

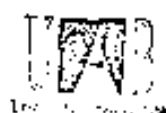
**FUNCION DE LA CCK Y DE LOS LIPIDOS EN LA
REGULACION DE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL
EN EL POLLO**

VICENTE MARTINEZ PEREA

UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE VETERINARIA

**FUNCION DE LA CCK Y DE LOS LIPIDOS EN LA
REGULACION DE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL
EN EL POLLO**



Facultat de Veterinària

Data: 29 MAR 93

Emplecat: 59

Exemplar: 1

Memoria presentada por Vicente Martínez Perea
para optar al grado de Doctor en Veterinaria
Bellaterra - Barcelona, Marzo de 1993.



EDUARDO GOÑALONS SINTES Catedrático de universidad del Departamento de Biología Celular y Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona.

PATROCINIO VERGARA ESTERAS Profesora Titular de Universidad del Departamento de Biología Celular y Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada "FUNCION DE LA CCK Y DE LOS LIPIDOS EN LA REGULACION DE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL EN EL POLLO" presentada por **Vicente Martínez Perea** para optar al grado de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo su dirección en la Unidad de Fisiología de la Facultad de Veterinaria y, considerándola concluida, autorizan su presentación para que sea evaluada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman la presente en Bellaterra a 26 de Marzo de 1993.

Dr. E. Goñalons

Dra. P. Vergara

"En cada una de las especies de animales encontraréis tres clases de órganos de la alimentación. Unos han sido creados por la Naturaleza con la finalidad de recibir y elaborar el alimento y distribuirlo por todo el cuerpo, otros están destinados a recibir los productos residuales y, por último, están los órganos cuya misión es la excreción de dichos productos... El estómago recibe el alimento y comienza la elaboración que terminará el hígado, desde donde las venas se encargan de distribuirlo por todo el cuerpo. Previa a esta distribución, el alimento es purificado mediante órganos especiales que le despojan, unos de los residuos ténues y ligeros (finalidad de la vesícula biliar), otros de los residuos terrosos y pesados (el bazo y la parte inferior de los intestinos que preceden al recto) y, en último término, de los productos acuosos y serosos (los órganos urinarios). Para evitar la expulsión involuntaria e intempestiva de los excrementos, la Naturaleza ha dispuesto músculos en las extremidades de los conductos o reservorios por donde deben salir dichos excrementos. De ahí que esos músculos formen parte de los órganos de la alimentación... Estas tres clases de órganos cuya finalidad es la nutrición son comunes a todos los animales".

Galeno, "Sobre los procedimientos anatómicos".

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo y a la ayuda de todos los componentes de la Unidad de Fisiología de la Facultat de Veterinària; a todos ellos mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. E. Goñalons y a la Dra. P. Vergara, por su ayuda, sus consejos y por todo el tiempo que pasamos juntos dedicados a un fin común; sin su experiencia este trabajo no hubiese sido posible.

Mi más sincera gratitud a Marcel Jiménez por su ayuda y apoyo y a Jesús Puertas por su inestimable ayuda técnica.

Al Dr. Travis E. Solomon, a todos los miembros de su laboratorio en Kansas City y a su familia por su inestimable ayuda y su interés en la búsqueda de algo aparentemente inaccesible, la CCK en las aves.

Al Dr. G. J. Dockray, que me introdujo en el mundo práctico de las hormonas gastrointestinales. A él, le agradezco que me proporcionase los anticuerpos que se han empleado en parte de este trabajo.

A mis padres, por su continuo apoyo.

Estos años de trabajo fueron posibles gracias a la financiación personal del Ministerio de Educación y Ciencia, a través de una beca de Formación de Personal Investigador y a la financiación de la DGICYT, a través del proyecto PB89-0307.

A todos, muchas gracias.

INDICE

I - INTRODUCCION	1
1 - BIOQUIMICA DE LA COLECISTOQUININA	3
1.1 - Química de la familia gastrina-CCK y péptidos afines	4
1.1.1 - CCK y gastrina	5
1.1.2 - CCK y gastrina de pollo	7
1.1.3 - CCK y ceruleína/filoceruleína	8
1.1.4 - CCK y cionina	9
1.1.5 - CCK y otros péptidos de estructura química afín	10
1.2 - El gen de la CCK	11
1.3 - Heterogeneidad molecular de la CCK	12
1.4 - Localización y distribución tisular de la CCK	14
1.4.1 - Localización celular de la CCK	14
1.4.1.1 - CCK endocrina	14
1.4.1.2 - CCK nerviosa	15
1.4.1.3 - CCK en otras localizaciones	17
1.4.2 - CCK en plasma	17
1.4.2.1 - Liberación de CCK	19
1.4.2.2 - Control nervioso de la liberación de CCK	20
1.4.2.3 - Eliminación de la CCK plasmática	21
1.5 - Receptores de CCK: clasificación y caracterización	21
1.5.1 - Receptores CCK-A	22
1.5.2 - Receptores CCK-B	23
1.5.3 - Relación entre receptores de CCK y de gastrina	23
1.5.4 - Antagonistas de la CCK	24
1.5.5 - Potencia relativa de los antagonistas de la CCK	28
2 - EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA CCK	30
2.1 - Secreción gastrointestinal	30
2.2 - Efectos tróficos	31
2.3 - Secreción hepática y biliar	32

2.4 - Secreción pancreática	32
2.5 - Apetito y saciedad	33
2.6 - Otros efectos biológicos de la CCK	34
2.6.1 - Acción sobre el flujo sanguíneo digestivo	34
2.6.2 - Efectos sobre el sistema endocrino	34
2.6.3 - Acciones centrales	35
3 - MOTILIDAD GASTROINTESTINAL: PAPEL DE LA CCK EN SU CONTROL	36
3.1 - Motilidad del esófago	36
3.2 - Motilidad gástrica	36
3.2.1 - Fundus y cuerpo gástrico	37
3.2.2 - Antro pilórico	37
3.2.3 - Esfínter pilórico	39
3.2.4 - Vaciamiento gástrico	40
3.3 - Motilidad del intestino delgado	44
3.2.1 - Motilidad postprandial	44
3.2.2 - Complejos mioeléctricos migratorios (MMC)	45
3.3.3 - Otros patrones de motilidad	49
3.4 - Motilidad del colon	49
3.5 - Motilidad del sistema biliar	50
4 - ESTUDIO DE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL: ELECTROMIOGRAFIA	51
4.1 - Métodos de captación de la señal eléctrica	51
4.1.1 - Captadores no invasivos	52
4.1.2 - Captadores invasivos	52
4.2 - Amplificación y filtrado de la señal electromiográfica	53
4.3 - Métodos de almacenamiento de la señal electromiográfica	54
4.3.1 - Registros sobre papel	54
4.3.2 - Registros sobre banda magnética	55
4.3.3 - Digitalización de la señal electromiográfica	55
4.4 - Tratamiento de la señal electromiográfica	56
4.4.1 - Análisis espectral	57
4.4.2 - Análisis temporal	57
4.4.3 - Integración de la señal electromiográfica	58
5 - MOTILIDAD GASTROINTESTINAL EN LAS AVES	60
5.1 - Anatomía funcional del tracto digestivo de las aves	60
5.2 - Motilidad del tracto digestivo de las aves	62
5.2.1 - Deglución y actividad motora del esófago	62
5.2.2 - Actividad motora gastroduodenal	64

5.2.3 - Actividad motora del yeyuno y del ileon	68
5.2.4 - Actividad motora cecal	70
5.2.5 - Actividad motora cólica	71
6 - LA CCK EN LAS AVES	72
II - OBJETIVOS	77
III - MATERIAL, METODOS y RESULTADOS	80
1 - ESTUDIO MORFOLOGICO DE LA DISTRIBUCION DE LOS PEPTIDOS GASTRINA Y CCK EN EL TRACTO DIGESTIVO DE LAS AVES	81
1.1 - Objetivos	81
1.2 - Material y métodos	82
1.2.1 - Obtención y procesado de las muestras	82
1.2.2 - Tinción de las muestras	83
1.2.3 - Controles y bloqueo de los anticuerpos	83
1.2.4 - Recuento de células	84
1.2.5 - Reactivos y anticuerpos	84
1.3 - Resultados	86
1.3.1 - Características de la inmunorreactividad del antro pilórico	86
1.3.2 - Características de la inmunorreactividad duodenal	88
1.3.3 - Características de la inmunorreactividad del intestino delgado	89
1.3.4 - Recuento de células	89
2 - ACCIONES DE LOS PEPTIDOS DE LA FAMILIA GASTRINA-CCK SOBRE LA COORDINACION Y LA ACTIVIDAD MOTORA GASTRODUODENAL	95
2.1 - Objetivos	95
2.2 - Material y métodos	96
2.2.1 - Animales de experimentación: estabulación y mantenimiento	96
2.2.2 - Preparación de los animales de experimentación	97
2.2.2.1 - Implantación quirúrgica de los electrodos	97
2.2.2.2 - Cateterización	99
2.2.3 - Registros electromiográficos y análisis	100
2.2.4 - Tratamiento de los resultados	101
2.2.4.1 - Resultados de la integración	101
2.2.4.2 - Frecuencia del ciclo gástrico	101
2.2.4.3 - Curvas dosis-efecto	102
2.2.5 - Sustancias empleadas	102

2.2.6 - Protocolo experimental	103
2.3 - Resultados	104
2.3.1 - Efectos de los péptidos gastrina-CCK sobre la actividad gástrica	104
2.3.2 - Efectos de los péptidos gastrina-CCK sobre la actividad duodenal	110
2.3.3 - Efecto de los péptidos gastrina-CCK sobre la coordinación gastroduodenal	111
2.3.4 - Efecto de los antagonistas de la CCK	113
3 - MECANISMO DE ACCION DE LA CCK SOBRE LA MOTILIDAD GASTRODUODENAL	115
3.1 - Objetivos	115
3.2 - Material y métodos	116
3.2.1 - Animales de experimentación: estabulación y mantenimiento	116
3.2.2 - Preparación de los animales de experimentación	116
3.2.2.1 - Implantación quirúrgica de los electrodos	116
3.2.2.2 - Cateterización	116
3.2.2.3 - Vagotomía	116
3.2.3 - Registros electromiográficos y análisis	117
3.2.4 - Tratamiento de los resultados	117
3.2.4.1 - Resultados de la integración	117
3.2.4.2 - Frecuencia del ciclo gástrico	117
3.2.5 - Substancias empleadas	117
3.2.6 - Protocolo experimental	118
3.3 - Resultados	119
3.3.1 - Efectos de la CCK-8 sobre la motilidad gastroduodenal	119
3.3.2 - Efectos de la CCK-8 sobre la motilidad gastroduodenal en animales vagotomizados	119
3.3.3 - Efectos del hexametonio sobre las acciones de la CCK-8 en la motilidad gastroduodenal	123
3.3.4 - Efectos de los antagonistas opioides sobre las acciones de la CCK-8 en la motilidad gastroduodenal	125
3.3.5 - Efectos de los antagonistas adrenérgicos sobre las acciones de la CCK-8 en la motilidad gastroduodenal	125
3.3.6 - Efectos de la atropina sobre las acciones de la CCK-8 en la motilidad gastroduodenal	125
3.3.7 - Efectos de la L-Arginina y del L-NAME sobre las acciones de la CCK-8 en la motilidad gastroduodenal	127
3.3.8 - Acciones del nitroprusiato sódico sobre la motilidad gastroduodenal	131

4 - ACCIONES DE LOS PEPTIDOS DE LA FAMILIA GASTRINA-CCK SOBRE LA ACTIVIDAD MOTORA INTESTINAL	133
4.1 - Objetivos	133
4.2 - Material y métodos	134
4.2.1 - Animales de experimentación: estabulación y mantenimiento	134
4.2.2 - Preparación de los animales de experimentación	134
4.2.2.1 - Implantación quirúrgica de los electrodos	134
4.2.2.2 - Cateterización	134
4.2.3 - Registros electromiográficos y análisis	135
4.2.4 - Tratamiento de los resultados	135
4.2.5 - Sustancias empleadas	135
4.2.6 - Protocolo experimental	135
4.3 - Resultados	137
4.3.1 - Motilidad intestinal en ayunas y en período postprandial	137
4.3.2 - Efectos de la CCK-8 sobre la motilidad intestinal en ayunas	140
4.3.3 - Efectos de la CCK-8 sobre la motilidad intestinal en estado postprandial	144
4.3.4 - Efectos de la cG sobre la motilidad intestinal	145
5 - EFECTOS DE LOS LIPIDOS SOBRE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL	153
5.1 - Objetivos	153
5.2 - Material y métodos	153
5.2.1 - Animales de experimentación: estabulación y mantenimiento	153
5.2.2 - Preparación de los animales de experimentación	154
5.2.2.1 - Implantación quirúrgica de los electrodos	154
5.2.2.2 - Cateterización	154
5.2.3 - Registros electromiográficos y análisis	155
5.2.4 - Tratamiento de los resultados	156
5.2.4.1 - Resultados de la implantación	156
5.2.4.2 - Valoración cualitativa de la motilidad gastroduodenal	156
5.2.4.3 - Análisis de la motilidad intestinal	156
5.2.5 - Sustancias empleadas	157
5.2.6 - Protocolo experimental	157
5.3 - Resultados	158
5.3.1 - Efectos de la perfusión esofágica de lípidos sobre la motilidad gastroduodenal	158
5.3.2 - Efectos de la perfusión ileal de lípidos sobre la motilidad gastroduodenal	160
5.3.3 - Efectos del ácido oléico sobre la motilidad intestinal	170

IV - DISCUSION	173
1 - ESTUDIO MORFOLOGICO DE LA DISTRIBUCION DE LOS PEPTIDOS GASTRINA-CCK EN EL TRACTO DIGESTIVO DE LAS AVES	174
2 - EFECTOS DE LA GASTRINA DE POLLO Y DE LA CCK SOBRE LA MOTILIDAD Y LA COORDINACION GASTRODUODENAL	181
3 - MECANISMO DE ACCION DE LA CCK SOBRE LA COORDINACION GASTRODUODENAL	187
4 - ACCIONES DE LOS PEPTIDOS DE LA FAMILIA GASTRINA-CCK SOBRE LA ACTIVIDAD MOTORA INTESTINAL	195
5 - EFECTO DE LOS LIPIDOS SOBRE LA MOTILIDAD GASTRODUODENAL E INTESTINAL	202
V - CONCLUSIONES	212
VI - BIBLIOGRAFIA	217

I - INTRODUCCION

El descubrimiento de la secretina en 1902 por Bayliss y Starling abrió un nuevo concepto en el estudio de los mecanismos de regulación de la función gastrointestinal y permitió a Edkins, en 1906, proponer su teoría sobre la gastrina. Edkins sugirió que la respuesta secretora gástrica debida a la presencia de alimento en el estómago (descrita originalmente por Pavlov) se debía, no a un reflejo nervioso sino a la presencia de una hormona de origen antral que denominó gastrina. Las dificultades en el estudio de esta hormona retrasaron su aislamiento y caracterización hasta medio siglo después (Gregory y Tracy, 1964).

En 1928, Ivy y Oldberg propusieron la existencia de un mecanismo hormonal regulando, en el perro, la contracción y el vaciamiento de la vesícula biliar, este factor hormonal fue denominado colecistoquinina ("que mueve la vesícula biliar") (CCK). En 1943, Harper y Raper descubrieron una sustancia, obtenida a partir de la mucosa duodenal, que estimulaba la secreción pancreática exocrina. Esta sustancia se denominó pancreozimina (PZ). Posteriormente, Harper y colaboradores purificaron la PZ a partir de extractos duodenales.

La CCK y la PZ fueron consideradas como dos hormonas completamente independientes hasta que Jorpes y Mutt, en un paso decisivo en el conocimiento de la CCK, purificaron un factor colecistoquinético, con 33 residuos aminoacídicos, a partir del intestino de cerdo (Jorpes y Mutt, 1966; Jorpes, 1968; Mutt y Jorpes, 1968). En el proceso de purificación de este factor Mutt y Jorpes observaron que la purificación de la actividad colecistoquinética era inseparable de una purificación paralela de la actividad pancreocinética. De este hecho dedujeron que ambas actividades correspondían a una única molécula que a partir del momento se denominó CCK-PZ o, con mayor éxito, únicamente CCK.

La purificación de diferentes formas moleculares de CCK y la obtención de moléculas sintéticas con diferente analogía a las naturales ha permitido un gran incremento en el conocimiento de la biología y fisiología de esta hormona, especialmente en los mamíferos, así como su relación con otros péptidos afines. Primero se realizaron estudios del tipo funcional y más tarde, el desarrollo de técnicas de radioinmunoensayo (RIA) específico para CCK ayudó a la caracterización molecular y a la correlación entre efectos biológicos

y concentración tisular y plasmática de la hormona.

El último gran avance se produjo en 1975, cuando Vanderhaeghen *et al.* determinaron la presencia de factores tipo gastrina-CCK en el sistema nervioso central de los vertebrados. Posteriormente estos factores han sido identificados como CCK, con una distribución altamente ubicua en todo el sistema nervioso. Estos hallazgos sentaron las bases para considerar a la CCK no únicamente como una hormona sino también como un neurotransmisor con todo un campo de nuevas funciones por estudiar.

1 - BIOQUIMICA DE LA COLECISTOQUININA

Desde su aislamiento y secuenciación por Mutt y Jorpes se han realizado numerosos estudios y revisiones sobre la estructura química de la CCK, su relación con otros péptidos afines y las relaciones estructura-función.

La CCK se incluye dentro de un grupo heterogéneo de péptidos que, de acuerdo con las semejanzas en su estructura química, forman la denominada "familia de péptidos reguladores gastrina-CCK".

La CCK se aisló originalmente como un péptido de 33 residuos aminoácidos y posteriormente, mediante el empleo de técnicas cromatográficas e inmunológicas, se han caracterizado otras muchas formas moleculares. De todas las formas moleculares aisladas no está claramente establecido cuales son formas circulantes biológicamente activas y cuales únicamente formas intermediarias en los procesos de síntesis de las formas activas. Esta heterogeneidad en cuanto a las formas moleculares aisladas revela, sin embargo, una alta homogeneidad en la estructura química y un elevado grado de conservación de la misma a lo largo de la escala filogenética. La región de la CCK más conservada filogenéticamente corresponde al extremo carboxiterminal de la molécula (Rehfeld, 1989).

La forma química mínima biológicamente activa de la molécula de CCK es la del tetrapéptido del extremo carboxiterminal. El resto de formas moleculares se obtienen por adición de residuos aminoacídicos a esta forma básica. Sin embargo, el espectro completo de actividades biológicas atribuidas a la CCK sólo se consigue con el octapéptido carboxiterminal siendo la presencia del residuo de Tyr sulfatada en posición 7 imprescindible para ello (Johnson *et al.*, 1970; Rehfeld, 1989).

1.1 - QUIMICA DE LA FAMILIA GASTRINA/CCK Y PEPTIDOS AFINES

Los principales componentes de la familia de péptidos gastrina-CCK son:

- Gastrina
- Gastrina de pollo
- CCK
- Ceruleina
- Filoceruleina
- Cionina

Esta familia de péptidos se caracteriza por poseer en común el tetrapéptido del extremo carboxiterminal, que además es la mínima secuencia biológicamente activa y que hace que todos ellos compartan un espectro de acciones biológicas muy semejantes, con potencias variables (Dockray y Varro, 1991). Fuera de esta región, estos péptidos presentan además una estructura química muy conservada que se extiende hasta los 8 residuos aminoacídicos. En todos los péptidos de la familia esta región presenta una estructura química que corresponde a uno de los siguientes patrones:

-Tyr-X-Trp (4)-	Gastrina
-Tyr-X-X-Trp (4)-	CCK Gastrina de pollo Ceruleina Filoceruleina
-Tyr-Tyr-X-Trp (4)-	Cionina

La semejanza química entre estos péptidos sugiere un origen filogenético común para todos ellos, divergiendo a partir de una molécula común todavía desconocida.

