayor durante los periodos de alimentación que en un periodo de ayuno de 7 días (Trier and Moxey, 1980). Por lo tanto, la evidencia actual no excluye que la regulación en el tamaño del tracto digestivo, pueda darse, en cierta medida, mediante la modulación de la tasa de recambio celular de acuerdo a la cantidad de nutrientes

presentes en el lumen intestinal (i.e., el mecanismo típico de regulación propuesto para especies endotermas).

6.4. Conclusiones

La flexibilidad digestiva es un fenómeno generalizado en los animales, y la alta congruencia entre los datos empíricos y los modelos teóricos de digestión óptima apoyan fuertemente la idea de que la misma ha evolucionado por selección natural (Starck, 1999b; McWilliams and Karasov, 2001; Karasov and McWilliams, 2005; Starck, 2005; Naya et al., 2008; Karasov et al., 2011). Sin embargo, los mecanismos detallados y la historia evolutiva específica detrás de esta asombrosa flexibilidad, se encuentran lejos de ser dilucidados en su totalidad.

Si bien se acepta la existencia de dos estrategias “clásicas” de la regulación digestiva (i.e., endotermos vs. ectotermos), ciertas evidencias recientes sugieren que las mismas podrían representar extremos sobre una gama continua de variación. En este sentido, estudios recientes han determinado que: (1) La retracción en los capilares linfáticos y la contracción de las miofibrillas en la lamina propia pueden tener un rol importante en la atrofia de las vellosidades intestinales en especies endotérmicas (Hobold et al., 2007); (2) Al igual que lo arriba descrito para peces, las tasas de recambio de los enterocitos en algunas especies de vertebrados tetrápodos ectotérmicos son similares a las observadas para ciertas especies de aves (McAvoy and Dixon, 1977; Kiss et al., 1986; Starck, 1996). (3) La reducción durante los periodos de ayuno a nivel de las microvellosidades intestinales es importante en especies ectotérmicas que se alimentan infrecuentemente, pero no tanto en aquellas especies ectotérmicas que se alimentan de forma frecuente en la naturaleza (Secor et al. 2000; Secor, 2005a; Secor, 2005b; Christel et al. 2007; Cox and Secor, 2008). Por tanto, parecería ser que la importancia relativa de cada uno de los mecanismos específicos que han sido asociados en términos generales a las dos estrategias “clásicas” de

regulación podría variar de manera especie específica (o al menos taxa específica). En línea con esto, los resultados aquí obtenidos –a partir del experimento realizado en *H.luetkenii* y de la revisión de los datos publicados para otras especies de peces– sugieren que la regulación tanto a nivel de las tasas de recambio celular como a nivel de la configuración intestinal podría encontrarse en los peces y por tanto podría representar la condición basal a todos los vertebrados tetrápodos.

Agradecimientos

Daniel por la ayuda y paciencia durante casi un año; Nico y el Pajarito, porque si no fuera por ellos hubiéramos tenido que hacer todo con un solo pez; Caro por los comentarios sobre el paper y Ale porque además de hacer valiosos aportes, siempre estuvo para dar una mano; Lu, Lula, Clau y Betta que en los momentos críticos supieron aconsejarme de la mejor manera; al piso 6 en general, que hizo que la tarea fuera mucho más amena, en particular a Matías y Sabrina; Franco y Mapi por las correcciones, que enriquecieron mucho la tesis y al Mapi (de parte mía y de los peces) gracias por la anestesia! Y especialmente a mi familia y amigos por todo en general!

7. Bibliografía

Attaix D, Meslin JC. 1991. Changes in small intestinal mucosa morphology and cell renewal in suckling, prolonged-suckling and weaned lambs. *Am J Physiol* 261:R811-R818.

Baeverfjord G, Krogdahl A. 1996. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *J Fish Dis* 19:375-387.

Bancroft JD, Stevens A. 1996. *Theory and practice of histological techniques*. Churchill Livingstone, New York.

Bélanger F, Blier PU, Dutil JD. 2002. Digestive capacity and compensatory growth in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Physiol Biochem* 26:121-128.

Blier PU, Dutil JD, Lemieux H, Belanger F, Bitetera L. 2007. Phenotypic flexibility of digestive system in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp Biochem Physiol* 146A:174-179.

Boge G, Rigal A, Peres G. 1981. A study of in vivo glycine absorption by fed and fasted rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Exp. Biol.* 91, 285-290.