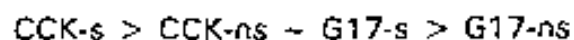
1.1.1 - CCK y gastrina

La CCK comparte con la gastrina el pentapéptido carboxiterminal, en la gastrina el residuo de Tyr que caracteriza químicamente al extremo C-terminal se encuentra en posición 6 y en la CCK en posición 7 (Fig. 1.1). La alta homología entre estas dos hormonas, sus moléculas precursoras y los genes respectivos apoya la hipótesis de un origen filogenético común. Las dos hormonas se diferenciarían por duplicación y posteriores mutaciones somáticas de un único gen ancestral. La separación entre gastrina y CCK se produce, probablemente, al nivel filogenético de los anfibios y amabas procederían de una molécula ancestral de tipo ceruleina (Rehfeld, 1981).

En su espectro biológico la gastrina muestra ciertas acciones de CCK, pero con potencias diferentes (Rehfeld, 1981). Las diferencias en las acciones biológicas dependen de dos factores básicos:

- Posición del residuo de Tyr: Los receptores para gastrina no diferencian la posición de la Tyr dentro de la molécula mientras que si que lo hacen los receptores para CCK.
- Estado de sulfatación del residuo de Tyr: La sulfatación aumenta la afinidad por los receptores (tanto por los de gastrina como por los de la CCK).

Según esto las afinidades de las diferentes moléculas por los receptores de CCK son (Huang *et al.*, 1989a):



En conjunto los receptores muestran la mayor afinidad por las moléculas con un residuo de Tyr sulfatada en posición 7, a partir del extremo carboxiterminal (Huang *et al.*, 1989a). La consecuencia funcional de este hecho es que la molécula de CCK debe estar sulfatada para reproducir su

CCK-58 porcina (cerebro) (Tatemoto *et al.*, 1984)

Ala-Val-Gln-Gly-Val-Asp-Gly-Glu-Ser-Arg-Ala-His-Leu-Cly-Ala-Leu-Leu-
Ala-Arg-Tyr-Ile-Gln-Gln-Ala-Arg-Lys-Ala-Pro-Ser-Gly-Arg-Val-Ser-Met-Ile-
Lys-Asn-Leu-Gln-Ser-Leu-Asp-Pro-Ser-His-Arg-Ile-Ser-Asp-Arg-Asp-Tyr-
Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ |
R

Gastrina-34 porcina (mucosa antral) (Yanaihara, 1989)

pGlu-Leu-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Pro-His-Leu-Val-Ala-Asp-Leu-Ala-Lys-Lys-
Gln-Gly-Pro-Trp-Met-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-
NH₂ |
R

Gastrina de pollo-36 (píloro) (Dimaline *et al.*, 1986; Bjornskov *et al.*, 1992)

Phe-Leu-Pro-His-Val-Phe-Ala-Glu-Leu-Ser-Asp-Arg-Lys-Gly-Phe-Val-Gln-
Gly-Asn-Gly-Ala-Val-Glu-Ala-Leu-His-Asp-His-Phe-Tyr-Pro-Asp-Trp-Met-
Asp-Phe-NH₂ |
R

Ceruleina (démis de *Hyla caerulea*) (Anastasi *et al.*, 1967 y 1968)

pGlu-Gln-Asp-Tyr-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂
|
SO₃H

Cionina (*Ciona intestinalis*) (Johnsen y Rehfeld, 1991)

Asn-Tyr-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂
| |
SO₃H SO₃H

FIG. 1.1 - Secuencias aminoacídicas de los péptidos de la familia gastrina-CCK.
R = H, en las formas moleculares no sulfatadas, y SO₃H en las sulfatadas.

espectro completo de acciones biológicas, mientras que la gastrina puede encontrarse tanto en forma sulfatada como no sulfatada ya que la Tyr localizada en posición 6 es menos importante para sus acciones biológicas (Johnson *et al.*, 1970; Dockray, 1977).

1.1.2 - CCK y gastrina de pollo

La gastrina de pollo ("chicken gastrin" según la literatura anglosajona) (cG) es una molécula de la familia gastrina-CCK, con 36 residuos aminoacídicos, recientemente aislada a partir del píloro de pollo. La cG comparte con la CCK el tetrapéptido carboxiterminal característico de los péptidos de esta familia y además presenta un residuo de Tyr sulfatada en posición 7 del extremo C-terminal, al igual que la CCK. Todas estas características la convierten en un péptido estructuralmente de tipo CCK (Dimaline *et al.*, 1986; Dimaline y Lee, 1990) (Fig. 1.1). Sin embargo el espectro de acciones biológicas de la molécula, tanto en mamífero como en el pollo, corresponde a una molécula con actividad de gastrina (es una potente estimuladora de la secreción ácida gástrica pero falla en la inducción de la contracción de la vesícula biliar y en la estimulación de la secreción pancreática) (Dimaline y Lee, 1990).

Estas características convierten a la cG en una molécula estructuralmente tipo CCK pero funcionalmente tipo gastrina. Esta aparente falta de relación estructura-actividad se debe, según Dimaline y Lee (1990), a la interacción estérica entre el residuo de Tyr en posición 7 y el de Pro en posición 6 que ocupan el extremo C-terminal de la molécula. La presencia de un residuo de prolina modificaría la estructura terciaria de la molécula de tal forma que equivaldría a obtener un péptido con una Tyr en posición 6 en lugar de en posición 7 y que por lo tanto conferiría a la molécula características funcionales de gastrina. Estas diferencias han sugerido a Schjoldager *et al.* (1991) que, aceptando un origen filogenético común para la gastrina y la CCK, los mamíferos y las aves presumiblemente han usado diferentes estrategias para asegurar la especificidad de acción de la gastrina y de la CCK. En los mamíferos esta distinción se ha logrado posicionando en localizaciones diferentes el residuo de Tyr; mientras que en las aves se ha realizado por inserción de un residuo de Pro y por lo tanto cambiando la

conformación del extremo C-terminal de la molécula.

Recientemente Bjornskov *et al.* (1992) han aislado nuevas formas moleculares de cG, tanto mayores a la inicialmente descrita de 36 residuos, como menores: 53-, 30-, 21- y 7-residuos C-terminales carboxiamidados. Al igual que la forma originalmente descrita por Dimaline *et al.* (1986) la mayoría de estas moléculas presentan el residuo de Tyr en posición 7 del extremo C-terminal en forma sulfatada, lo que indicaría que la forma biológicamente activa de la molécula es la que presenta esta característica estructural.

1.1.3- CCK y ceruleina/filoceruleina

La ceruleina es un decapeptido aislado de la epidermis del anfibio *Hyla caerulea* que comparte con la CCK similitudes tanto estructurales (Fig. 1.1) como funcionales (Anastasi *et al.*, 1967 y 1968; Bertaccini *et al.*, 1969; Mutt y Jorpes, 1971; Dockray, 1977):

- Idéntico pentapéptido carboxiterminal.
- Residuo de Tyr sulfatada en posición 7 del extremo carboxiterminal.
- Espectro de acciones similar a la CCK y a la gastrina. Las acciones de CCK sólo se reproducen adecuadamente cuando el residuo de Tyr en posición 7 permanece sulfatado.

Su función en los anfibios no se conoce totalmente, pero además de en la piel se ha encontrado también en el tracto gastrointestinal actuando, probablemente, como una hormona gastrointestinal (Dockray, 1977). El hecho de que en los anfibios no se haya detectado la presencia de péptidos tipo gastrina apoya la hipótesis de un ancestro común de tipo ceruleina como origen tanto de la gastrina como de la CCK. Sin embargo, si que se han determinado, en el tracto digestivo y en el sistema nervioso de algunos anfibios, péptidos de tipo CCK-8 no relacionados con la ceruleina, lo que sugeriría que, al menos en algunas especies de anfibios, la ceruleina no tiene la función de una CCK primitiva sino que ambos péptidos existen ya de forma

independiente (Dimoline, 1983).

La filoceruleina es un nonapéptido, estrechamente relacionado con la ceruleina, que se ha aislado de la piel de diferentes anfibios del género *Phyllomedusa*. El heptapéptido carboxiterminal de la molécula y su espectro de acciones biológicas son idénticos a los de la ceruleina (Anastasi *et al.*, 1969). Sus similitudes estructurales y funcionales con la CCK son iguales a las de la ceruleina.

1.1.4- CCK y cionina

La cionina es un neuropéptido aislado del protocordado *Ciona intestinalis*. Este péptido, aislado en una forma de ocho aminoácidos, muestra el extremo carboxiterminal común de la familia y además presenta dos residuos de Tyr sulfatados en posiciones 6 y 7 del extremo C-terminal de la molécula. Por lo tanto, desde un punto de vista estructural, la cionina es un péptido híbrido que muestra las mismas similitudes frente a la gastrina que frente a la CCK (Johnsen y Rehfeld, 1990) (Fig. 1.1).

Biológicamente las acciones de la cionina son de tipo CCK, según han probado Schjoldager *et al.* (1991) trabajando sobre sistemas biológicos de mamíferos. La relación estructura-función puesta de manifiesto por estos autores para la cionina muestra la importancia de la presencia de un residuo sulfatado de Tyr en posición 7 del extremo C-terminal para determinar la presencia de acciones biológicas de tipo CCK o de tipo gastrina en esta familia de péptidos. Igualmente, las acciones de la cionina muestran que las actividades biológicas de tipo CCK son filogenéticamente más antiguas que las de tipo gastrina y que, probablemente, en las especies menos evolucionadas, como se ha demostrado en algunas especies de peces, es más importante el estado de sulfatación del residuo de Tyr que no su posición dentro de la molécula (6 o 7 en el extremo C-terminal). Por lo tanto, estas especies no presentarían receptores específicos para gastrina y CCK ya que estas funciones no se habrían diferenciado aún (Schjoldager *et al.*, 1991).

1.1.5 - CCK y otros péptidos de estructura química afín.

Además de con los componentes de la familia gastrina-CCK, la CCK presenta relaciones estructurales con otros péptidos biológicamente activos, descritos tanto en animales superiores como en especies de invertebrados.

- CCK y Met-enkefalina

La Met-enkefalina es un opioide endógeno con funciones de neurotransmisor tanto a nivel del sistema nervioso central como periférico (Miller y Hirning, 1989). La CCK-7, con un residuo libre de Tyr en su extremo amino terminal, es la molécula que presenta mayor similitud estructural con la met-enkefalina (Rehfeld, 1989). La transcendencia funcional de esta relación estructural no se conoce.

- CCK y drosulfaquininas y leucosulfaquininas

Las drosulfaquininas (I y II) y las leucosulfaquininas (I y II) son péptidos de estructura definida a partir de cADN de *Drosophila melanogaster* y aislados de las cucarachas de la especie *Leucophaea maderae* respectivamente. Ambos grupos presentan una gran similitud estructural con la familia gastrina-CCK sin embargo son totalmente inactivos sobre sus sistemas biológicos diana (Nachman *et al.*, 1986a y b; Nichols *et al.*, 1988). Estas diferencias funcionales demuestran la importancia biológica que la conservación del tetrapéptido aminoterminal, que comparte toda la familia gastrina-CCK, tiene para la actividad biológica de la misma (Schjoldager *et al.*, 1991). Según Dockray (1989) la semejanza estructural entre las leucosulfaquininas y los péptidos de la familia gastrina-CCK es un claro ejemplo de evolución convergente y por lo tanto, no revela ningún tipo de relación filogenética entre estos péptidos.

- CCK y péptidos afines aislados en crustáceos

Recientemente, Favrel *et al.* (1991) han aislado, a partir del tracto digestivo de crustáceos marinos de la especie *Nephrops norvegicus*, cuatro péptidos que muestran inmunorreactividad de tipo gastrina-CCK.

A pesar de la similitud inmunológica, su secuenciación ha mostrado importantes diferencias estructurales con la familia gastrina-CCK lo que hace pensar que estos péptidos puedan formar parte de una nueva familia que participaría también en la regulación de la función gastrointestinal en especies inferiores.

1.2 - EL GEN DE LA CCK

El gen que codifica la CCK ha sido identificado, clonado y secuenciado en ratón (Friedman *et al.*, 1985, Vitale *et al.*, 1990), rata (Deschenes *et al.*, 1986; Kuwano *et al.*, 1992) y en la especie humana (Takahashi *et al.*, 1985). Existe una única copia del mismo, expresándose básicamente en sistema nervioso central y en el intestino (Friedman *et al.*, 1985), aunque se han determinado productos de expresión del gen en otros tejidos, como el renal (Vitale *et al.*, 1990). El gen se expresa de idéntica forma tanto en el intestino como en el cerebro, así la CCK se sintetiza como un único precursor y las diferentes formas moleculares presentes en los tejidos de deben a diferencias en el procesado post-translacional de la molécula (Gubler *et al.*, 1984; Takahashi *et al.*, 1985).

La CCK se sintetiza como un precursor de 115 residuos aminoacídicos denominado prepro-CCK, con una secuencia altamente conservada a lo largo de la escala filogenética (Takahashi *et al.*, 1985). El procesado post-translacional de este precursor produce las diferentes formas moleculares de la CCK y es pues el responsable de la macroheterogeneidad de la molécula. El procesado de la prepro-CCK es el mismo en cerebro y en intestino, sin embargo las diferentes formas moleculares que se encuentran en una y otra localización y las diferentes proporciones entre las mismas sugieren diferentes mecanismos de regulación de este procesado en ambas regiones (Friedman *et al.*, 1985).

1.3 - HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA CCK

La CCK es una molécula altamente heterogénea, con múltiples formas moleculares que pueden mostrar diferentes potencias biológicas (Rehfeld, 1989). Según Rehfeld (1980 y 1981) la heterogeneidad molecular de la CCK se explica mediante dos fenómenos diferentes:

- 1- **MACROHETEROGENEIDAD** de la CCK - Se debe a la presencia de moléculas de diferente longitud y refleja diferentes procesados de una molécula precursora.
- 2- **MICROHETEROGENEIDAD** de la CCK - Se debe a pequeños cambios en la estructura molecular (sulfatación, amidación) y refleja derivaciones post-translacionales que generalmente afectan a un solo residuo aminoacídico.

Las formas más frecuentes de CCK que pueden encontrarse en los tejidos se agrupan en 5 categorías (Dockray, 1979a; Rehfeld, 1980 y 1981; Brownstein y Rehfeld, 1985; Rehfeld *et al.*, 1985, Reeve *et al.*, 1986; Dockray y Varro, 1991):

- I - Agrupa a todas aquellas formas que contienen más de 33 aminoácidos, las formas moleculares predominantes son:

CCK-58 - Es la molécula de mayor tamaño que se ha aislado. Tiene una baja actividad biológica sobre los sistemas diana de la CCK, que aumenta por eliminación de residuos del extremo aminoterminal, lo que indica que puede ser una forma molecular intermedia en el proceso de generación de formas más cortas de alta actividad biológica (Höcker *et al.*, 1990).

CCK-39

- II - Representa a la forma molecular de 33 aminoácidos (**CCK-33**). Fue la primera forma de CCK aislada, a partir del intestino de cerdo (Mutt y Jorpes 1968 y 1971). Es muy abundante a nivel intestinal y muy escasa en el cerebro (menos del 5% del total de CCK). Su abundancia

a nivel intestinal, el hecho de que sea una de las principales formas moleculares liberadas en sangre cuando se estimula la liberación endógena de CCK (Cantor y Rehfeld, 1987; Jansen y Lamers, 1987; Wolfe y McGuigan, 1984; Eysselein *et al.*, 1987) y de que muestre una actividad biológica y una potencia similar a la de la forma de 8 aminoácidos (Solomon *et al.*, 1984) sugieren que puede ser una forma molecular importante biológicamente.

- III - Engloba a todas aquellas moléculas con un tamaño comprendido entre la CCK-33 y la CCK-8. Las formas más abundantes son:

CCK-25
CCK-22
CCK-18
CCK-12

Son formas con un significado biológico poco conocido, probablemente se encuentran sólo como intermediarias en los procesos de síntesis de moléculas menores, de actividad biológica conocida.

- IV - Engloba a las formas moleculares con 8 aminoácidos (CCK-8). La CCK-8 es una molécula de 8 residuos correspondientes al extremo carboxiterminal de la molécula precursora y se caracteriza por poseer un residuo de tirosina en posición 7. Esta tirosina puede estar en forma sulfatada o no sulfatada, pero para reproducir el espectro completo de acciones biológicas de la CCK es necesario que ésta esté en forma sulfatada, sólo entonces la molécula se comporta como un agonista total de los receptores de CCK (Huang *et al.*, 1989a). La CCK-8 es la forma molecular más abundante. Está presente mayoritariamente a nivel central y es mucho menos abundante a nivel digestivo. Ha sido determinada y aislada tanto en el cerebro (Dockray, 1978; Eng *et al.*, 1983; Eysselein *et al.*, 1984a; Reeve, 1984; Fan *et al.*, 1988) como en el tracto digestivo de numerosas especies (Maton *et al.*, 1984; Zhou *et al.*, 1985; Mössner *et al.*, 1991). Esta forma molecular es la única que ha sido aislada en las aves, a partir del cerebro de pollo (Fan *et al.*, 1987).

V - Engloba todas aquellas formas moleculares que contienen menos de 8 aminoácidos. Los representantes más importantes de este grupo son:

CCK-7

CCK-6

CCK-5

CCK-4 - Forma correspondiente al tetrapéptido C-terminal común a todos los péptidos de la familia. Corresponde a la mínima secuencia biológicamente activa.

Son formas poco abundantes en el tracto digestivo, predominando a nivel del sistema nervioso central, especialmente la CCK-5 y la -4 que pueden tener cierta importancia biológica a este nivel.

1.4 - LOCALIZACION Y DISTRIBUCION TISULAR DE LA CCK

1.4.1 - Localización celular de la CCK

La CCK se encuentra básicamente en dos localizaciones celulares diferentes:

- Células endocrinas
- Células nerviosas

1.4.1.1 - CCK endocrina

El empleo de diferentes técnicas inmunohistoquímicas ha permitido determinar la distribución, morfología y ultraestructura de las células endocrinas productoras de CCK y moléculas afines. Las células productoras de CCK se encuentran localizadas a nivel de la mucosa del tracto digestivo, son células de tipo abierto (poseen una región apical en contacto con la luz intestinal) (Buchan *et al.*, 1978; Larsson, 1980) y de forma elongada, oval o piramidal (Schlegel *et al.*, 1977). Se distribuyen con una abundancia

decreciente desde las áreas proximales del intestino a las más distales. Así la CCK está presente, de forma significativa, en la región del antro pilórico, duodeno y yeyuno (Buffa *et al.*, 1976; Schlegel *et al.*, 1977; Buchan, *et al.*, 1978; Rehfeld, 1980; Bishop *et al.*, 1991). Un hallazgo interesante cuando se estudia la distribución de la gastrina y la CCK es la falta de coexistencia de las dos hormonas (Rehfeld, 1981).

Mediante el empleo combinado de técnicas de extracción y concentración, inmunológicas y cromatográficas se han caracterizado las formas moleculares presentes en el intestino (principalmente duodeno y yeyuno) de múltiples especies. Las abundancias relativas de las diferentes formas moleculares y su distribución es muy variable de unas especies a otras y depende también en gran medida de las técnicas de extracción y análisis empleadas. En general, las formas moleculares más abundantes son la CCK-8, la CCK-33/39 y la CCK-58 (Calam *et al.*, 1982; Schafmayer *et al.*, 1982; Bacarese-Hamilton *et al.*, 1984a, 1984b y 1985; Maton *et al.*, 1984; Eberlein *et al.*, 1988; Eysselein *et al.*, 1988 y 1990; Turkelson y Solomon, 1990; Mössner *et al.*, 1991). Además de estas moléculas pueden encontrarse bajas concentraciones de formas intermedias entre la CCK-33/39 y la CCK-58 y formas menores a la CCK-8. La distribución de estas formas moleculares no es homogénea a lo largo del intestino. En la especie humana y en el cerdo las áreas más proximales presentan prácticamente iguales proporciones de formas moleculares cortas y largas mientras que en la zona media y distal se observa un predominio de las formas largas, sobre todo CCK-33/39, sobre las cortas (Maton *et al.*, 1984). En el perro, la cantidad total de CCK decrece en sentido caudal, la concentración de CCK-58 es prácticamente constante mientras que la de CCK-8 aumenta y la de CCK-33/39 disminuye en sentido distal (Eberlein *et al.*, 1988).

1.4.1.2 - CCK nerviosa

La distribución de la CCK en el sistema nervioso es altamente heterogénea y puede encontrarse inmunorreactividad frente a CCK en células nerviosas en múltiples localizaciones, tanto a nivel central como a nivel periférico.

A - CCK en el sistema nervioso central

La presencia de inmunorreactividad de tipo gastrina-CCK en el sistema nervioso central fue descrita por Vanderhæghen *et al.* en 1975 y posteriormente Dockray (1976) demostró que se debía a la presencia de CCK. Desde entonces, y debido al gran interés desarrollado sobre este péptido, los estudios sobre la biología de la CCK como neuropéptido se han desarrollado muy rápidamente. La CCK se encuentra en el sistema nervioso central en unas concentraciones muy altas (mucho mayores a las descritas para otros neuropéptidos o a las halladas en el intestino) y coexistiendo con otros neurotransmisores (Substancia P, GABA, serotonina,...) (Rehfeld, 1980 y 1981; Beinfeld, 1985; Crawley, 1985). Se localiza prácticamente en todas las regiones cerebrales (predominando una amplia distribución cortical), en la médula espinal (fibras sensoriales y ganglios de la raíz dorsal) (Rehfeld, 1978b; Larsson y Rehfeld, 1979; Beinfeld, 1985; Bishop *et al.*, 1991). Las altas concentraciones detectadas a este nivel y la ubicuidad de su distribución suponen un importante papel fisiológico de la CCK como neurotransmisor central.

B - CCK en el sistema nervioso periférico

La presencia de CCK ha sido determinada también en diferentes áreas del sistema nervioso periférico:

- 1- Plexos mientérico y submucoso del tracto digestivo: su presencia está relacionada con la de otros neurotransmisores y péptidos reguladores gastrointestinales (Sundler *et al.*, 1980; Furness *et al.*, 1984; Bishop *et al.*, 1991). Las terminaciones nerviosas con CCK predominan en las áreas más distales del intestino, sobre todo en ileon y colon (Larsson y Rehfeld, 1979; Larsson, 1980; Rehfeld, 1980 y 1981). La CCK neuronal presenta un predominio de formas moleculares pequeñas, preferentemente de CCK-8 (Hutchinson *et al.*, 1981).
- 2- Fibras aferentes vagales (Rehfeld, 1983; Rehfeld y Lundberg, 1983; Dockray *et al.*, 1981 y 1985; Bishop *et al.*, 1991). La forma predominante parece ser la de CCK-8 (Rehfeld, 1983). Varios autores

(Rehfeld y Lundberg, 1983; Dockray *et al.*, 1981) han demostrado que la CCK es transportada por fibras vagales aferentes desde el ganglio nodoso hacia el tracto digestivo. Esta demostración morfológica junto con recientes evidencias funcionales apoyan la hipótesis de la implicación de un reflejo vagal en las acciones gástricas mediadas por la CCK.

- 3- Ganglios y terminaciones nerviosas intrapancreáticas (Larsson, 1979; Sundler *et al.*, 1980).
- 4- Ganglio celiaco (Larsson y Rehfeld, 1979).
- 5- Terminaciones nerviosas en vejiga urinaria y útero (Larsson y Rehfeld, 1979; Rehfeld, 1980).
- 6- Nervios ciáticos (descrita únicamente en la especie felina) (Rehfeld y Lundberg, 1983).

1.4.1.3 - CCK en otras localizaciones

La presencia de CCK ha sido descrita además en: islotes pancreáticos (Larsson, 1980), espermatozoides de algunas especies de primates, mucosa nasal y pulmón (Bishop *et al.*, 1991).

1.4.2 - CCK en plasma

Hasta que no se demuestra inequívocamente que un péptido está presente en el plasma en concentraciones apropiadas para realizar su función fisiológica reguladora éste no puede ser considerado como una hormona. El conocimiento de las formas moleculares circulantes y su importancia en las funciones biológicas pasa por la disponibilidad de técnicas de análisis de alta especificidad. Este punto es particularmente importante en el caso de la CCK debido a: 1) su alta heterogeneidad molecular y su similitud estructural con otros péptidos, 2) la dificultad que presenta la obtención de CCK marcada que

pueda ser usada como trazador en los ensayos, 3) su amplio espectro de acciones y 4) sus bajos niveles circulantes (Cantor, 1989; Rehfeld, 1989). En los últimos años se han desarrollado radioinmunoensayos altamente específicos y sensibles (Rehfeld, 1978a; Burhol *et al.*, 1982; Schafmayer *et al.*, 1982; Chang y Chey, 1983; Cantor, 1986; Turkelson *et al.*, 1986; Höcker *et al.*, 1990) así como diferentes técnicas de bioensayo (Johnson y McDermott, 1973; Höcker *et al.*, 1990; Mössner *et al.*, 1991) que permiten valorar de forma fiable la CCK circulante.

La naturaleza molecular de la CCK plasmática no se conoce completamente y los resultados conocidos hasta la actualidad muestran una alta divergencia (Rehfeld, 1989). En primer lugar, parece haber importantes variaciones de tipo específico; así en rata y cerdo las formas plasmáticas predominantes son la CCK-8, la CCK-12 y la CCK-22 (Rehfeld *et al.*, 1982) mientras que en la especie humana es importante la presencia de moléculas del tipo CCK-27, CCK-33/39 y mayores (CCK-58) (Gaisano *et al.*, 1986; Cantor y Rehfeld, 1987; Jansen y Lamers, 1987) y en perro las formas predominantes son la CCK-8, la -33/39 y la -58 (Chang y Chey, 1983; Wolfe y McGuigan, 1984; Eysselein *et al.*, 1987).

En condiciones basales las concentraciones de CCK en plasma son muy variables según las diferentes especies y la bibliografía consultada, y oscilan entre 1 y 50 pM (Burhol *et al.*, 1982; Maton *et al.*, 1982; Jansen y Lamers, 1983 y 1986; Wolfe y McGuigan, 1984; Cantor, 1986; Gaisano *et al.*, 1986; Rehfeld, 1989). La estimulación de la secreción endógena eleva estos niveles basales hasta concentraciones que oscilan, también según la especie y la bibliografía, entre 6 y 80-90 pM (Burhol *et al.*, 1982; Maton *et al.*, 1982; Chang y Chey, 1983; Eysselein *et al.*, 1984b; Wolfe y McGuigan, 1984; Gaisano *et al.*, 1986; Jansen y Lamers, 1986; Rehfeld, 1989). Este patrón de variación en los niveles endógenos de CCK puede ser simulado por la infusión exógena del péptido, produciéndose entonces los mismos efectos biológicos que se observan por la estimulación de su liberación endógena, lo que confirmaría el papel regulador fisiológico de la CCK (Rehfeld, 1989).

1.4.2.1 - Liberación de CCK.

El principal estímulo liberador de CCK en el tracto digestivo es la presencia de alimento en el lumen intestinal, básicamente en duodeno y yeyuno (Burhol *et al.*, 1982; Cantor y Rehfeld, 1987; Cantor, 1989). Así, una comida estándar produce un aumento significativo en los niveles circulantes de CCK, que alcanzan su máximo aproximadamente a los 10 min tras la ingestión de la misma y que se mantienen por un período de aproximadamente tres horas. Cuando se estudia por separado el papel en esta estimulación de los diferentes componentes de la dieta (lípidos, proteínas y glúcidos, básicamente) puede verse que no todos tienen la misma importancia. Además, parece haber importantes diferencias especie específicas en cuanto a la habilidad de los componentes de la dieta para estimular la liberación de CCK endógena. Así en la rata las proteínas son potentes estimulantes de la liberación de CCK pero, a diferencia de en otras especies, no lo son los lípidos o las soluciones de aminoácidos (Liddle *et al.*, 1986a; Cantor, 1989).

Los lípidos parecen ser el estímulo exógeno más potente provocando la liberación de CCK endógena, especialmente cuando se perfunden en el intestino delgado. En 1974 Meyer y Jones determinaron algunas características importantes del proceso de estimulación de la liberación de CCK debido a los lípidos: 1) la mínima longitud de la cadena hidrocarbonada debía ser de 9 carbonos para tener efecto estimulatorio, 2) los triglicéridos no estimulaban la liberación si no se sometían a una hidrólisis previa y 3) la dispersión de los ácidos grasos en micelas (mediante sales biliares o detergentes) incrementaba marcadamente la actividad estimulante de los mismos. La potencia de los diferentes compuestos lipídicos estimulando la liberación de CCK depende de dos factores básicos: 1) de la longitud de la molécula, así los ácidos grasos y los triglicéridos de cadena larga son potentes estimulantes de la secreción de CCK mientras que los de cadena media y corta (de menos de 9 átomos de carbono) son estimulantes pobres (Cantor, 1989) y 2) del grado de insaturación de forma que, a medida que el grado de insaturación aumenta la capacidad estimulante sobre la secreción de CCK (Berdshall *et al.*, 1989).

La CCK plasmática liberada por la estimulación con lípidos es altamente heterogénea. En la especie humana, Maton *et al.* (1982) encontraron

aumentos significativos en los niveles circulantes de CCK-8 tras la ingestión de una comida grasa. Posteriormente, Jansen y Lamers (1987) , en una experiencia similar, encontraron que las formas de CCK liberadas eran mayoritariamente la CCK-58, -33/39 y -22/27 mientras que los aumentos en los niveles circulantes de CCK-8 no eran significativos. En el perro, la perfusión intraduodenal de oleato sódico (4.5×10^{-3} moles/30 min.) produce un incremento en los niveles de CCK circulante de niveles basales menores a 2 pM hasta 6 pM. En la misma experiencia, las formas moleculares liberadas por el oleato sódico fueron mayoritariamente CCK-33/39 y -8 (Eysselein *et al.*, 1984b). Los resultados obtenidos en este tipo de experiencias concuerdan con la idea de que la CCK actúe de forma fisiológica como una hormona liberada postprandialmente regulando la secreción pancreática y la contracción de la vesícula biliar (Maton *et al.*, 1982).

Las proteínas son también estimulantes efectivos de la liberación de CCK endocrina (Wolfe y McGuigan, 1984). Además de las mezclas de péptidos, algunos aminoácidos han demostrado ser por sí mismos potentes estimulantes de la secreción de CCK (Chang y Chey, 1983). El papel de los glúcidos, sin embargo, no está claro y los resultados obtenidos hasta el momento parecen indicar que estos compuestos no son importantes estimulando la liberación de CCK (Rehfeld, 1986; Cantor, 1989).

La perfusión duodenal de soluciones ácidas estimula la liberación de CCK en humanos, perro y cerdo, sin embargo, el papel del ácido en la estimulación fisiológica de la secreción de esta hormona parece ser poco importante (Cantor, 1989). Las soluciones salinas no son estimulantes de la liberación de CCK endógena (Cantor, 1989). Otros factores, como la presencia de sales de calcio en el lumen intestinal, pueden estimular también la liberación de CCK (Holtermuller *et al.*, 1976).

1.4.2.2 - Control nervioso de la liberación de CCK.

Tanto el sistema nervioso central como el autónomo participan en la regulación de la liberación de CCK endocrina. La estimulación vagal produce aumentos leves de la CCK circulante en humanos y cerdo pero no en el perro. Igualmente, la vagotomía aumenta la liberación de CCK inducida por la

ingestión de una comida grasa en la especie humana. Las células endocrinas secretoras de CCK parecen recibir además inervación autónoma tanto excitatoria como inhibitoria (Cantor, 1989).

La acción conjunta de estos factores, junto con un mecanismo de tipo "feedback" mediado por la propia CCK contribuyen a regular la liberación de la hormona de forma que los niveles de ésta estén correlacionados con el estado del animal.

1.4.2.3 - Eliminación de la CCK plasmática

El tiempo de vida media de la CCK en el plasma depende de la forma molecular de la misma y de la especie animal consideradas. En el hombre, para la CCK-8 es de 1-2 min y para la CCK-33 de 3 min (Cantor, 1989). En el cerdo, la vida media es de unos 30 s para la CCK-8 y de unos 80 s para la CCK-39 (Cuber *et al.*, 1989a).

Tanto en la especie humana como en el cerdo, el principal órgano catabolizador es el hígado (Cantor, 1989; Cuber *et al.*, 1989a).

1.5 - RECEPTORES DE COLEGISTOQUININA: CLASIFICACION Y CARACTERIZACION

El primer paso en la interacción de un péptido gastrointestinal con su célula diana es un proceso de unión reversible del péptido con receptores específicos localizados en la superficie celular (Gardner y Jensen, 1990). Desde el descubrimiento de la CCK se ha trabajado activamente en la caracterización de los receptores involucrados en las diferentes acciones hormonales descritas, así los receptores para CCK han sido los más estudiados (en múltiples especies y tejidos) de los descritos para las hormonas gastrointestinales (Morriset, 1991). Tres factores básicos han permitido que, durante los últimos años, el conocimiento de los receptores implicados en las respuestas de la CCK haya avanzado de forma importante: 1) la posibilidad de obtener diferentes formas moleculares de CCK y

substancias análogas mediante síntesis, 2) el avance en el campo de la síntesis y caracterización de antagonistas específicos y 3) Los avances técnicos, sobre todo en biología molecular, aplicados al estudio de receptores.

La heterogeneidad de los receptores de CCK ha sido descrita a partir de las diferencias de afinidad entre las diferentes formas moleculares y los receptores presentes en cerebro y páncreas (Innis y Snyder, 1980). De acuerdo con la potencia como agonistas de diferentes péptidos, tanto naturales como sintéticos, y la distribución tisular, clásicamente, los receptores para CCK se han dividido en dos grupos: receptores tipo A y receptores tipo B. En los últimos años, esta clasificación se ha complicado al hallar receptores de uno y otro tipo en otras localizaciones fuera de las clásicamente descritas para cada uno. Sin embargo, esta división básica sigue considerándose útil (Woodruf y Hughes, 1991).

1.5.1 - Receptores CCK-A

Receptores caracterizados por el requerimiento de al menos el heptapéptido terminal de la molécula (incluyendo el carácter sulfatado del residuo de Tyr en posición 7) para que la interacción receptor-agonista sea efectiva (Jensen y Gardner, 1991; Miller, 1991; Woodruf y Hughes, 1991). Descritos inicialmente como propios del tracto digestivo (su denominación se deriva del termino anglosajón "alimentary") actualmente se sabe que pueden tener otras localizaciones.

- Se han descrito en:
- Músculo liso gastrointestinal
 - Neuronas del esfínter esofágico inferior
 - Plexo mientérico
 - Nervios Vagos
 - Neuronas colinérgicas de la vesícula biliar
 - Páncreas
 - Sistema nervioso central
 - Líneas celulares tumorales

El uso de técnicas de solubilización de receptores, determinación de pesos moleculares y empleo de antagonistas específicos de diferentes tipos



ha demostrado cierta heterogeneidad entre los receptores CCK-A, especialmente en dos zonas: páncreas y vesícula biliar (Singh y Thompson, 1987; Miller, 1990; Morriset, 1991; Woodruff y Hughes, 1991)

1.5.2 - Receptores CCK-B

Se caracterizan por requerir sólo el tetrapéptido terminal de la molécula para que la interacción receptor-agonista sea efectiva. Son receptores mucho menos selectivos que los de tipo A y, además de reconocer las formas moleculares no sulfatadas, pueden interaccionar también con diferentes formas moleculares de gastrina (Jensen y Gardner, 1991; Miller, 1991; Woodruff y Hughes, 1991).

Inicialmente descritos como receptores propios del sistema nervioso central (su denominación procede del término anglosajón "brain") actualmente se han descrito en otras localizaciones:

- Algunas células tumorales
- Músculo liso gastrointestinal
- Células parietales y principales gástricas
- Células acinares pancreáticas

1.5.3 - Relación entre los receptores para gastrina y para CCK

La semejanza estructural entre los péptidos gastrina y CCK ha supuesto una barrera no sólo para las técnicas destinadas a la determinación de ambos péptidos sino también para la correcta caracterización de los receptores de una y otra molécula. Así, la proximidad filogenética entre ambas hormonas se presenta también en los receptores propios de cada una.

Cuando se valora la afinidad de los diferentes tipos de receptores de CCK frente a la gastrina puede observarse que los receptores CCK-B presentan una alta afinidad (en un rango semejante a la CCK-8) mientras que los CCK-A tienen baja afinidad por esta hormona. Esto ha llevado a algunos autores a considerar idénticos a los receptores propios de la gastrina y a los

CCK-B, reconociendo indistintamente ambos péptidos. Por ello los receptores **CCK-B** se denominan también receptores **CCK-B/gastrina** (Jensen y Gardner, 1991). Para otros autores los receptores de gastrina deben incluirse como un tercer tipo de receptores de CCK ya que muestran un mismo rango de afinidad por la gastrina que por las diferentes formas moleculares de CCK.

En la misma línea, algunos investigadores describen un tipo particular de receptor para la CCK, denominado receptor **CCK-C**. Este receptor ha sido descrito en el cobayo localizado a nivel de las células parietales del estómago y relacionado con la secreción de pepsinógeno (Woodruf y Hughes, 1991). El receptor **CCK-C** muestra igual rango de potencia frente a la gastrina que frente a la **CCK-8**, por lo que podría ser una manifestación de los receptores conocidos como **CCK-B/gastrina**.

Contrariamente a los receptores **CCK-B**, los **CCK-A** muestran baja afinidad por la gastrina y en general por todas aquellas formas moleculares menores de 8 residuos o no sulfatadas. Esta diferencia en los rangos de afinidades para los receptores **CCK-A** se ha explicado como el resultado de la presión evolutiva necesaria para diferenciar, a nivel periférico, ambos péptidos (Singh y Thompson, 1987; Woodruf y Hughes, 1991).

1.5.4 - Antagonistas de la CCK

Durante los últimos años se ha trabajado activamente en la caracterización de antagonistas de la CCK que reúnan tres importantes características: alta especificidad, alta potencia y alta selectividad por los diferentes tipos de receptores. Los antagonistas descritos hasta el momento se pueden agrupar en 5 categorías (Freidinger, 1989; Woodruf y Hughes, 1991):

- 1- Derivados de nucleótidos cíclicos
- 2- Derivados de aminoácidos
- 3- Análogos del extremo C-terminal de la CCK
- 4- Derivados de benzodiazepinas
- 5- Otros antagonistas

1- Antagonistas derivados de nucleótidos cíclicos

Fueron los primeros antagonistas específicos de la CCK descritos. Producen una inhibición selectiva de tipo competitivo de los receptores de CCK (Woodruf y Hughes, 1991), con especial afinidad por los CCK-B/gastrina (Jensen y Gardner, 1991), aunque son antagonistas notablemente débiles (Miller, 1991). El más conocido y efectivo es el dibutiril guanosina monofosfato cíclico.

Son productos efectivos antagonizando los efectos de la CCK en el ileon de cobayo *in vitro* y la contracción de la vesícula biliar (Woodruf y Hughes, 1991), e inhibiendo los efectos en músculo liso y células glandulares gástricas (Jensen y Gardner, 1991).