- Bradshaw AD. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants." *Advances in Genetics* 13: 115-155.
- Burrin DG, Britton RA, Ferrell CL. 1988. Visceral organ size and hepatocyte metabolic activity in fed and fasted rats. *J Nut* 118:1547-1552.
- Carey HV. 1990. Seasonal change in mucosal structure and function in ground squirrel intestine. *Am J Physiol* 28:R385-R392.
- Carey HV. 2005. Gastrointestinal response to fasting in mammals: lessons from hibernators. In: Starck JM, Wang T, editors. *Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates*. Enfield: Science Publishers. p 229-254.
- Christel CM, DeNardo DF, Secor SM. 2007. Metabolic and digestive response to food ingestion in a binge-feeding lizard, the Gila monster (*Heloderma suspectum*). *J Exp Biol* 210:430-439.
- Cox CL, Secor SM. 2008. Matched regulation of gastrointestinal performance in the Burmese python, *Python molurus*. *J Exp Biol* 211:131-140.
- Cramp RL, Franklin CE, Meyer EA. 2005. The impact of prolonged fasting during aestivation on the structure of the small intestine in the green-striped burrowing frog, *Cyclorana alboguttata*. *Acta Zool* 86:3-24.
- Domenechini C, Radaelli G, Bosi G, Arrighi S, Di Giancamillo A, Pazzaglia M, Mascarello F. 2002. Morphological and histochemical differences in the structure of the alimentary canal in feeding and runt (feed deprived) white sturgeons (*Acipenser transmontanus*). *J Appl Ichthyol* 18:41-346.
- Dunel-Erb S, Chevalier S, Laurent P, Bach A, Decrock F, Le Maho Y. 2001. Restoration of the jejunal mucosa in rats refed after prolonged fasting. *Comp Biochem Physiol* 129A:33-947.
- Gas N, Noailliac-Depeyre J. 1974. Renouvellement de l'épithélium intestinal de la carpe (*Cyprinus carpio* L.). Influence de la saison. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 279:1085-1088.
- Gas N, Noailliac-Depeyre J. 1976. Studies on intestinal epithelium involution during prolonged fasting. *J Ultrastruct Res* 56:37-151.
- German DP, Neuberger DT, Callahan MN, Lizardo NR, Evans DH. 2010. Feast to famine: the effects of food quality and quantity on the gut structure and function of a detritivorous catfish (Teleostei: Loricariidae). *Comp Biochem Physiol* 155A:281-293.
- Gianoli E. 2004. Plasticidad fenotípica adaptativa en plantas. *Fisiología Ecológica en plantas. Mecanismos y Respuestas a Estrés en los ecosistemas*. 13-25
- Habold C, Reichardt F, Foltzer-Jourdainne C, Lignot JH. 2007. Morphological changes of the rat intestinal lining in relation to body stores depletion during fasting and after refeeding. *Pflugers Archiv – Eur J Physiol* 455:323-332.
- Hall KC, Bellwood DR. 1995. Histological effects of cyanide, stress and starvation on the intestinal mucosa of *Pomacentrus coelestis*, a marine aquarium fish species. *J Fish Biol* 47:38-454.

- Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. 1994. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 107:569-3577.
- Hammond KA, Konarzewski M, Torres R, Diamond JM. 1994. Metabolic ceiling under a combination of peak energy demands. *Physiol Zool* 67:479-1506.
- Hellberg J, Bjerkas I. 2005. Intestinal epithelium in *Anarhichas lupus* L., with emphasis on cell renewal. *J Fish Biol* 66:342-1356.
- Hume ID, Beiglbock C, Ruf T, Frey-Roos F, Bruns U, Arnold W. 2002. Seasonal changes in morphology and function of the gastrointestinal tract of free-living alpine marmots (*Marmota marmota*). *J Comp Physiol* 172B:97-207.
- Jobling M. 1980. Effects of starvation on proximate chemical composition and energy utilization of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J Fish Biol* 17:325-334
- Ju, J S, Nasset ES. 1959. Changes in total nitrogen content of some abdominal viscera in fasting and realimentation. *J. Nutr.* 68, 633-645.
- Karasov WH, Diamond JM. 1983. Adaptive regulation of sugar and amino acid transport by vertebrate intestine. *Am J Physiol* 8:443-G462.
- Karasov WH, McWilliams SR. 2005. Digestive constraints in mammalian and avian ecology. In: Starck JM, Wang T, editors. *Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates*. Enfield: Science Publishers. p 87-112.
- Karasov WH, Martínez del Rio C, Caviedes-Vidal E. 2011. Ecological physiology of diet and digestive systems. *Ann Rev Physiol* 73:69-93.
- Kiss R, de Launoit Y, Lenglet G, Danguy A. 1986. Evaluation of the cell cycle kinetic parameters in the mucosal epithelium of the amphibian digestive tract. *Arch Biol* 97:237-257.
- Kristan DM, Hammond KA. 2001. Parasite infection and caloric restriction induce physiological and morphological plasticity. *Am J Physiol* 281:502-R510.
- Krogdahl A, Bakke-McKellep AM. 2005. Fasting and refeeding cause rapid changes in intestinal tissue mass and digestive enzyme capacities of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comp Biochem Physiol* 141A:50-460.
- Krol E, Murphy M, Speakman JR. 2007. Limits to sustained energy intake. X. Effects of fur removal on reproductive performance in laboratory mice. *J Exp Biol* 210:233-4243.
- Lignot JH, Helmstetter C, Secor SM. 2005. Postprandial morphological response of the intestinal epithelium of the Burmese python (*Python molurus*). *Comp Biochem Physiol* 141A:80-291.
- Liu QS, Wang DH. 2007. Effects of diet quality on phenotypic flexibility of organ size and digestive function in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J Comp Physiol* 175B:1-36.
- Loeb SC, Schwab RG, Demment MW. 1991. Responses of pocket gophers (*Thomomys bottae*) to changes in diet quality. *Oecologia* 86:42-551.
- McLeod MG. 1978. Effects of salinity and starvation on the alimentary canal anatomy of the rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 12, 71-79.

- McManus JPA, Isselbacher K J 1970. Effect of fasting versus feeding on the rat small intestine. *Gastroenterology* 59, 214-221
- Mayhew TM, Myklebust R, Whybrow A, Jenkins R. 1999. Epithelial integrity, cell death and cell loss in mammalian small intestine. *Histol Histopathol* 14:57-267.
- McAvoy JW, Dixon KE. 1977. Cell proliferation and renewal in the small intestinal epithelium of metamorphosing and adult *Xenopus laevis*. *J Exp Zool* 202:129-138.
- McLeod MG. 1978. Effects of salinity and starvation on the alimentary canal anatomy of the rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Biol* 12:71-79.
- McWilliams SR, Karasov WH. 2001. Phenotypic flexibility in digestive system structure and function in migratory birds and its ecological significance. *Comp Biochem Physiol* 128A:579-593.
- Miquelarena AM, López HL. 2006. *Hyphessobrycon togoi*, a new species from the La Plata basin (Teleostei: Characidae) and comments about the distribution of the genus in Argentina. *Rev Suisse Zool* 113:817-828.
- Naya DE. 2008. Gut Size Flexibility in Rodents: what we know, and don't know, after a century of research. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 810: 615-628.
- Naya DE, Bozinovic F. 2006. The role of ecological interactions on the physiological flexibility of lizards. *Funct Ecol* 20:601-608.
- Naya DE, Karasov WH, Bozinovic F. 2007. Phenotypic plasticity in laboratory mice and rats: a meta-analysis of current ideas on gut size flexibility. *Evol Ecol Res* 9:1363-1374.
- Naya DE, Bozinovic F, Karasov WH. 2008. Latitudinal trends in physiological flexibility: testing the climatic variability hypothesis with data on the intestinal length of rodents. *Am Nat* 172:E122-E134.
- Naya DE, Veloso C, Sabat P, Bozinovic F. 2009. The effect of long- and short-term fasting on phenotypic flexibility and integration in the Andean toad, *Bufo spinulosus*. *J Exp Biol* 212:2167-2175.
- Pennisi E. 2005. The dynamic gut. *Science* 307:1896-1899.
- Piersma T, Drent J. 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends Ecol Evol* 18: 228-233.
- Piersma T, Lindstrom A. 1997. Rapid reversible changes in organ size as a component of adaptative behaviour. *Trends Ecol Evol* 12:134-138.
- Pigliucci M. 2001. *Phenotypic Plasticity. Beyond Nature and Nurture*. John Hopkins University Press. Baltimore.
- Rios FS, Kalinin A L, Fernandes MN, Rantin FT. 2004. Changes in gut gross morphology of traíra, *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) during long-term starvation and after refeeding. *Brazilian J. Biol.* 64, 683-689
- Secor SM. 2001. Regulation of digestive performance: a proposed adaptive response. *Comp. Biochem. Physiol.* 128A, 565-577.