2- Antagonistas derivados de aminoácidos

Son antagonistas potentes, selectivos, competitivos y reversibles para numerosas funciones periféricas de la CCK. Muestran especial afinidad por los receptores CCK-A mientras que se unen pobremente a los CCK-B o a los receptores de gastrina (Rovati, 1991). Muestran rangos variables de afinidad para los diferentes sistemas biológicos testados, lo que ha permitido diferenciar varios subtipos de receptores periféricos (Woodruf y Hughes, 1991). Los más importantes son: proglumida, benzotript, lorglumida (CR 1409) y loxiglumida (CR 1505).

Antagonizan de forma altamente efectiva los efectos de la CCK en:

- Páncreas (Beglinger y Adler, 1991; Woodruf y Hughes, 1991).
- Músculo liso gastrointestinal (Beglinger y Adler, 1991; Jensen y Gardner, 1991; Karaus y Niederau, 1991; Katschinski, 1991; Woodruf y Hughes, 1991).
- Tránsito gastrointestinal (Meyer-Wyss *et al.*, 1991).
- Saciedad y otros efectos centrales (Jensen y Gardner, 1991; Woodruf y Hughes, 1991).

La proglumida es además un eficaz antagonista de los efectos

estimulantes de la gastrina sobre la secreción ácida gástrica (Walsh y Kovacs, 1990).

3- Antagonistas análogos del extremo C-terminal de la CCK

Son antagonistas obtenidos por diferentes deleciones y modificaciones de los residuos aminoacídicos del extremo C-terminal de la molécula de CCK. Su uso ha ayudado a determinar la importancia relativa de los diferentes residuos de la molécula en la unión a los receptores (Woodruf y Hughes, 1991). Son básicamente CCK-A antagonistas aunque algunos pueden interaccionar con receptores CCK-B/gastrina y ser antagonistas eficaces de los efectos de la gastrina (Jensen y Gardner, 1991; Martínez *et al.*, 1991a).

Dentro de este grupo se incluyen los NH₂-terminal butiloxicarbonil (BOC)-derivados, de los cuales son destacables dos características:

- Por diferencias de afinidad distinguen dos subtipos de receptores a nivel pancreático (Martínez *et al.*, 1991a).
- Son los únicos antagonistas que han demostrado ser activos en las aves, antagonizando de forma efectiva la estimulación por CCK de la secreción pancreática en el pavo (Campbell *et al.*, 1991).

Son antagonistas eficaces de los efectos de la CCK y la gastrina en músculo gástrico, vesícula biliar e íleon (Martínez *et al.*, 1991).

4- Antagonistas derivados de las benzodiazepinas

Son los antagonistas de la CCK más selectivos y potentes que se conocen (Woodruf y Hughes, 1991) y los más empleados actualmente. Los más usados son los derivados de la asperlicina (producto aislado del hongo *Aspergillus alliaceus*): L364,718 y L365,260.

A - L364,718 (o MK-329 o devazepide)

Es un derivado de las benzodiazepinas con propiedades antagonistas de la CCK, con alta potencia y selectividad por los receptores CCK-A (con una afinidad similar a la de la CCK-8), aunque puede manifestar ciertos efectos antagonistas sobre receptores CCK-B [aproximadamente unas 1000 veces menor a la manifestada frente a los CCK-A] (Freidinger, 1989; Berlin y Freidinger, 1991; Woodruf y Hughes, 1991).

Es altamente eficaz antagonizando los efectos de la CCK sobre:

- Secreción pancreática exocrina *in vivo* e *in vitro* (Huang *et al.*, 1989b; Rayford, 1990; Berlin y Freidinger, 1991; Cantor, 1991; Woodruf y Hughes, 1991). Únicamente en el pavo no ha podido ser antagonizada esta acción (Campbell *et al.* 1991).
- Crecimiento del páncreas exocrino (Berlin y Freidinger, 1991; Woodruf y Hughes, 1991).
- Contracción de la vesícula biliar (Berlin y Freidinger, 1991; Cantor, 1991; Liddle, 1991; Woodruf y Hughes, 1991).
- Motilidad gastrointestinal: es un antagonista eficaz de los efectos motores de la CCK en estómago, intestino delgado y colon (Karaus y Niederau, 1991; Woodruf y Hughes, 1991). En el estómago revierte hasta valores basales el retraso en el vaciamiento gástrico producido por la CCK (Berlin y Freidinger, 1991; Liddle, 1991). En el perro reduce de forma significativa la motilidad intestinal en estado postprandial pero sin llegar a restaurar el patrón característico del estado de ayuno (Berlin y Freidinger, 1991).
- Ingesta (Woodruf y Hughes, 1991).

B - L365,260

Es un CCK-B/gastrina antagonista altamente específico, el más empleado de los CCK-B antagonistas y uno de los más potentes de los conocidos actualmente (Freidinger, 1989; Huang *et al.*, 1989b; Jensen y Gardner, 1991).

5- Otros antagonistas de la CCK

Otros dos grupos de moléculas se han descrito como antagonistas de la CCK, con una especificidad variable.

A - Peptoides

Son antagonistas no peptídicos de la CCK. Los más conocidos son el CI-988 (conocido como PD 134308) y 3I PD 135158. Son los antagonistas más potentes de los receptores CCK-B (Woodruff y Hughes, 1991).

B - Sustancias modificadas por sustitución con D-aminoácidos

Son moléculas peptídicas, análogas a la sustancia P(SP)-4-11 que originalmente son antagonistas de los receptores de sustancia P y bombesina, pero que pueden actuar también como inhibidores de la acción de la CCK sobre los receptores CCK-A. El principal límite para su uso, sobre todo en estudios *in vivo*, es su inespecificidad (Jensen y Gardner, 1991).

1.5.5 - Potencia relativa de los antagonistas de la CCK

En general, los diferentes antagonistas para la CCK han resultado ser más efectivos *in vivo* que *in vitro*. Esto se interpreta como que de la metabolización de los antagonistas se obtienen metabolitos con mayor poder antagonista que los productos iniciales. Sin embargo, dos de los antagonistas más empleados, el L364,718 y el CR1409 (lorglumida), resultan ser más

efectivos *in vitro* que *in vivo* (Niederau *et al.*, 1991).

Las potencias como antagonistas de las diferentes sustancias dependen más del sistema biológico testado que de los modelos experimentales, así para los tres sistemas mas estudiados tenemos (Woodruf y Hughes, 1991):

- Vaciamiento gástrico:

L364,718 > asperlicina > proglumida

- Contracción de la vesícula biliar y secreción exocrina pancreática:

L364,718 > lorglumida > asperlicina > dibutiril guanosina monofosfato cíclica

2 - EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA CCK

La CCK desempeña numerosas funciones biológicas, de las cuales las más importantes son aquellas que tienen como objetivo el control de diversos aspectos de la función gastrointestinal. La acción biológica global de la CCK sería la regulación de la llegada de alimento a las áreas proximales del intestino delgado, y por lo tanto de la composición del contenido luminal de esta zona, a partir de la integración de las funciones intestinales y del sistema nervioso central (Dockray, 1988; 1989b).

2.1 - SECRECIÓN GASTROINTESTINAL

Numerosos estudios han valorado el papel de la CCK en el transporte electrolítico a través del epitelio intestinal (Cooke, 1987; Kachur *et al.*, 1991). A nivel duodenal la CCK produce un aumento tanto de las secreciones enzimáticas (peptidasas intestinales) como de la secreción de bicarbonato en la mucosa (Walsh, 1987; Chey y Chang, 1989; Flemström y Garner, 1989).

A nivel gástrico los efectos secretores son mucho más complejos. Al igual que a nivel intestinal, la CCK es también una potente estimuladora de la secreción de bicarbonato *in vivo* (tanto en mamíferos como en anfibios) (Walsh, 1987; Flemström y Garner, 1989). Experiencias *in vitro* han demostrado que puede también tener un efecto directo sobre las células principales estimulando la secreción de pepsinógeno (Hersey, 1989; Modlin *et al.*, 1988).

El efecto de la CCK sobre la secreción ácida gástrica es doble. *In vivo*, la CCK actúa como una potente estimuladora de la secreción ácida basal (Walsh, 1987). En rata y cobaya se ha demostrado que esta estimulación se debe a un mecanismo central mediado por vías vagales, que implica además la participación de mecanismos colinérgicos (Taché, 1987). La estimulación maximal alcanzada con CCK *in vivo* es de un 40% de la producida por la gastrina, mientras que en experimentos *in vitro* ambas hormonas resultan

igualmente potentes (Debas 1987). Cuando la secreción ácida se encuentra estimulada (por la liberación endógena de gastrina debida a la dieta o por la administración exógena de este péptido) los efectos de la CCK (exógena o por liberación endógena) son de tipo inhibitorio; excepto en el gato y en determinadas condiciones en la rata, especies en las cuales esta inhibición no está presente. Este efecto inhibitorio se debe a la acción liberadora de somatostatina de la CCK (Konturek, 1989; Walsh, 1987). Según Walsh (1989) el mecanismo por el cual la CCK inhibe la secreción ácida estimulada es doble: por la liberación de somatostatina y por la estimulación de un reflejo neural inhibitorio, como se ha demostrado en el ratón.

Los estudios realizados en el pollo muestran que la CCK (administrada tanto subcutáneamente como por vía *i.v.*) es una potente estimuladora (en una relación dosis-dependiente) de la secreción ácida pero estimula pobremente la secreción de pepsina. (Burhol, 1974; Duke, 1986a)

2.2 - EFECTOS TROFICOS

La acción trófica de la CCK sobre la mucosa intestinal no tiene significado fisiológico. En condiciones normales no produce ningún cambio, sólo en animales privados de alimento produce una reversión de la atrofia de la mucosa (aumento del peso y del contenido en proteínas y DNA) y recuperación de la capacidad de absorción. Sin embargo, éste no es un efecto directo de la hormona sino que se debe a la presencia de secreciones biliares y pancreáticas en la luz intestinal (Fine *et al.*, 1983; Johnson, 1989). En el estómago, la CCK induce crecimiento de la mucosa (Chey y Chang, 1989).

En el ratón se ha observado hipertrofia del epitelio de la vesícula biliar por la administración de CCK a dosis que hacen pensar que éste pueda ser un efecto fisiológico de la hormona (Johnson, 1987; 1989).

Los efectos tróficos más claros son los que se describen a nivel pancreático. *In vivo*, la administración exógena de CCK produce un crecimiento del páncreas exocrino (aumento del peso del órgano, de su

contenido enzimático y de RNA y DNA) (Jonhson, 1987; 1989; Haarstad y Petersen, 1989; Rehfeld, 1989; Solomon, 1990). Un efecto trófico similar ha sido descrito en el pollo (Solomon *et al.*, 1986). Este efecto se reproduce cuando se realizan infusiones duodenales de aminoácidos y de soluciones ácidas, así como cuando se administran dietas ricas en proteínas o con inhibidores de la tripsina; condiciones en las cuales se ha demostrado que hay aumentos significativos en los niveles séricos de CCK. Esto podría indicar un papel fisiológico de la CCK en la regulación del crecimiento pancreático (Jonhson, 1989). Los efectos tróficos pancreáticos pueden potenciarse en algunas especies por la administración simultánea de CCK y de secretina (Solomon y Wood, 1988). La administración repetida de altas dosis de CCK puede llegar a producir pancreatitis y cambios en la morfología celular (Walsh, 1987; San Román *et al.*, 1990). *In vitro*, la CCK tiene efectos tróficos directos sobre células acinares pancreáticas (Logsdon, 1989).

2.3- SECRECION HEPATICA Y BILIAR

La CCK aumenta la secreción hepática por estimulación de la producción de bicarbonato (Chey y Chang, 1989; Rehfeld, 1989). Los efectos que la CCK tiene sobre la vesícula biliar (contracción de la musculatura lisa) y sobre el conducto biliar y el esfínter de Oddí (produciendo ciclos alternativos de contracción y relajación por acción sobre la musculatura lisa) son los responsables del aumento de la secreción biliar a nivel intestinal.

2.4- SECRECION PANCREATICA

La acción de la CCK estimulando la secreción pancreática exocrina es, sin duda, una de las más estudiadas y tal vez la más constante a lo largo de la escala filogenética (Dockray 1989b) . La CCK es la principal reguladora de la fase intestinal de la secreción pancreática inducida por el alimento (Solomon, 1987). El aumento del flujo pancreático inducido por la CCK se

debe a la suma de varios factores: aumento de la síntesis y secreción de enzimas (tripsinógeno y quimiotripsinógeno, amilasa, fosfatasa alcalina, disacaridasas y enteroquinasa) y al aumento de la secreción de bicarbonato y de agua (Padfield y Case, 1987; Walsh 1987; Cuber *et al.*, 1989b; Rehfeld, 1989). En algunas especies se ha observado que los aumentos en el flujo pancreático no se acompañan de incrementos en la secreción de bicarbonato (rata, ratón, cerdo y algunos primates), mientras que puede aumentar la secreción de ion cloruro (rata y ratón) (Case y Argent, 1989).

En las aves (pollo y pavo), al igual que en los mamíferos, la CCK aumenta el flujo pancreático y la secreción protéica enzimática de forma dosis-dependiente (Dockray, 1973 y 1975; Yang *et al.*, 1989a). Sin embargo, en el pollo, no se observan los efectos de potenciación observados en los mamíferos por la administración conjunta de CCK y secretina. Esto parece indicar que el sinergismo de los secretagogos pancreáticos es menos importante en las aves que en los mamíferos (Dimoline y Dockray, 1979).

2.5- APETITO Y SACIEDAD

En los mamíferos, la CCK parece ser uno de los principales reguladores endógenos de la ingesta; estando implicada en la generación de sensación de saciedad (Morley, 1982 ;Schick *et al.*, 1986; Shillabeer y Davison, 1986). Este efecto parece ser de tipo central (región hipotalámica) estando mediado periféricamente por estímulos vagales de tipo colinérgico (Walsh, 1987; Rehfeld, 1989; Garlicki *et al.*, 1990; Reidelberger *et al.*, 1990; Shiraishi, 1990). La CCK actuaría como un factor de saciedad a corto plazo, liberado en el SNC en respuesta a determinadas señales periféricas generadas como resultado de la ingestión de alimento (Boile *et al.*, 1986). Para algunos autores los efectos saciantes de la CCK se producen por un mecanismo indirecto, debido a los cambios que ésta produce a nivel gastrointestinal (Boile *et al.*, 1986). Mientras que en algunas especies este efecto parece ser básicamente de tipo periférico (rata, ratón, conejo y primates) en otras sólo puede observarse tras la administración central del péptido (oveja, cerdo y pollo) (Morley *et al.*, 1985). Sin embargo, los trabajos realizados hasta el momento no permiten llegar a resultados conclusivos sobre el papel de la CCK en la regulación de la ingesta, especialmente en rata y humanos (Walsh, 1987) y

algunos autores creen que las respuestas observadas no son suficientes para atribuir a la CCK el papel de mediador fisiológico de la saciedad (Gibbs *et al.*, 1973; Collins *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1989).

2.6 - OTROS EFECTOS BIOLÓGICOS

2.6.1 - Acción sobre el flujo sanguíneo digestivo.

La administración exógena de CCK produce un aumento del flujo sanguíneo intestinal, por un efecto vasodilatador (perro y gato). Estos cambios vasculares pueden reproducirse por la administración de sustancias que actúan liberando CCK (como puede ser la L-fenilalanina) (Walsh, 1987; Jodal y Lundgren, 1989; Rehfeld, 1989).

2.6.2 - Efectos sobre el sistema endocrino.

La CCK actúa sobre el sistema neuroendocrino estimulando la liberación de otras hormonas, bien por efecto directo o bien por efecto indirecto debido al desencadenamiento de mecanismos de feedback para mantener la homeostasis orgánica.

- Páncreas endocrino - La CCK nerviosa estimula la secreción de insulina y glucagón (rata, humanos y cerdo) (Walsh 1987; Chey y Chang, 1989; Rehfeld, 1989). Este efecto puede observarse tanto *in vivo*, como *in vitro*. La CCK podría actuar como un regulador fisiológico de la liberación postprandial de insulina (Liddle *et al.*, 1986c), al igual que la insulina podría desencadenar un feedback regulador de la secreción postprandial de CCK (Van Der Burg *et al.*, 1990).
- Somatostatina - En perro y cerdo la CCK es una potente liberadora de somatostatina, tanto *in vivo* como *in vitro* (Cuber *et al.*, 1986; Walsh 1987; Konturek, 1989). Sin embargo este efecto no se observa en otras especies, como la rata (Eissele *et al.*, 1991). Los efectos liberadores de somatostatina están relacionados con los efectos de la CCK sobre la

secreción ácida gástrica (ver el punto 2.1, pág. 30).

- Polipéptido Pancreático (PP) - La CCK produce también aumento de la secreción de PP (humanos y cerdo) (Inoue, 1983; Cuber, 1986; Walsh 1987; Chey y Chang, 1989).
- Hormonas segregadas por el lóbulo anterior de la hipófisis - La CCK actúa modificando la liberación de diferentes hormonas producidas por la hipófisis. La CCK exógena reduce la liberación de TRF y LH y aumenta la de ACTH, prolactina y hormona del crecimiento (Morley, 1982).

2.6.3 - Acciones centrales.

Desde el descubrimiento de la presencia de CCK en el sistema nervioso central (Dockray, 1976) se han descrito numerosas acciones mediadas por la CCK a este nivel (Morley, 1982):

- Modulación del apetito y de los mecanismos de saciedad (ver el punto 2.5, pág 33).
- Hipotermia, dosis-dependiente.
- Analgesia - participa en los mecanismos de analgesia induciendo la liberación de opioides endógenos.
- Hiperglucemia.
- Participación en procesos depresivos y síndromes de pánico.

3 - MOTILIDAD GASTROINTESTINAL: PAPEL DE LA CCK EN SU CONTROL

3.1 - MOTILIDAD DEL ESOFAGO

Cuando no hay tránsito de alimento el cuerpo del esófago no presenta ningún tipo de motilidad y la musculatura está flácida, mientras que los esfínteres, tanto el superior como el inferior, presentan un tono de contracción más o menos constante. Tras la deglución aparece una secuencia de contracciones y relajaciones que se conoce como "peristalsis primaria", cuya consecuencia final es la propulsión del alimento desde el esfínter esofágico superior hasta el estómago. La distensión local del cuerpo esofágico puede provocar también contracciones propulsivas conocidas como "peristalsis secundaria" (Christensen, 1987).

La CCK participa en la modulación del tono del esfínter esofágico inferior, debido a la interacción con receptores de gastrina de esta área. En gato y humanos produce relajación de dicho esfínter (efecto nervioso) mientras que en la zarigüella produce contracción, por efecto directo sobre las células musculares (Goyal y Paterson, 1989; Papasova, 1989).

3.2 - MOTILIDAD GÁSTRICA

Las acciones de la CCK sobre la motilidad del estómago son complejas y tienen como finalidad principal la regulación del vaciamiento gástrico. Los efectos de la administración exógena o de la liberación endógena de CCK son diferentes según las áreas gástricas consideradas. Básicamente hay que diferenciar las acciones sobre fundus y cuerpo gástrico de aquellas producidas en antro y esfínter pilórico.

3.2.1 - Fundus y cuerpo gástrico

El fundus no presenta ni ondas lentas ni motilidad en forma de espigas de actividad superpuestas a la actividad lenta. El cuerpo gástrico presenta en su zona proximal las mismas características que el fundus mientras que en la zona media actúa como marcapasos, presentándose ya ondas lentas de propagación caudal, aunque no espigas de actividad. El músculo liso de estas áreas únicamente presenta cambios de tono, adaptativos a los cambios en el volumen intragástrico (Meyer, 1987).

La administración exógena de CCK tiene en fundus y cuerpo gástrico un efecto inhibitorio, produciendo descensos en el tono del músculo liso (Bertaccini *et al.*, 1973; Minami y McCallum, 1984). Estos efectos relajantes se manifiestan como descensos, dosis dependientes, de la presión intragástrica (Meyer, 1987; Raybould *et al.*, 1987; Raybould, 1991). Este efecto inhibitorio parece ser de origen nervioso y depender tanto del vago como de la inervación esplácnica, así cuando la inervación exógena se bloquea la CCK produce aumentos leves de la presión intragástrica que revelan un posible efecto directo del péptido sobre las células musculares y que en condiciones fisiológicas queda enmascarado por los efectos inhibitorios (Raybould *et al.*, 1987; Raybould y Taché, 1988). Estos efectos pueden ser revertidos mediante el uso de antagonistas específicos de la CCK (L364,718) (Raybould, 1991).

Efectos similares se observan también por la administración de gastrina o de análogos de la CCK, como la ceruleina (Valenzuela y Grossman, 1975; Raybould *et al.*, 1987).

3.2.2 - Antro pilórico

La motilidad antral es diferente en ayunas que en período postprandial, al menos en aquellas especies en las cuales la motilidad intestinal presenta patrones diferentes en estos dos estados. En período postprandial el antro presenta una actividad contráctil intensa de carácter propulsivo, originándose en la zona más distal del cuerpo gástrico y propagándose caudalmente hasta el esfínter pilórico. Esta motilidad favorece la transformación del componente

sólido del alimento en partículas de pequeño tamaño que fácilmente son evacuadas a través del píloro. Estas intensas contracciones antrales coinciden con contracciones del esfínter pilórico lo que favorece la mezcla del contenido gástrico produciendo reflujos y su trituración, a la vez que limita el tamaño de las partículas que pasan al duodeno (Ruckebusch *et al.*, 1981; Meyer, 1987). En las fases de ayuno, la motilidad antral se caracteriza por la presentación de fases de intensa actividad y corta duración seguidas de fase de quiescencia de larga duración (90-120 minutos). Estas fases de actividad son el origen de las fases III de los complejos mioeléctricos migratorios intestinales propios de las fases de ayunas (Meyer, 1987).

La CCK participa de forma fisiológica en la regulación de la motilidad antral (Morgan *et al.*, 1978). *In vivo*, la CCK tiene una actividad estimulante de carácter dosis-dependiente en el antro pilórico, aumentando la frecuencia de las contracciones antrales (Castresana *et al.*, 1978; Desvigne *et al.*, 1980; Kuwahara, 1986; Meyer, 1987). El efecto estimulante puede ir asociado a una reducción de la amplitud de las contracciones, debido probablemente a un reflejo inhibitorio de origen duodenal (que presenta también respuestas estimuladoras por acción de la CCK) que se transmite a través de vías neurales transpilóricas (Scheurer *et al.*, 1983a y b). La principal manifestación de estos efectos es el retraso del vaciamiento gástrico. La CCK actúa disruptiendo el patrón de motilidad en ayunas generando un patrón de actividad similar al del estado postprandial (Malagelada y Azpiroz, 1989).

In vitro, la CCK produce contracción de las células musculares antrales aisladas, en un rango efectivo de 10^{-9} a 10^{-12} M, hay además un aumento de la duración y amplitud del "plateau" de las ondas lentas (Meyer, 1987) y de la frecuencia y amplitud de las contracciones (Morgan *et al.*, 1978).

El mecanismo de acción de la CCK a nivel del antro pilórico ha sido muy discutido. Según Scheurer *et al.* (1983b) la acción de la CCK en la región antral es indirecta, a través del sistema nervioso intrínseco y está mediada por vías neurales no colinérgicas, aunque puede haber cierta acción debida a un efecto directo de la CCK en el músculo. Por el contrario, Kuwahara *et al.* (1986) y Rakovska *et al.* (1986) sostienen que la acción excitatoria de la CCK se realiza a través de la inervación colinérgica. Finalmente, otros autores, como Morgan *et al.* (1978), afirman que la acción de la CCK en el antro es

directa, a través de receptores localizados en la fibra muscular, sin ninguna implicación del sistema colinérgico.

3.2.3 - Esfínter pilórico

La motilidad del esfínter pilórico es difícil de estudiar y por ello, poco conocida *in vivo*. El tono del píloro es uno de los factores determinantes del flujo de contenido gástrico hacia el duodeno.

In vivo, la administración de CCK produce un aumento del tono del esfínter pilórico tanto en la especie humana como en la zarigüella, pero no en el perro. La CCK induce fuertes contracciones, tanto de tipo tónico como fásico, y de carácter dosis-dependiente, en el píloro de perro (Castresana *et al.*, 1978; Allescher *et al.*, 1989). Según Papasova (1989) este efecto parece ser de tipo neural, mediado por vías no adrenérgicas y no colinérgicas. Por el contrario, según han establecido Allescher *et al.* (1989) en el perro, la acción de la CCK en el píloro sería mixta, mediada por un receptor no neural (efecto directo sobre el músculo) y por receptores postganglionares induciendo la liberación de acetilcolina (mecanismo atropina dependiente y hexametonio independiente). López *et al.* (1991) describen descensos en la frecuencia de contracción pilórica en respuesta a la administración exógena de CCK, implicando en esta acción mecanismos tanto centrales como periféricos.

In vitro, la CCK tiene un efecto dosis dependiente, aumentando el tono basal y la frecuencia de las contracciones fásicas, aunque reduce su amplitud (Scheurer *et al.*, 1983b; Papasova, 1989). Este efecto estimulante de la actividad fásica parece deberse, al menos en parte, a un acción directa de la CCK sobre las células musculares. Sin embargo, los cambios que se observan en el tono basal estarían mediados por el sistema adrenérgico (Scheurer *et al.*, 1983b).

La administración de moléculas análogas de la CCK, como la ceruleína, produce, en el píloro, efectos muy similares a los de esta hormona, induciendo también respuestas de tipo contráctil (Bertaccini *et al.*, 1973).

3.2.4 - Vaciamiento gástrico

El vaciamiento del contenido gástrico hacia el intestino es un proceso modulado por mecanismos localizados a dos niveles: 1) mecanismos gástricos (básicamente de tipo estimulador) y 2) mecanismos intestinales (predominantemente inhibitorios) (Malagelada y Azpiroz, 1989). Estos mecanismos hacen que la tasa de vaciamiento gástrico hacia la luz intestinal dependa de un balance entre:

- Propulsión gástrica (que depende en gran parte del volumen intragástrico).
- "Feedbacks" negativos desencadenados a nivel intestinal por la llegada de nutrientes.

Las características físico-químicas del contenido gástrico son las determinantes del grado en que estos mecanismos estimuladores e inhibitorios se ponen en marcha para determinar el grado de vaciamiento (Malagelada y Azpiroz, 1989). Las características más importantes de la comida modificando este proceso son:

- a- Densidad energética: al aumentar ésta se reduce el flujo del estómago al intestino.
- b- Concentración osmótica y viscosidad de los líquidos.
- c- pH: los ácidos retrasan el vaciamiento gástrico.
- d- Volumen de la comida.
- e- Tamaño, densidad y viscosidad de las partículas sólidas.
- f- Productos derivados de la digestión: los productos de la digestión de lípidos, proteínas e hidratos de carbono inhiben el vaciamiento gástrico cuando se perfunden por vía intraduodenal. Para los lípidos este efecto inhibitorio se mantiene incluso cuando la perfusión se realiza a nivel del ileon.

Tras la ingestión de una comida normal, el balance entre todos estos factores es el determinante de la cinética del vaciamiento gástrico.

El proceso de vaciamiento gástrico ha sido especialmente estudiado para los líquidos y se sabe que depende de la diferencia en el gradiente de presión intragástrica y de presión intraduodenal así como de la resistencia que el píloro presenta al flujo transpilórico. En la rata, un volumen de 3 ml de solución salina fisiológica presenta un vaciamiento rápido en los primeros 2 minutos y una reducción posterior, hasta que a los 10 min. la tasa de vaciamiento es del 100% (Forster *et al.*, 1991). Comidas ricas en proteínas o en lípidos desplazan esta curva estándar, reflejando retrasos en diferente grado en el vaciamiento gástrico.

El control de la motilidad gástrica, y por lo tanto de su vaciamiento, implica la participación de mecanismos tanto nerviosos como humorales a diferentes niveles: control del sistema nervioso central, control a nivel del músculo liso (debido a las características electrofisiológicas de ciertas células que presentan despolarizaciones rítmicas, dando lugar a la aparición de un marcapasos), control a nivel del sistema nervioso intrínseco y extrínseco y control de tipo hormonal.

Según Forster *et al.* (1990 y 1991) tres mecanismos diferentes pueden mediar la regulación del vaciamiento gástrico de los líquidos:

- 1 - Mecanismo nervioso mediado por la liberación de polipéptido intestinal vasoactivo (VIP).

Este es el mecanismo por el cual las soluciones ricas en proteínas actúan retrasando el vaciamiento gástrico. Es un proceso mediado por la liberación de CCK. Esta hormona actúa sobre receptores específicos localizados en terminaciones vagales situadas en la pared gástrica, desencadenando un reflejo vago-vagal inhibitorio cuyo neurotransmisor final es el VIP. El VIP liberado actúa produciendo descenso en el tono de la fibra muscular lisa. Los datos sugieren que otras sustancias relacionadas con el VIP pueden estar también implicadas en estas respuestas (péptidos histidina isoleucina/valina, transmisores purinérgicos).

2 - Supresión del tono colinérgico de las fibras aferentes excitatorias vagales.

Es el mecanismo por el cual las soluciones hiperosmolares actúan retrasando el vaciamiento gástrico.

3 - Acción directa sobre el píloro.

Es el mecanismo por el cual los ácidos retrasan el vaciamiento. Los ácidos estimularían la liberación de CCK a nivel duodenal y ésta actuaría directamente sobre receptores localizados en el músculo pilórico. Apoyando esta hipótesis algunos autores han descrito la presencia de abundantes receptores para CCK en las fibras musculares del píloro.

Numerosos autores han descrito el papel de la CCK como regulador fisiológico del vaciamiento gástrico, produciendo un retraso del mismo, tanto por administración exógena como por estimulación de su liberación endógena (Debas *et al.* 1975; Yamagishi y Debas, 1978; Mongel y Koegel, 1984; Liddle *et al.*, 1986b; Keinke *et al.*, 1987; Green *et al.*, 1988). Aunque, según otros, la CCK liberada endógenamente no es suficiente para ejercer un control fisiológico de este proceso (Smith *et al.*, 1989).

El papel de la CCK en la regulación del vaciamiento gástrico se debe a su acción tanto en el área proximal del estómago (fundus y cuerpo) como en la región antropilórica (Yamagishi y Debas, 1978). Como ya hemos visto las acciones a estos dos niveles son radicalmente diferentes. La CCK induce estimulación de la motilidad de la zona antropilórica mientras que en el cuerpo y fundus gástrico sus efectos son básicamente de tipo inhibitorio produciéndose relajaciones de la fibra muscular lisa y descenso de la presión intragástrica. Los cambios en la presión intragástrica parecen determinar especialmente las variaciones en el vaciamiento del estómago. Según Dockray (1989b y 1991) la acción de la CCK a este nivel puede explicarse por un reflejo de tipo vago-vagal (Fig. 1.2). La CCK puede actuar sobre las fibras aferentes vagales de dos formas: directamente sobre receptores específicos de CCK o indirectamente a través de la estimulación motora del antro y píloro, lo que incrementaría la descarga de los mecanorreceptores de la zona. Estas dos hipótesis no son mutuamente excluyentes pero en la actualidad hay buenas evidencias (tanto de tipo electrofisiológico como por técnicas de

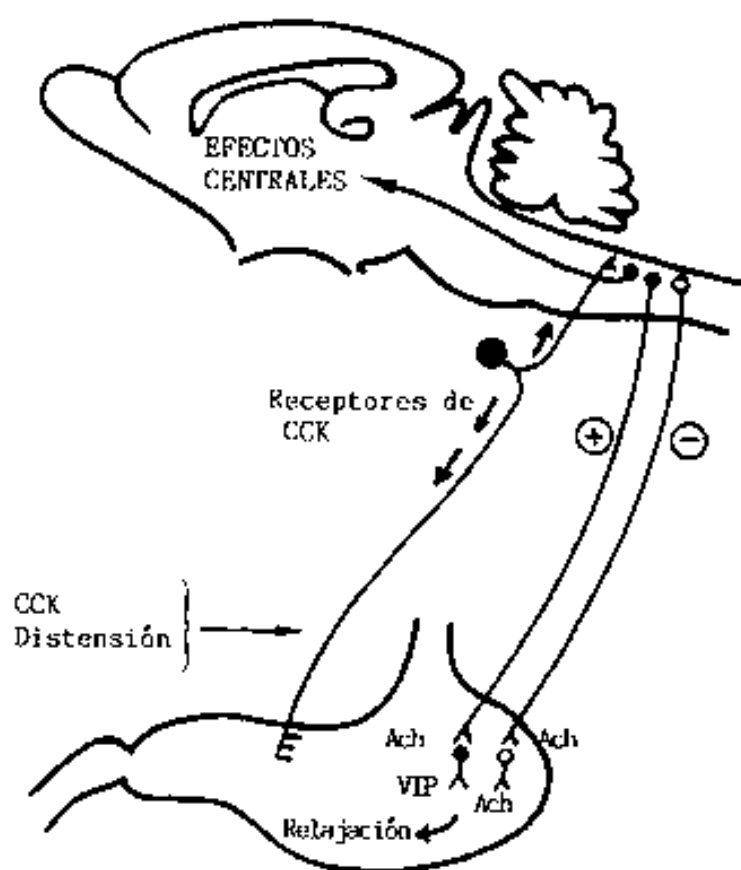


FIG 1.2 - Representación esquemática de las acciones de la CCK en las vías aferentes vagales. La estimulación de receptores de CCK en fibras aferentes vagales puede mediar acciones centrales de la CCK y actuar inhibiendo la motilidad del estómago y por lo tanto el vaciamiento gástrico. Esta última acción puede deberse a la inhibición refleja (-) de vías tónicas excitatorias o a una estimulación refleja (+) de vías inhibitorias, mediadas por VIP.

Ach, acetilcolina; VIP, polipéptido intestinal vasoactivo. (Modificado de Dockray, 1991).

autorradiografía) que apoyan una acción directa de la CCK sobre el vago, concretamente sobre mecanorreceptores gástricos de origen vagal. Esta acción produce la estimulación de vías eferentes vagales inhibitorias. El neurotransmisor final involucrado en este proceso sería el VIP. Recientes experiencias usando anticuerpos anti-VIP, para inhibir sus acciones endógenas, apoyan la participación de este neurotransmisor en la regulación del vaciamiento gástrico (Forster *et al.*, 1991).

Esta hipótesis de participación del VIP como mediador final en las respuestas inhibitorias a nivel gástrico ha sido cuestionada recientemente al descubrirse el papel del óxido nítrico (NO) como neurotransmisor putativo endógeno inhibitorio no adrenérgico y no colinérgico (NANC). Se ha visto que el NO participa en las respuestas de relajación adaptativa del estómago y que la inhibición de su producción endógena bloquea las acciones relajantes de otros neurotransmisores NANC, entre ellos el VIP (Desai *et al.*, 1991; Lefebvre *et al.*, 1992). Diferentes autores han demostrado la presencia de NO como cotransmisor inhibitorio NANC en el estómago de la rata, junto al VIP (Boeckxstaens *et al.*, 1991), en el gato (Barbier y Lefebvre, 1992) y en el cobaya (Kroese *et al.*, 1992). La presencia de NO como neurotransmisor NANC ha sido demostrada en otras áreas del tracto gastrointestinal tanto por técnicas morfológicas (Ekblad *et al.*, 1992; Furness *et al.*, 1992; Ward *et al.*, 1992a) como en estudios de funcionalidad. Así el NO participa en los mecanismos de control de la motilidad esofágica, pilórica (Allescher *et al.*, 1992), del intestino delgado (Toda *et al.*, 1990; Maczka *et al.*, 1992) y cólica (Hata *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1992b), estando implicado siempre en respuestas de tipo inhibitorio o de relajación de la musculatura lisa.

3.3- MOTILIDAD DEL INTESTINO DELGADO

La CCK parece participar de forma fisiológica en la regulación de la motilidad del intestino delgado. Sus acciones han sido ampliamente estudiadas en los mamíferos y en menor grado en las aves.

3.3.1 - Motilidad postprandial

En fase postprandial, la motilidad intestinal cíclica en forma de complejos mioeléctricos migratorios (MMCs) es reemplazada por un patrón de motilidad que se caracteriza por la presencia de una actividad eléctrica irregular de baja amplitud, más o menos continúa, que revela la presencia de contracciones musculares desorganizadas; a lo largo de todo el intestino. Es

una motilidad de baja propagación, similar a la que se presenta durante la fase II del MMC (Weisbrodt, 1987). Recientemente, Erhlein *et al.* (1992), han estudiado esta motilidad y han puesto de manifiesto su gran similitud con la fase II del MMC.

Se han realizado pocos estudios sobre el efecto de la CCK en la motilidad postprandial, pero parece que ésta participa de alguna forma en su regulación (Niederau y Karaus, 1991). El papel de la CCK endógena durante este período no se conoce totalmente. La administración de antagonistas específicos de la CCK en fase postprandial reduce de forma significativa la motilidad del intestino, lo que sugiere que esta hormona podría participar en los aumentos globales de actividad eléctrica que se observan postprandialmente (Thor *et al.*, 1988). Sin embargo, otros autores encuentran disminuciones de la actividad duodenal, en fase postprandial, debidas a la administración exógena de CCK, con disminución del número de contracciones propulsivas y aumento del número de contracciones estacionarias (Keinke *et al.*, 1987).

3.3.2 - Complejos mioeléctricos migratorios (MMC)

En ayunas la motilidad del intestino delgado se caracteriza por ser de tipo cíclico, en forma de complejos mioeléctricos migratorios (MMC) (Szurzewski, 1969). Esta motilidad ha sido descrita en las especies de mamíferos que ingieren comidas abundantes y poco frecuentes (perro, humanos, rata,...) durante los períodos interdigestivos y también en las especies cuyo patrón de ingesta es más continuado de forma permanente en períodos de ayunas y postprandiales. Numerosos autores han revisado las características de los MMCs (Weisbrodt, 1981, 1987). Los MMCs constan de tres fases que se diferencian según la actividad eléctrica relativa presente en cada una de ellas:

- Fase I - Fase de inactividad, se presentan ondas lentas sin descargas de actividad superpuestas.
- Fase II - Fase de actividad eléctrica irregular, algunas ondas lentas tienen espigas de actividad superpuestas (aproximadamente un 30% de

las ondas lentas se acompañan de contracción).

-Fase III- Fase de actividad eléctrica continua y de gran intensidad (todas las ondas lentas se acompañan de espigas de actividad superpuestas).

Algunos autores describen además una cuarta fase en el MMC (fase IV), como el período de transición entre la fase III de intensa actividad y la fase I de quiescencia. Los MMCs se originan a nivel del antro pilórico, región en la cual únicamente se distinguen claramente la fase I y la fase III, que se manifiesta como un frente de intensa actividad que se propaga caudalmente a lo largo de todo el intestino delgado.

Únicamente en la especie felina no se ha demostrado este patrón, mostrando tanto en período postprandial como en las fases interdigestivas una actividad desorganizada e irregular.