- Secor SM. 2005a. Evolutionary and cellular mechanism regulating intestinal performance of amphibians and reptiles. *Integ Comp Biol* 45:282-294.
- Secor SM. 2005b. Physiological responses to feeding, fasting and estivation for anurans. *J Exp Biol* 208:2595-2608.
- Secor SM. 2008. Digestive physiology of the Burmese python: broad regulation of integrated performance. *J Exp Biol* 211:3767-3774.
- Secor SM, Diamond JM. 1998. A vertebrate model of extreme physiological regulation. *Nature* 395:659-662.
- Secor SM, Whang EE, Lane JS, Ashley SW, Diamond JM. 2000. Luminal and systemic signals trigger intestinal adaptation in the juvenile python. *Am J Physiol* 279:G1177-G1187.
- Simpkins DG, Hubert WA, Martínez del Rio C, Rule DC. 2003. Physiological responses of juvenile rainbow trout to fasting and swimming activity: effects on body composition and condition indices. *Trans. Am. Fish. Soc.* 132, 576-589.
- Soneira PA, Ruíz Díaz FJ, Bechara JA, Alimirón A, Casciotta JR. 2006. Hábitos tróficos de las especies del genero *Hyphessobrycon* (Characidae) en los Esteros del Iberá. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.* 4pp.
- Speakman JR, Krol E. 2005. Limits to sustained energy intake IX: a review of hypotheses. *J Comp Physiol* 175B:375-394.
- Starck JM. 1996. Intestinal growth in altricial european starling (*Sturnus vulgaris*) and precocial japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Acta Anat* 156:289-306.
- Starck JM. 1999a. Phenotypic flexibility of the avian gizzard: rapid, reversible and repeated changes of organ size in response to changes in dietary fibre content. *J Exp Biol* 202:3171-3179.
- Starck JM. 1999b. Structural flexibility of the gastro-intestinal tract of vertebrates - Implications for evolutionary morphology. *Zool Anz* 238:87-101.
- Starck JM. 2005. Structural flexibility of the digestive system of tetrapods – Patterns and processes at the cellular and tissue level. In: Starck JM, Wang T, editors. *Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates.* Enfield: Science Publishers. p 175-200.
- Starck JM, Beese K. 2001. Structural flexibility of the intestine of burmese python in response to feeding. *J Exp Biol* 204:325-335.
- Starck JM, Wimmer C. 2005. Patterns of blood flow during the postprandial response in ball pythons, *Python regius*. *J Exp Biol* 208:881-889.
- Starck JM, Cruz-Neto AP, Abe AS. 2007. Physiological and morphological responses to feeding in broad-nosed caiman (*Caiman latirostris*). *J Exp Biol* 210:2033-2045.
- Steiner M, Bourges HR, Freedman LS, Gray SJ. 1968. Effect of starvation on the tissue composition of the small intestine in the rat. *Am. J. Physiol.* 215, 75-77.

- Stroband HWJ, Debets FMH. 1978. The ultrastructure and renewal of the intestinal epithelium of the juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Cell Tissue Res* 187:181-200.
- Tolosa EM, Lam M, Diamond JM. 1991. Nutrient extraction by cold-exposed mice: a test of digestive safety margins. *Am J Physiol* 261:G608-G620.
- Trier JS, Moxey PC. 1980. Epithelial cell proliferation in the intestine of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Cell Tissue Res* 206:379-385.
- Vickers T. 1962. A study of the intestinal epithelium of the goldfish *Carassius auratus*: its normal structure, the dynamics of cell replacement, and the changes induced by salts of cobal and manganese. *Quart J Microsc Sci* 130:93-110.
- Weatherley AH, Gill HS. 1981. Recovery growth following periods of restricted rations and starvation in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 18, 195-208.
- Whitman W, Agrawal AA. 2009. What is phenotypic plasticity and why is it important? . In: Whitman W, Ananthakrishnan TN, editors. Phenotypic plasticity of insects. Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates. Enfield: Science Publishers. p 1-64.
- Williamson RCN, Chir M. 1978. Intestinal Adaptation – Structural, Functional and Cytokinetic Changes. *N Engl J Med* 298:1393-1402.
- Young Owl M, Batzli GO. 1998. The integrated processing response of voles to fibre content of natural diets. *Funct Ecol* 12:4-13.
- Youson JH, Langille RM. 1981. Proliferation and renewal of the epithelium in the instestine of young-adult anadromous sea lampreys, *Petromyzon marinus*. *Can J Zool* 59:2341-2349.