EL papel de la CCK en el control de la motilidad intestinal ha sido ampliamente estudiado durante los períodos interdigestivos. La CCK endógena no parece guardar ninguna relación con la actividad cíclica intestinal, al menos en las especies que sólo presentan MMCs en período de ayunas. Así los niveles endógenos de CCK no varían a lo largo del ciclo del MMC y los antagonistas específicos no alteran de manera significativa el patrón cíclico de motilidad (Thor *et al.*, 1988). En estas especies el MMC ha sido descrito como un fenómeno "todo o nada", con una dosis umbral de CCK a partir de la cual el patrón cíclico desaparece totalmente sin que se presente una gradación intermedia (Wingate *et al.*, 1978a y b). Aunque las dosis de CCK necesarias para producir este efecto disruptivo están dentro del rango fisiológico ($62 - 125 \text{ pmol/kg h}^{-1}$) (Schang y Kelly, 1981) esta hormona parece jugar un papel poco importante en la disrupción postprandial de los MMCs, aunque sí que puede participar de forma fisiológica en el aumento de la actividad motora intestinal que se observa después de la ingestión de alimento, como han demostrado en el perro Thor *et al.* (1988). La administración *i.v.* de CCK-8 (10^{-7} moles/Kg/h, en perro) produce disrupción del patrón de motilidad intestinal postprandial; desaparece la organización en MMCs produciéndose un aumento global de la actividad motora intestinal (aproximadamente un 30% de las ondas lentas intestinales presentan

contracción, en todas las áreas del intestino). El uso de antagonistas específicos de la CCK (L-364,718 y CR-1409) reduce la actividad intestinal inducida por la CCK pero no restaura el patrón de actividad tipo MMCs, aunque tras el tratamiento con antagonistas pueden aparecer motilidades tipo fase III migrando desde el duodeno hasta el íleon (Thor *et al.*, 1988). Algunos autores no describen el efecto de la CCK sobre el MMC como disruptivo y únicamente describen efectos moduladores en el mismo. Niederau y Karaus (1991) describen el efecto de la CCK sobre el MMC como modificador de la fase II (alarga su duración e incrementa su actividad eléctrica), estos autores consideran que las fases II son las más propulsivas del MMC y que por lo tanto la acción de la CCK favorecería el transporte de las secreciones biliares y pancreáticas a lo largo de todo el intestino.

Efectos similares se producen también por la administración exógena de gastrina, que en el mismo rango de dosis que la CCK produce una disrupción total del MMC, apareciendo en su lugar una motilidad de tipo postprandial (Weisbrodt *et al.*, 1974; Wingate *et al.*, 1978b; Thor *et al.*, 1988).

La estimulación motora intestinal debida a la administración exógena de CCK es de carácter dosis dependiente, alterando el patrón de motilidad propio del estado de ayunas y aumentando el porcentaje de ondas lentas con contracciones superpuestas, generando un patrón de motilidad de tipo postprandial (Mukhopadhyay *et al.*, 1977; Niederau y Karaus, 1991). Mientras que para algunos autores el papel fisiológico de la CCK en la regulación de la motilidad intestinal sería la estimulación de la actividad motora en fases postprandiales para otros estas acciones serían de tipo farmacológico más que fisiológico (Weisbrodt, 1987). Los efectos estimulantes han sido observados sobre todo en las regiones proximales del intestino delgado (especialmente en el yeyuno) y menos en el íleon, que parece ser especialmente resistente a esta hormona (Thor *et al.*, 1988; Wingate *et al.*, 1978a y b).

A diferencia de la mayoría de autores, algunos reportan la presencia de respuestas de tipo inhibitorio frente a la CCK. Giuliani *et al.* (1990), en experiencias *ex vivo* en rata, describen respuestas intestinales duales frente a la administración de CCK: dosis bajas de CCK (en rangos considerados fisiológicos, y que producen cambios en la presión intragástrica) presentan

respuestas de tipo excitatorio, mientras que a dosis altas se producen respuestas de relajación. De forma similar, Keinke *et al.* (1987) obtienen respuestas duodenales inhibitorias en perros conscientes.

Algunos autores han caracterizado el patrón de motilidad inducido por la CCK como de tipo propulsivo (Gutiérrez, 1974; Taché *et al.*, 1990), mientras que para otros lo que se observarían son incrementos en la actividad tipo fase II del MMC (Wingate *et al.*, 1978b).

Efectos estimulantes, de carácter dosis-dependiente, han sido observados también por numerosos autores mediante el empleo de técnicas *in vitro* (Baba *et al.*, 1990; Rakovska *et al.*, 1986).

Los mecanismos por los cuales la CCK y otros péptidos relacionados actúan alterando la motilidad gastrointestinal se producen básicamente por dos vías:

- 1 - A través de receptores específicos localizados en las células musculares. Estos receptores se pueden encontrar en todas las áreas intestinales y son mucho más sensibles en las zonas distales (íleon) que en las proximales. La estimulación de estos receptores produce respuestas contráctiles dosis-dependientes, que son antagonizables mediante el uso de antagonistas específicos (Grider y Makhlof, 1987; Berry *et al.*, 1991).
- 2 - A través de receptores neuronales. La CCK y péptidos relacionados producen una liberación dosis-dependiente de acetilcolina a través de la estimulación de receptores no nicotínicos (y por lo tanto no bloqueables por el hexametonio) (Sylvester *et al.*, 1973; Baba *et al.*, 1990). Estos efectos nerviosos son totalmente abolidos previo tratamiento con tetrodotoxina, lo que indica que los receptores específicos para CCK deben localizarse a nivel del soma neuronal (Sylvester *et al.*, 1973). Estos receptores se localizan mayoritariamente en la región ileal (Grider y Makhlof, 1987). Para otros autores el efecto de la CCK alterando la motilidad intestinal parece estar mediado por vías vagales (Taché *et al.*, 1990).

3.3.3 - Otros patrones de motilidad

Dosis elevadas de CCK-8 producen en el perro cambios motores relacionados con el vómito. La CCK genera, por un mecanismo de tipo "todo o nada", una contracción de gran amplitud que se propaga en sentido antiperistáltico y a alta velocidad desde las áreas más distales del intestino hasta el estómago. Este patrón de motilidad es similar al que aparece espontáneamente precediendo al vómito y que se conoce como "contracción gigante retrógrada" ("retrograd giant contraction" según la literatura anglosajona). A pesar de que esta motilidad, cuando se presenta espontáneamente, es de origen central y mediada por vías vagales, la acción de la CCK es de tipo periférico (no abolida por vagotomía o esplenotomía) y se produce a nivel del sistema nervioso entérico, estando mediado por vías colinérgicas (Lang y Sarna, 1989; Niederau y Karaus, 1991).

Se ha estudiado muy poco el papel de la CCK u otros péptidos de la familia gastrina-CCK en la motilidad intestinal en las aves. En el pavo, la CCK-8 (0.5 a 15 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, bolus *i.v.*) produce inhibición de la actividad gastroduodenal, con poco o nulo efecto sobre la motilidad ileal y cecal. Durante estos períodos pueden producirse ocasionalmente reflujos en el duodeno y en el íleon proximal (Savori *et al.*, 1981).

3.4- MOTILIDAD DEL COLON

Durante la mayor parte del tiempo, excepto durante los movimientos en masa que preceden al reflejo de defecación, el colon no muestra motilidad o ésta está muy reducida.

In vivo, la CCK-8 (1 $\mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$) es una potente estimuladora de la motilidad colónica en el perro, provocando contracciones de muy alta amplitud y con un patrón continuo. Estos efectos son inhibibles mediante el uso de antagonistas específicos de la CCK. Estos cambios motores parecen deberse a la liberación central de CCK y estar mediados por receptores CCK-A centrales (Gué y Buéno, 1991).

3.5- MOTILIDAD DEL SISTEMA BILIAR

Una de las funciones más ampliamente descritas de la CCK es la de inducir la contracción de la vesícula biliar. El efecto estimulante sobre la vesícula biliar es doble: 1) directo sobre las células musculares y 2) indirecto a través de vías nerviosas colinérgicas postganglionares (y por lo tanto antagonizable por atropina). Esta acción se acompaña, en algunas especies, de la relajación del esfínter de Oddi (humanos, perro, gato y cerdo), mientras que en otras (conejo, cobayo y zarigüella) se producen respuestas contráctiles (aumento de la fuerza y la frecuencia de las contracciones fásicas) (Behar y Biancani, 1989; Dodds *et al.*, 1989). El conjunto de estas acciones es reducir la resistencia al flujo biliar a través del esfínter de Oddi y aumentar la secreción de bilis a nivel duodenal (Ryan, 1987).

4 - ESTUDIO DE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL: ELECTROMIOGRAFIA

La motilidad gastrointestinal ha sido estudiada mediante una gran variedad de técnicas tanto *in vivo* como *in vitro* (Corazziari, 1982; Sanger y Bennett, 1982).

La electromiografía (EMG) ha sido una de las técnicas empleadas con mayor éxito en los estudios de la motilidad gastrointestinal *in vivo*. Es una técnica que ofrece una medida indirecta de la motilidad del tracto digestivo; está basada en la captación de la diferencia de potencial generado en el músculo liso mediante el uso de electrodos, su amplificación y posterior representación sobre papel o almacenamiento. A continuación se describen los aspectos fundamentales de la técnica electromiográfica.

4.1 - METODOS DE CAPTACION DE LA SEÑAL ELECTRICA

Un CAPTADOR es el soporte que permite la captación y transmisión hasta el sistema de amplificación de la diferencia de potencial que se genera en el músculo liso. La zona del captador en contacto directo con el músculo es el ELECTRODO. En EMG, a diferencia de los registros intracelulares en los que se trabaja con una única célula, hay que tener en cuenta que realmente se está registrando la media de los potenciales generados por el grupo de células musculares que se encuentran en la zona de acción del captador (Ruckebusch y Brady, 1982). Los electrodos empleados pueden ser de dos tipos (Bass, 1965a):

- 1- Bipolares - Se emplean dos electrodos implantados en la musculatura, registrándose la diferencia de potencial entre ambos.
- 2- Monopolares - En la musculatura hay implantado un único electrodo

mientras que el segundo se coloca en una zona eléctricamente neutra (zona isoelectrica).

El captador a elegir para un estudio electromiográfico depende del tipo de trabajo que se quiera realizar, la bibliografía consultada ofrece múltiples posibilidades.

4.1.1 - Captadores no invasivos

Son los utilizados en clínica y experimentación humana. Son captadores de superficie , que se localizan en la piel (Brown *et al.*, 1975; Myers *et al.*, 1984) o en la luz del tracto gastrointestinal (Tsuchida y Kimura, 1966; Fioramonti *et al.*, 1980).

Químicamente los tipos más usados son los de níquel/cromo (80/20) (Ruckebusch, 1970 y 1973), platino (Atobe *et al.*, 1980) o bien de plata/cloruro de plata (Eddine *et al.*, 1985).

4.1.2 - Captadores invasivos

Son los empleados en experimentación animal. Esta técnica supone la implantación crónica del captador en la pared gastrointestinal mediante intervención quirúrgica.

Los electrodos más empleados son los de níquel/cromo (Ni/Cr) (Ruckebusch, 1970), plata/cloruro de plata o acero inoxidable (Bunker *et al.*, 1967). El diámetro de los electrodos es variable según la especie animal en que se deseen implantar. Por debajo de 60 μm éstos son demasiado frágiles y por encima de los 120 μm la reacción fibrosa que generan es demasiado intensa y dificulta la correcta captación de la señal (Ruckebusch y Brady, 1982). Los electrodos de Ni/Cr (80/20 %) con un diámetro de 120 μm , según ha demostrado Jiménez (1991), son ideales para ser usados en la EMG de aves y, por lo tanto, son los que se han empleado en este trabajo.

Aunque las técnicas no invasivas ofrecen condiciones de trabajo más

"fisiológicas" las técnicas invasivas permiten registrar señales más claras y simultáneas en puntos muy alejados del tracto gastrointestinal durante mucho más tiempo (24 h sobre 24) y además permite emplear animales en semilibertad.

4.2 - AMPLIFICACION Y FILTRADO DE LA SEÑAL ELECTROMIOGRAFICA

La señal eléctrica captada por los electrodos tiene las siguientes características: 1) bajo voltaje (100-1000 μV) 2) baja impedancia y 3) baja frecuencia (0,5-30 Hz) (Ruckebusch y Brady, 1982). Su amplificación no supone ningún problema ya que los sistemas existentes actualmente permiten amplificarla entre 1.000 y 10.000 veces, obteniéndose señales de salida del orden de 1 V.

La señal electromiográfica posee una amplia banda de frecuencias, con significados biológicos distintos. El denominado COMPONENTE LENTO u ONDAS LENTAS tiene una baja frecuencia, mientras que las SALVAS DE POTENCIAL, asociadas a las contracciones musculares, tienen una alta frecuencia. Esta heterogeneidad obliga a que la señal electromiográfica deba ser filtrada de diferente forma según la banda de frecuencias que se quiera estudiar.

Las características funcionales de un filtro vienen determinadas por dos parámetros: frecuencia de corte y caída. Los filtros empleados en EMG son básicamente de tres tipos: 1) paso-altos, que actúan atenuando el componente de baja frecuencia, 2) pasa-bajos, que actúan atenuando los componentes de alta frecuencia y 3) pasa-bandas, resultan de la combinación de un pasa-altos y de un pasa-bajos y actúan amortiguando una banda seleccionada de frecuencias sin modificar el resto. La frecuencia de corte determina la frontera de frecuencias a partir de la cual se produce la atenuación de la señal. Cuando se pretende estudiar las salvas de potencial, y por lo tanto es preciso eliminar el componente lento, la frecuencia de corte del filtro pasa-altos debe situarse, según la bibliografía, entre los 10 y los 50 Hz (Bueno *et al.*, 1981; Summers *et al.*, 1982; Groh *et al.*, 1984). Por el

contrario, cuando se estudia el componente lento las frecuencias de corte deben situarse, para el estómago, entre los 0,024 y los 0,12 Hz (Eddine *et al.*, 1985).

Jiménez (1991) y Jiménez *et al.* (1992c) han empleado con éxito, en estudios de EMG en aves, un banco de filtros consistente en la asociación de un filtro pasa-altos (0,03 s de constante de tiempo, -6db) y de un pasa-bajos (50 Hz, -6db). La asociación de estos filtros permite la atenuación del componente lento sin que las salvas de potencial se vean modificadas. Este sistema de filtrado es muy adecuado, por lo tanto, para el estudio de las salvas de potencial y es el que se ha empleado en los registros EMG realizados a lo largo de este trabajo.

4.3 - METODOS DE ALMACENAMIENTO DE LA SEÑAL ELECTROMIOGRAFICA

En EMG se emplean básicamente tres sistemas de almacenamiento de datos:

- Registro sobre papel
- Registro sobre banda magnética
- Digitalización

4.3.1 - Registros sobre papel

Son habitualmente los más usados, acoplados a diferentes sistemas de inscripción que suelen permitir la selección de la velocidad del papel de acuerdo con las características de la señal que se quieren estudiar. El principal inconveniente de este sistema de almacenamiento es que sólo permite el análisis manual del registro, lo que implica la aparición de errores debidos a la subjetividad del investigador y requiere además una gran cantidad de tiempo de análisis. Actualmente el registro sobre papel se suele emplear como referencia, comparándose los resultados obtenidos mediante el empleo de técnicas computerizadas con el aspecto de los registros sobre papel (Pousse *et al.*, 1978 y 1979).

4.3.2 - Registros sobre banda magnética

Se usan como intermediarios entre la señal original y la digitalizada (Pousse *et al.*, 1978). Este sistema presenta dos ventajas: durante el registro no se consume tiempo de ordenador y la digitalización puede realizarse en un tiempo menor al real (De Ponti *et al.*, 1988; Pousse *et al.*, 1978; Wingate *et al.*, 1977).

4.3.3 - Digitalización de la señal electromiográfica

La posibilidad de digitalizar la señal electromiográfica almacenándola de una forma altamente estable y segura para su posterior tratamiento ha sido uno de los avances técnicos más importantes realizados en EMG. La digitalización es un proceso que implica su numerización mediante el empleo de un sistema de conversión y su almacenamiento en un sistema informático, lo que permite su posterior tratamiento mediante algoritmos predefinidos. El uso de este sistema de tratamiento y cálculo agiliza mucho el tiempo de procesado de la señal electromiográfica y elimina además la fuente de errores que supone el análisis manual de un registro.

La numerización de la señal analógica se realiza mediante placas de conversión analógico/digital (A/D), cuya función es convertir la señal electromiográfica analógica en un valor digital. El número de bits de estas placas es directamente proporcional a su resolución en amplitud. Así cuanto mayor sea éste más fiable será la conversión numérica de la señal. Una placa de n bits tiene 2^n puntos de resolución. Las resoluciones más usadas en EMG son de 7, 8, 10 y 12 bits. Jiménez (1991) y Jiménez *et al.* (1992c) han empleado una placa de 8 bites de resolución para el estudio del electromiograma del pollo, obteniendo muy buenas resoluciones en el proceso de conversión. Este sistema de digitalización es el que se emplea en este trabajo.

Un factor importante a tener en cuenta en el proceso de digitalización de la señal es la frecuencia de muestreo, que es la determinante de la resolución en tiempo. La frecuencia de muestreo se debe adaptar a la frecuencia de la señal que queremos registrar. Este principio básico en la

digitalización de cualquier tipo de señal viene enunciado por el **TEOREMA DE NYQUIST** - La frecuencia de muestreo para la correcta digitalización de una señal debe ser, al menos, el doble de la frecuencia de la señal que se pretende digitalizar. Una disminución en la frecuencia de muestreo por debajo de los límites marcados por el Teorema de Nyquist implica pérdida de la señal, pero un muestreo excesivo no supone una mayor información sino un consumo inútil de espacio en los sistemas informáticos y de tiempo de cálculo. La frecuencia de muestreo necesaria para el registro fidedigno del componente lento, de baja frecuencia, puede ser inferior o igual a 5 Hz (5 muestras/segundo) (Bardakjian y Sarna, 1980; Smallwood *et al.*, 1980). Sin embargo, para la digitalización de las salvas de actividad la frecuencia de muestreo debe situarse entre los 38 y los 125 Hz (De Ponti *et al.*, 1988; Pousse *et al.*, 1979). En el electromiograma de aves, Jiménez (1991) y Jiménez *et al.* (1992c) han demostrado que la captación de las ondas lentas se obtiene de forma fidedigna con un muestreo de 5 Hz (1 s de constante de tiempo) mientras que las salvas de potencial se reproducen adecuadamente con una frecuencia de muestreo de 50 Hz (0,03 s de constante de tiempo). A lo largo de este trabajo se ha registrado únicamente el componente rápido del electromiograma, correspondiente a las salvas de potencial, y por lo tanto se ha usado una frecuencia de muestreo de 50 Hz con una constante de tiempo 0,03 s.

4.4 - TRATAMIENTO DE LA SEÑAL ELECTROMIOGRAFICA

La digitalización y posterior almacenamiento de la señal permite el análisis de la misma mediante programas informáticos específicos. Los sistemas de análisis empleados en EMG pueden ser de 3 tipos: *análisis espectrales*, se emplean para la caracterización del componente lento; *análisis temporales*, caracterizan las salvas de potencial; e *integración del registro*, proporciona índices globales de actividad eléctrica a intervalos predefinidos de tiempo.

4.4.1 - Análisis espectral

Las técnicas de análisis espectral empleadas en EMG han sido revisadas por Linkens (1978). Según este autor se han empleado cinco metodologías diferentes para estos análisis:

- Transformada de Fourier

Se ha empleado para el estudio de ritmos biológicos, incluyendo la señal eléctrica gastrointestinal (Smallwood *et al.*, 1980; Eddine *et al.*, 1985). La aplicación de este algoritmo ha permitido a Jiménez (1991) y Jiménez *et al.* (1992c) caracterizar el componente lento presente en el electromiograma del estómago y del intestino del pollo.

- Transformada de Walsh

- Modelos de autorregresión

- "Phase-lock loop"

- "Raster scanning"

Jiménez (1991) y Jiménez *et al.* (1992c) han empleado además el algoritmo de Sokolove-Bushell para la caracterización del componente lento del electromiograma gástrico e intestinal del pollo. Este algoritmo, usado ampliamente en cronobiología, determina la frecuencia principal de la onda que se está analizando.

4.4.2 - Análisis temporal

Este análisis tiene por objetivo la caracterización y cuantificación de las salvas de potencial. Wingate *et al.* (1977) realizaron uno de los primeros intentos de detección de salvas de potencial en el tracto gastrointestinal, siguiendo un criterio de amplitud de la señal. A partir de este momento numerosos autores han propuesto sistemas de análisis del electromiograma, basados en diferentes parámetros característicos de las salvas de actividad y empleando señales registradas en diferentes sistemas (Pousse *et al.*, 1979;

Summers *et al.*, 1982, Groh *et al.*, 1984). Wingate *et al.* (1977) y posteriormente De ponti *et al.* (1988) han propuesto sistemas de análisis que permiten diferenciar las fases del MMC.

Jiménez (1991) y Jiménez *et al.* (1992c) han propuesto un sistema computerizado de análisis de la actividad eléctrica del tracto gastrointestinal que, aunque originalmente diseñado para el estudio del electromiograma del pollo, puede también usarse para estudios electromiográficos en mamíferos. Este sistema consta de 3 módulos:

- Módulo de calibración.

Crea un archivo de calibración a partir de una señal interna, de 100 μV , generada por el sistema de registro. La calibración se usa como referencia para análisis posteriores del registro.

- Módulo de detección de salvas de potencial.

Usa los datos del registro electromiográfico digitalizados y almacenados en el ordenador discriminando las fases de actividad o salvas de potencial (períodos del registro en los cuales se detectan fluctuaciones eléctricas) frente a las de reposo (períodos del registro sin fluctuaciones eléctricas). Este tratamiento crea un nuevo fichero de datos que conserva íntegras las fases de actividad mientras que las de reposo quedan reducidas a un código de duración. Este sistema reduce en gran parte la ocupación de los sistemas informáticos.

- Módulo de cálculo de parámetros del electromiograma.

Calcula, a partir de los ficheros de datos creados según el módulo de detección de salvas, los parámetros característicos del electromiograma: amplitud máxima y media y duración de las fases de actividad, duración de las fases de reposo, porcentaje de actividad y frecuencia de las salvas de potencial.

4.4.3 - Integración de la señal electromiográfica.

La integración de la señal electromiográfica se basa en la suma temporal de la actividad eléctrica generada en un área a intervalos de tiempo

preestablecidos. Este análisis ofrece, por lo tanto, una medida de la actividad eléctrica generada en un intervalo de tiempo definido. Este sistema permite analizar fácilmente registros de muy larga duración (Latour, 1973). Es una técnica muy útil para el estudio de los MMCs y ha sido usada con esta finalidad por numerosos autores. El sistema se ha intentado aplicar también para diferenciar salvas de potencial de corta y larga duración (Hachet *et al.*, 1985).

EL sistema de análisis computerizado propuesto por Jiménez (1991) y Jiménez *et al.* (1992c) para el análisis del electromiograma de pollo consta de un módulo que permite la integración de la señal digital registrada, según intervalos de tiempo variables, a determinar por el investigador. Este módulo de integración ha sido empleado para el análisis de algunos de parte de los registros obtenidos a lo largo de este trabajo.

5 - MOTILIDAD GASTROINTESTINAL EN LAS AVES

5.1 - ANATOMÍA FUNCIONAL DEL TRACTO DIGESTIVO DE LAS AVES

La anatomía del tracto digestivo aviar varía altamente de unas especies a otras (Duke, 1986b). En este punto se describirá brevemente la anatomía y la histología del tracto digestivo de la especie *Gallus gallus*.

La boca (*cavitas oralis*) conecta con el esófago (*esophagus*), que puede dividirse en tres porciones: cervical (*pars cervicalis*), divertículo esofágico (*saccus esophagealis*) y torácico (*pars thoracica*). El divertículo esofágico es un compartimiento que permite el almacenamiento de la ingesta antes de pasar al estómago para su digestión. Esta zona tiene una alta capacidad secretora y de distensión, lo que facilita el paso del alimento a su través.

El estómago (*gaster*) está dividido en dos compartimientos anatómica y funcionalmente diferenciados: el glandular (*pars glandularis*) (con una localización craneal) y el muscular (*pars muscularis*), unidos por una zona de transición denominada istmo (*isthmus gastris*). El compartimiento glandular es un saco fusiforme con funciones básicamente de secreción de pepsinógeno y ácido clorhídrico, por lo que funcionalmente equivaldría al área fúndica del estómago de los mamíferos. Histológicamente presenta una mucosa muy desarrollada con numerosas glándulas y una doble capa muscular, circular interna y longitudinal externa, entre las que se dispone el plexo mientérico.

El compartimiento muscular es un órgano discoide cuya función principal es la de trituración del alimento, y que por lo tanto equivale en sus funciones motoras al antro del estómago de los mamíferos. Está formado por la asociación de dos pares de músculos, diferenciables macroscópicamente, correspondientes a la capa circular de la musculatura (ya que la longitudinal ha desaparecido a este nivel) cuya actividad motora coordinada permite la trituración de la ingesta. Los músculos están organizados en oposición dos a dos: dos músculos "delgados" (músculos cráneo-dorsal y caudo-ventral)

(*musculus tenuis craniodorsalis* y *musculus tenuis caudoventralis*) y dos "gruesos" (músculos caudo-dorsal y cráneo-ventral) (*musculus crassus caudodorsalis* y *musculus crassus cranioventralis*). La unión entre ellos se produce mediante un complejo tendinoso (*centrum tendineum*). La mucosa de esta área está formada por un epitelio columnar secretor. Las células del mismo sintetizan y secretan una proteína, la coilina, que recubre interiormente el órgano formando una capa semicornea que lo protege de lesiones de tipo mecánico derivadas de la textura granular del alimento. La inervación intrínseca depende del plexo nervioso mientérico, que tiene una localización subserosal, debido a la ausencia de capa muscular longitudinal. La inervación extrínseca, al igual que en el compartimiento glandular, depende de ramas vagales y de fibras simpáticas perivasculares dependientes del ganglio celíaco.

En el intestino delgado se produce la digestión química y absorción de los nutrientes. Al igual que en los mamíferos, el intestino delgado puede dividirse en tres tramos: duodeno (*duodenum*), yeyuno (*jejunum*) e ileon (*ileum*); siendo su longitud total de aproximadamente 1 m. Este intestino, respecto al tamaño corporal del pollo, se considera de corta longitud. La parte inicial del duodeno, los primeros 3-4 mm, forman una zona que por las características macroscópicas de su mucosa puede diferenciarse del resto del área duodenal y que corresponde al píloro (*pylorus*) de las aves. El duodeno está formada por un asa (*ansa duodenalis*) que rodea al páncreas y puede dividirse en dos zonas: duodeno proximal o rama duodenal descendente (*pars descendens*) y duodeno distal o rama duodenal ascendente (*pars ascendens*). Yeyuno e ileon no están claramente diferenciados y algunos autores consideran como yeyuno la zona craneal al divertículo de la vesícula vitelina (*diverticulum vitellinum*) y como ileon a la zona caudal al mismo. Esta terminología es la que se seguirá en este trabajo. Otros autores hablan únicamente de yeyuno pre-divertículo de la vesícula vitelina y yeyuno post-divertículo de la vesícula vitelina para identificar estas dos áreas. Histológicamente, el intestino consta de mucosa, submucosa, muscular y serosa. La muscular, como en los mamíferos, es doble, constando de una capa circular interna y una delgada capa longitudinal externa. Tanto el plexo submucoso como el mientérico y el plexo muscular profundo están bien desarrollados. La inervación extrínseca depende del vago, del nervio esplácnico y del plexo pudendo.

El intestino delgado acaba en la unión ileo-ceco-cólica (*valva ileorectalis*), que es el punto de inicio del recto o colon (no diferenciados en las aves) (*rectum*) y de origen de los ciegos (*caecum*), que en las aves domésticas están muy desarrollados. El colon se extiende desde esta zona hasta la cloaca o proctodeum (*cloaca*). La cloaca consta de tres cámaras diferenciadas y agrupa al tracto digestivo (coprodeum), al urinario (urodeum) y al reproductor y comunica con el exterior a través del ano. (McLelland, 1979a y b) (Fig. 1.3).

5.2 - MOTILIDAD DEL TRACTO DIGESTIVO DE LAS AVES

5.2.1 - Deglución y actividad motora del esófago

Las aves toman el alimento con el pico, en la cavidad bucal se mezcla con la saliva y se deglute. La deglución se produce por efecto de la gravedad, al levantar el animal la cabeza, ya que el pollo no posee músculos encargados de la deglución.

El esófago cervical presenta contracciones peristálticas de rápida propagación que facilitan el paso del alimento hasta el divertículo esofágico (Hill y Strachan, 1975). Las características de estas contracciones pueden variar según la naturaleza del alimento que actúa como estímulo desencadenante de las mismas (Roche, 1980). En el divertículo esofágico la ingesta puede almacenarse antes de pasar al estómago. Esta zona presenta una motilidad rítmica cuando está vacía (de 1 a 1,5 contracciones/min) e irregular cuando está llena, formada por varias salvas de actividad sucesivas, que corresponde al vaciado de su contenido (Roche, 1973 y 1980; Hill y Strachan, 1975). Durante las fases de ayuno, cuando el estómago está vacío, el esófago se contrae cerrándose la entrada a este divertículo y entonces la ingesta llega directamente a la porción glandular del estómago. Este reflejo de cierre del divertículo esofágico puede ser de origen gástrico, dependiendo del grado de llenado del estómago (Hill y Strachan, 1975). El esófago torácico presenta una actividad motora rítmica y regular (1 contracción/min.) y está en relación con el grado de llenado del divertículo esofágico.

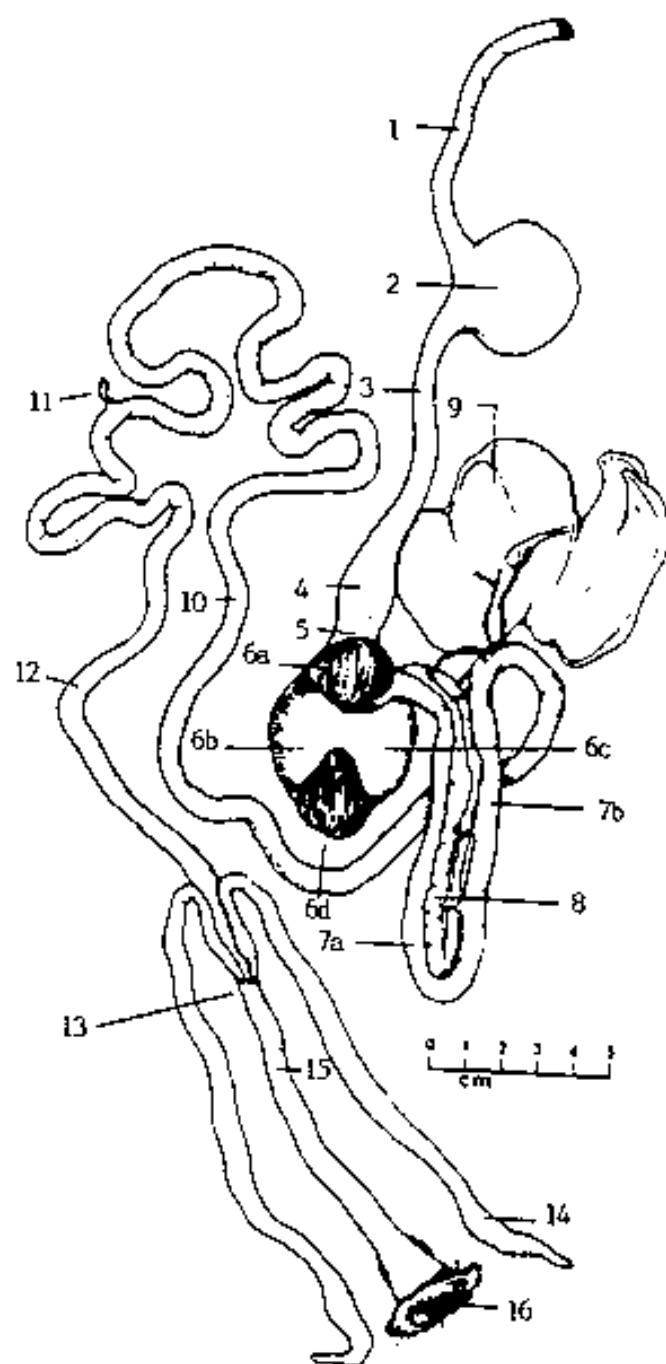


FIG 1.3 - Esquema del tracto digestivo del pollo (*Gallus gallus*) (modificado de Duke, 1986b).

- | | |
|----------------------------|--|
| 1- Esófago cervical | 7- Axa duodenal |
| 2- Divertículo esofágico | 7a- Rama descendente |
| 3- Esófago torácico | 7b- Rama ascendente |
| 4- Estómago: | 8- Páncreas |
| Compartimiento glandular | 9- Hígado y vesícula vitelina |
| 5- Istmo | 10- Yeyuno |
| 6- Estómago: | 11- Divertículos de la vesícula vitelina |
| Compartimiento muscular | 12- Íleon |
| 6a- Músculo cráneo-dorsal | 13- Unión ileo-ceco-cólica |
| 6b- Músculo caudo-dorsal | 14- Ciegos |
| 6c- Músculo cráneo-ventral | 15- Colon |
| 6d- Músculo caudo-ventral | 16- Cloaca |

El control nervioso de la motilidad esofágica y del divertículo esofágico depende básicamente de los nervios vagos. Así, su sección, ligadura o estimulación (uni o bilateral) altera en diferente extensión su actividad motora normal (Duke, 1986b).

5.2.2 - Actividad motora gastroduodenal

En el área gastroduodenal se produce la digestión química y mecánica de la ingesta, con el paso sucesivo del alimento de la porción glandular del estómago a la muscular y de ésta al duodeno. Este complejo proceso obliga a que la actividad motora de esta área deba estar altamente coordinada, determinando lo que se conoce como CICLO GASTRODUODENAL.

Las características de la motilidad gastroduodenal han sido estudiadas por numerosos autores mediante diferentes técnicas. Nolf (1937) describió por primera vez la presencia de una actividad motora coordinada entre el estómago y el duodeno del pollo. Dziuk y Duke (1974) describieron, mediante técnicas cineradiográficas, cinco fases en un ciclo gastroduodenal:

Fase 1- Inicio de la contracción de los músculos delgados del compartimiento muscular del estómago y cierre del istmo.

Fase 2 - Máxima contracción de los músculos delgados. Apertura del píloro y paso de la ingesta del compartimiento muscular al duodeno.

Fase 3 - Cierre del píloro y contracción del duodeno, lo que facilita el avance de la ingesta por la luz duodenal. Los músculos delgados dejan de contraerse y lo hacen los gruesos. El istmo se abre, lo que permite el reflujo de contenido del compartimiento muscular al glandular.

Fase 4 - Máxima contracción de los músculos gruesos.

Fase 5 - Contracción peristáltica del compartimiento glandular con el consiguiente paso de ingesta hacia el compartimiento muscular.

Este ciclo base puede presentar algunas variaciones. Dziuk y Duke (1974) describieron también una sexta fase constituida por una onda

originada en el yeyuno o en el íleon y que se propaga en sentido retrógrado hasta el duodeno y que permitiría el reflujo de contenido intestinal hasta el estómago. Esta actividad, denominada "reflujo duodeno-gástrico", tiene un frecuencia de entre 2 y 4 ciclos/h y coincide con disminuciones en la frecuencia de contracción de los compartimientos gástricos (Oguro e Ikeba, 1974; Sklan *et al.*, 1978; Duke, 1982). Otras modificaciones de este ciclo de base fueron propuestas por Roche (1973), que describió ciclos especiales para el vaciamiento del estómago, de intercambio entre el compartimiento muscular y el duodeno, de reflujo entre el compartimiento muscular y el glandular y de avance del alimento del compartimiento glandular al muscular.

El ciclo de base de Dziuk y Duke (1974) se correlaciona perfectamente con los estudios electromiográficos realizados posteriormente (Duke, 1982; Jiménez, 1991), que revelaron la siguiente alternancia de contracciones:

- 1 - Contracción de los músculos delgados del compartimiento muscular.
- 2 - Contracción duodenal.
- 3 - Contracción de los músculos gruesos del compartimiento muscular.
- 4 - Contracción del compartimiento glandular.

Esta secuencia se presenta con una frecuencia media de 3 ciclos/min en el pavo (Duke, 1982), 3-3,5 ciclos/min en el pollo broiler (Jiménez, 1991); 2,5-4,9 ciclos/min en la gallina ponedora (Roche y Decerprit, 1977; Jiménez, 1991) y 0,7-1,9 ciclos/min en los machos de gallina ponedora (Roche y Ruckebusch, 1978). La actividad del área gastroduodenal es muy constante, sin embargo diferentes factores pueden actuar modificándola:

- 1 - El ayuno reduce la frecuencia y la ingesta la aumenta (Roche, 1973).
- 2 - Un alimento de textura granular aumenta la frecuencia y uno harinoso la reduce (Roche, 1974; Roche y Ruckebusch, 1978).
- 3 - Ritmo circadiano endógeno. Una fase de inhibición gástrica aparece unas 3 h. antes del inicio del período oscuro y otra unas 2 h. antes del

- inicio del período de luz (Roche, 1973; Roche y Decerprit, 1977; Duke, 1982).
- 4 - Fase cefálica de la ingesta, durante la cual la visión del alimento incrementa la frecuencia gástrica (Chaplin y Duke, 1988).
 - 5 - Fase gástrica, durante la cual, la presencia de alimento en el estómago aumenta aún más la frecuencia gástrica (Chaplin y Duke, 1988).
 - 6 - La estimulación vagal puede producir hiperactividad gástrica y duodenal (Nolf, 1937; Roche, 1973; Roche y Decerprit, 1977).
 - 7 - La acetilcolina (0,5-5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) aumenta la frecuencia y la amplitud de las contracciones gástricas (Roche y Decerprit, 1977).
 - 8 - La atropina (0,1 mg/kg) reduce la frecuencia de contracción gástrica (Roche, 1973).
 - 9 - La vagotomía reduce la frecuencia de contracción en un 75% (Roche y Decerprit, 1977), altera el ritmo circadiano (Roche y Ruckebusch, 1978) y produce descoordinación del ciclo de base (Chaplin y Duke, 1988).
 - 10 - La puesta reduce la frecuencia gástrica (Roche y Decerprit, 1977; Shimada, 1986).
 - 11 - Los lípidos, los aminoácidos y las soluciones hipertónicas o ácidas inhiben la motilidad gástrica. Los lípidos y las soluciones hipertónicas producen además fases de reflujo duodeno-gástrico (Duke y Evanson, 1972; Duke *et al.*, 1972).
 - 12 - Diferentes hormonas (polipéptido pancreático aviar o CCK) reducen la actividad gástrica y alteran la coordinación gastroduodenal (Savory *et al.*, 1981; Duke, 1982).
 - 13 - La distensión mecánica duodenal produce inhibición de la actividad gástrica (Duke, 1972).

En el estómago de las aves, los estudios electromiográficos revelan la presencia de una actividad de alta frecuencia que corresponde a las salvas de potencial, que están correlacionadas con la contracción muscular. Estas salvas de potencial han sido estudiadas por numerosos autores. Sin embargo, la presencia de un ritmo eléctrico de base u ondas lentas en el electromiograma del estómago ha sido descrita recientemente (Jiménez, 1991; Jiménez *et al.*, 1992c). Esta actividad de control presenta una frecuencia de 1 a 6 ciclos por minuto y son ondas que se acompañan siempre de salvas de potencial superpuestas. Durante el ciclo gastroduodenal, muestran la misma frecuencia en todos los compartimientos gástricos y en el duodeno, lo que explicaría la perfecta coordinación de esta área. Su génesis (neurogénica o miogénica) y su punto de origen no se conocen totalmente.

Las salvas de potencial registradas en el compartimiento glandular tiene una amplitud media de 260 μ V y duran unos 6 segundos mientras que las del compartimiento muscular tienen una amplitud de 500 μ V y constan de 10-15 espigas sucesivas (Roche, 1973; Roche y Ruckebusch, 1978). En otras especies de aves, como el pavo, estos valores son ligeramente diferentes (Duke, 1982).

Las salvas de actividad registradas a nivel duodenal pueden ser de cuatro tipos diferentes (Roche, 1973 y 1974; Roche y Ruckebusch, 1978):

- 1 - Salvas aisladas o monofásicas - Son salvas acopladas al ciclo de contracción del estómago y formadas por una sola espiga, tienen una alta velocidad de propagación (20 cm/segundo) y una corta duración (1-1,5 segundos).
- 2 - Salvas en series o polifásicas - Son salvas acopladas también al ciclo de base pero formadas por varias espigas sucesivas. Su duración es mayor a las monofásicas pero se propagan a la misma velocidad. La relación salvas polifásicas:monofásicas es variable y puede oscilar entre 1:1 y 4:1 (Jiménez, 1991; Jiménez *et al.*, 1993a).
- 3 - Salvas antiperistálticas aisladas - están formadas por una secuencia de 10-14 salvas con componentes que se propagan retrógradamente y que aparecen de 3 a 9 veces al día. Este tipo de actividad coincide con una

inhibición del estómago y corresponde a fases de reflujo duodeno-gástrico. Ocasionalmente pueden observarse salvas aisladas de tipo antiperistáltico, 4 a 6 por hora, que corresponden también a reflujos duodeno-gástricos.

- 4 - Salvas gastro-independientes - Son series de salvas de larga duración (3-10 min.) que no están coordinadas con el ciclo gástrico y se acompañan de una reducción de la frecuencia gástrica. Son actividades de origen duodenal que aparecen entre 7 y 8 veces al día, en forma de un frente organizado de intensa actividad eléctrica que se propaga caudalmente a baja velocidad (2,5-5 cm/min). Estas actividades presentan marcadas similitudes con las fases III de los MMCs y actualmente se consideran como tales (Jiménez *et al.*, 1992b).

La presencia de ondas lentas en el duodeno de las aves se conoce desde hace tiempo. Duke (1982) describe la presencia de este tipo de actividad en el duodeno de pavos aunque, según este autor, ésta no tendría una función de marcapasos de la motilidad duodenal. Roche y Ruckebusch (1978) describen la presencia de un componente lento irregular, y muy diferente del hallado por Duke (1982) en el pavo, en el intestino de la gallina. Recientemente Jiménez (1991) y Jiménez *et al.* (1992c) han caracterizado el componente lento presente en el duodeno del pollo. Este componente eléctrico de control sería doble: 1) una actividad de entre 1 y 6 ciclos/min que correspondería a las ondas lentas de origen gástrico a través de las cuales, probablemente, se coordina el ciclo gastroduodenal y 2) una actividad de control, con una frecuencia de 20 a 30 ciclos/min que se revela durante la aparición de fases III duodenales del MMC, coincidiendo con descensos de la actividad gástrica.

5.2.3 - Actividad motora del yeyuno y del íleon

Según Roche (1973) la motilidad del yeyuno y del íleon de las aves es muy similar a la del duodeno. Sin embargo, Duke *et al.* (1975b) describen en estas zonas del intestino de pavo unas ondas lentas muy prominentes con una frecuencia de 6 ciclos/min muy similares a las descritas en el duodeno. Posteriormente Roche y Ruckebusch (1978) describieron la presencia de

ondas lentas irregulares y de alta frecuencia (25 ciclos/min) que sólo aparecían en intervalos de 30 a 90 segundos en esta zona del intestino de la gallina.

Las salvas de potencial que se registran en yeyuno e íleon pueden ser de dos tipos (Roche, 1974):

- 1 - Salvas de corta duración y propagación rápida (20 cm/s), correlacionadas con el ciclo gástrico y que pueden ser peristálticas o antiperistálticas.
- 2 - Salvas prolongadas u ondas independientes, de larga duración (4-7 min) con una propagación muy lenta (1 cm/min).

Recientemente, se ha descrito la presencia, al igual que en el intestino de los mamíferos, de MMCs en el intestino de las aves. Clench *et al.* (1989) describieron la presencia de MMC en cuatro especies diferentes de aves, entre ellas la gallina. Según estos autores los MMCs se registrarían únicamente a nivel de yeyuno e íleon, estarían presentes tanto en ayunas como en estado postprandial (al igual que en aquellas especies de mamíferos acostumbrados a comidas frecuentes y de pequeño volumen) y presentarían la misma organización en tres fases descrita en los mamíferos. El MMC aviar tendría una periodicidad de aproximadamente 1 h (60 - 80 min) y la fase III migraría aboralmente a muy baja velocidad (0,58-0,62 cm/min). Posteriormente, Mueller *et al.* (1990) han confirmado la presencia de MMCs en el íleon de pavo pero no han podido registrar esta actividad en otras áreas del intestino delgado. Jiménez *et al.* (1992b) han caracterizado el MMC del pollo y han estudiado los mecanismos de control del mismo (inervación vagal y papel de los opioides endógenos y exógenos):

- El MMC es más corto en el intestino proximal que en el distal, lo que sugiere que hay MMCs que no migran a lo largo de todo el intestino.
- El ayuno acorta la fase II y alarga la I, sin cambiar la duración total de MMC.
- La velocidad de migración es mayor en el intestino proximal que en el distal.

- La ingestión de alimento reduce la velocidad de migración de la fase III.
- Las fases III pueden ser inducidas mediante la infusión exógena de opioides (Jiménez *et al.*, 1992a y 1993b)
- Los opioides endógenos participan en la génesis y propagación del MMC (Jiménez *et al.*, 1993b).

Jiménez *et al.* (1992b) han estudiado también la relación entre las ondas duodenales gastro-independientes descritas por Roche (1974) y Roche y Ruckebusch (1978) y los MMCs, presentando buenas evidencias por las cuales este tipo de actividades duodenales deben ser consideradas como fases III del MMC.

5.2.4- Actividad motora cecal

Según Duke *et al.* (1983), los ciegos del pavo presentan dos tipos de contracciones: 1) contracciones menores, asociadas a salvas de potencial de baja amplitud y una frecuencia de 2,6 por min; corresponden a movimientos de mezcla del contenido cecal y 2) contracciones mayores, son de tipo propulsivo y una frecuencia de 1,2 por min; estas contracciones pueden ser antiperistálticas o peristálticas, coincidiendo entonces con el vaciamiento de los ciegos (Duke *et al.*, 1980).

En la gallina, Fargeas *et al.* (1963), mediante el empleo de balones intracecales, describen tres tipos de contracciones: 1) contracciones de primer orden, asociadas a la defecación; 2) contracciones de segundo orden y 3) contracciones de tercer orden, asociadas a cambios de tono de la pared.

El vaciamiento de los ciegos es un proceso complejo que implica cambios no sólo en la motilidad cecal sino también en la motilidad del ileon y del colon. Aunque la motilidad del ciego derecho y del izquierdo no está coordinada, el vaciado se produce en ambos de forma simultánea y puede desencadenarse por un reflejo extrínseco (Roche, 1974; Lai y Duke, 1978; Duke *et al.*, 1983). El llenado cecal es un proceso pasivo y continuo que implica también participación ileal y cólica (Fenna y Boag, 1974; McNab,

1973), en la gallina pueden participar en este proceso las salvas antiperistálticas descritas por Roche (1974).

Los ciegos del pavo presentan un ritmo eléctrico de base (Duke *et al.*, 1980) que parece no tener importancia como marcapasos de la motilidad cecal (Duke *et al.*, 1983). Una actividad similar, muy irregular, se ha descrito en los ciegos de la gallina (Roche y Ruckebusch, 1978).

5.2.5- Actividad motora cólica

En el pavo, Lai y Duke (1978) han descrito la presencia de movimientos antiperistálticos constantes, son contracciones originadas en el coprodeo que se desplazan retrógradamente hasta la unión íleo-ceco-cólica. Esta motilidad antiperistáltica se debe a contracciones de baja amplitud correlacionadas con ondas lentas de bajo voltaje y de frecuencia creciente en sentido distal. Puede observarse además la presencia de contracciones de mayor amplitud, de tipo peristáltico, asociadas a ondas lentas de alto voltaje y de baja frecuencia (2,76-2,83 ciclos/min) (Lai y Duke, 1978; Duke *et al.*, 1983).

La motilidad cólica antiperistáltica tiene como objetivo retener las heces y absorber el agua presente en ellas, mientras que los movimientos peristálticos coinciden con la defecación (Lai y Duke, 1978; Roche y Ruckebusch, 1978). Además, la unión distal de los tractos digestivo y urinario, junto a la presencia de movimientos antiperistálticos a este nivel, permite absorber el agua procedente de los uréteres.

6 - LA CCK EN LAS AVES

La presencia de CCK no ha sido determinada inequívocamente en el tracto gastrointestinal de las aves aunque hay buenas evidencias de la misma. Los primeros intentos de demostrar la presencia de péptidos de la familia gastrina-CCK en el tracto gastrointestinal de las aves son de tipo morfológico.

Polak *et al.* (1974) realizaron estudios inmunohistoquímicos investigando la presencia de células endocrinas para diferentes péptidos en el tracto gastrointestinal del pollo y de la codorniz. Entre los anticuerpos usados emplearon uno específico para gastrina humana y otro para ceruleína, observando células con inmunorreactividad de tipo gastrina y ceruleína en todas las regiones del tracto gastrointestinal excepto en el compartimiento glandular del estómago y en los ciegos. Posteriormente otros autores han realizado estudios inmunológicos (inmunohistoquímica, radioinmunoensayo (RIA), etc.) y cromatográficos tendientes a determinar la presencia de ambos péptidos, gastrina y CCK, en las aves. Larsson y Rehfeld (1977), empleando anticuerpos específicos para gastrina, demostraron la presencia de un péptido tipo gastrina confinado a la región pilórica del pollo.

Dockray (1979b), empleando un anticuerpo para gastrina-CCK (L48) y diferentes anticuerpos específicos para gastrina, determinó, mediante cromatografía y RIA, la presencia de factores tipo gastrina-CCK en piloro, yeyuno y cerebro de pavo. El factor pilórico determinado no parecía ser ni gastrina ni CCK aunque tenía un extremo carboxiterminal semejante, pero no idéntico, al gastrina-CCK de los mamíferos.

Rawdon y Andrew (1981) y Rawdon (1984) abordaron nuevamente el problema realizando estudios inmunohistoquímicos, en pollos inmediatamente tras la eclosión, con anticuerpos específicos para el extremo carboxiterminal común de la gastrina-CCK (L48), específicos frente a ceruleína y específicos frente a la CCK-33, realizando también bloqueos de los anticuerpos con diferentes fragmentos de la molécula de CCK. Los resultados obtenidos sugerían la presencia, en el ileon de pollo, de células endocrinas conteniendo

factores tipo CCK con secuencias, fuera del extremo carboxiterminal de la molécula, semejantes a la CCK porcina; mientras que en el píloro las células reactivas parecían contener un péptido tipo gastrina. Estos resultados sugerirían indirectamente la presencia de un péptido tipo CCK, con un tamaño molecular mayor a la CCK-8 de los mamíferos, en la región ileal del intestino de pollo y de un péptido tipo gastrina confinado a la región pilórica.

Shulkes *et al.* (1983) estudiaron, mediante RIA, la distribución de diferentes péptidos reguladores, entre ellos la gastrina y la CCK, en el tracto digestivo y en el sistema nervioso central del pollo, mediante técnicas de RIA. Las mayores concentraciones de gastrina-CCK fueron detectadas en cerebro, compartimiento muscular del estómago, íleon, colon, ciegos y cloaca. La caracterización molecular por cromatografía indicó la presencia de una molécula semejante a la CCK-8 en el cerebro mientras que en el compartimiento muscular del estómago se encontró una molécula semejante a la gastrina-17.

En 1984 Vigna estudió, en el pollo, la presencia de estos péptidos mediante RIA, bioensayo y técnicas de unión a receptores. Este autor aisló un producto tipo CCK-8 del cerebro, y un producto tipo gastrina de la región pilórica (que era capaz de estimular la secreción ácida gástrica en modelos biológicos de mamíferos). Los intentos de extraer péptidos gastrina-CCK de otras áreas del intestino (duodeno y yeyuno) fueron fallidos.

Paralelamente a estos estudios, diferentes autores han estudiado la presencia de péptidos tipo gastrina-CCK en otras especies de aves. La gastrina se ha determinado en la región pilórica de la codorniz (Yamada *et al.*, 1979) y del faisán (Zhou y Li 1987a y b), en el píloro e intestino de la paloma (Saito *et al.*, 1989), en el píloro, compartimiento muscular del estómago e intestino del pato (Okamoto *et al.*, 1980) y en el intestino del avestruz (Bezuidenhout y Van Aswegen, 1990). Lucini y Castaldo (1992) han estudiado la distribución de la gastrina y de la CCK en el intestino de pato, usando anticuerpos específicos para CCK y para gastrina de pollo; llegando a la conclusión de que en esta especie no puede hablarse de la presencia de dos poblaciones celulares diferenciadas, una para la CCK y otra para la gastrina, sino únicamente de uno ó más péptidos que presentan el pentapéptido carboxiterminal común de la familia gastrina-CCK.

Recientemente Fan *et al.* (1987) han aislado y secuenciado, a partir del cerebro de pollo, un octapéptido con una secuencia aminoacídica idéntica a la CCK-8 de los mamíferos, confirmando la presencia, ya anteriormente sugerida, de la CCK en el sistema nervioso central de las aves. Sin embargo, hasta el momento, nadie ha determinado de forma fidedigna la presencia de CCK-8 o de otras formas moleculares de esta hormona en el tracto gastrointestinal del pollo.

Rideau y Mongin (1983) intentaron determinar infructuosamente la presencia de gastrina en el suero de pollo mediante técnicas de RIA, concluyendo que esta hormona no podía ser determinada en sangre. Posteriormente Dimaline *et al.* (1986) y Dimaline y Lee (1990) aislaron un péptido a partir del antro de pollo que presenta una estructura tipo CCK pero una actividad biológica tipo gastrina. Estos mismos autores han producido anticuerpos específicos frente al decapeptido carboxiterminal de esta molécula (L293), que se han usado en la valoración de la misma por técnicas de RIA, tanto en tejidos como en plasma (Dimaline *et al.*, 1986; Dimaline y Lee 1990; Campbell *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1992). Sin embargo, nadie ha empleado, hasta el momento, este anticuerpo específico para realizar una caracterización morfológica de las células productoras de gastrina en el tracto digestivo del pollo.

Yang *et al.* (1989b) y Furuse *et al.* (1990) han empleado un anticuerpo obtenido frente a la fracción amino-terminal de la CCK-8 para valorar, mediante RIA, la presencia específica de CCK en el plasma de pollo. Mediante el empleo de este anticuerpo estos autores han determinado unos valores basales de CCK en el plasma de pollo de aproximadamente 6 pg/ml. Estos autores han estudiado también las propiedades estimulantes de ciertos componentes de la dieta sobre la liberación de CCK. Así, diferentes aminoácidos incorporados en la dieta (valina, arginina o fenilalanina) incrementan los niveles de CCK plasmática hasta niveles de entre 7 y 8 pg/ml (Yang *et al.*, 1989b). No se han realizado otras investigaciones sobre la presencia de CCK en el plasma del pollo ni sobre los factores que podrían actuar estimulando la liberación de esta hormona y la probablemente baja especificidad del anticuerpo usado en estos estudios no permite llegar a conclusiones ciertas sobre la naturaleza de la CCK circulante en las aves. Se sabe que algunos de los factores que en los mamíferos actúan liberando CCK,

como los lípidos (Maton, 1982; Eysselein *et al.*, 1984b; Jansen y Lamers, 1987; Cantor, 1989), modifican el tránsito gastrointestinal en las aves (Mateos y Sell, 1981 y Mateos *et al.*, 1982) pero estos efectos motores no se han correlacionado con estudios en los que se valore comparativamente el efecto de los lípidos y de la CCK.

La presencia de receptores específicos para CCK en las aves tampoco ha sido estudiada. Recientemente, Campbell *et al.* (1991) han estudiado el control de la secreción pancreática en el pavo y han observado que los efectos de la CCK sobre la misma no son antagonizables por el antagonista de los receptores CCK-A L264,718 (altamente específico en la antagonización de los efectos pancreáticos de la CCK en los mamíferos (Woodruff y Hughes, 1991)). Resultados similares se han hallado, *in vitro*, en íleon de pollo, sistema en el cual el antagonista L264,718 es inefectivo antagonizando las respuestas excitatorias debidas a la CCK y sobre el que el antagonista CCK-B L365,260 es sólo parcialmente activo. Sin embargo, ambos productos son capaces de antagonizar parcialmente las acciones excitatorias de la CCK sobre la vesícula biliar, *in vivo* (Fernández *et al.*, 1992). Estos resultados sugieren que, como en los mamíferos, en las aves podrían existir varios tipos de receptores de CCK pero que serían estructuralmente diferentes a sus homólogos en los mamíferos.

Las investigaciones de tipo funcional sobre el papel biológico de los péptidos de la familia gastrina-CCK en el tracto gastrointestinal de las aves se han desarrollado de forma paralela a los estudios de tipo morfológico. Angelucci y Linary (1970) y Angelucci *et al.* (1970) demostraron que el análogo de la CCK, ceruleína, es un potente estimulante de la secreción gástrica, biliar y pancreática exocrina en el pollo. Posteriormente Burhol (1971, 1973 y 1974) estudió el efecto de la administración exógena de CCK sobre la secreción gástrica, mostrando que, en las aves, esta hormona es un agonista total de la secreción ácida y parcial de la de pepsinógeno (efectos contrarios a los observados por administración de gastrina). Varios autores han demostrado que la CCK puede participar en la regulación de la secreción pancreática exocrina en las aves; así la administración exógena de CCK o de su análogo ceruleína produce, en el pollo y en el pavo, respuestas pancreáticas muy semejantes a las observadas en los mamíferos; aumento del flujo de secreción y del contenido protéico (Dockray, 1975; Dimaline y

Dockray, 1979; Okumura *et al.*, 1986; Yang *et al.*, 1989a; Campbell *et al.*, 1991). Junto a estas acciones secretoras, Solomon *et al.* (1986) han puesto de manifiesto una acción trófica de la CCK en el páncreas de pollo, similar a la descrita en los mamíferos.

Algunos autores han estudiado también el papel de la CCK en la ingesta en las aves, proponiendo una participación de la misma como factor de saciedad. Este tema ha sido recientemente revisado por Denbow (1988). Campbell *et al.* (1992) han propuesto a la gastrina de pollo como un factor endógeno regulador de la ingesta en esta especie.

Las acciones de los péptidos gastrina-CCK sobre la motilidad gastrointestinal en las aves han sido muy poco estudiadas. En el único estudio realizado sobre este tema, en pavo y pollo, la administración *i.v.* de CCK-8 (0,5, 5 y 15 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) produjo una inhibición dosis-dependiente de la motilidad gastroduodenal, con un pobre o nulo efecto sobre la motilidad ileal y cecal (Savory *et al.*, 1981). En animales en ayunas, los efectos observados fueron todavía menores. En el mismo trabajo, estos autores, describen la presencia de reflujos intestinales inducidos por la CCK a nivel del duodeno y del ileon proximal. Los efectos sobre la motilidad intestinal, *in vivo*, de otras formas moleculares de CCK y de otros péptidos de la familia gastrina-CCK y los mecanismos de acción implicados en estas respuestas no han sido estudiados.

II- OBJETIVOS

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, y que se presenta en la introducción, la biología de la hormona gastrointestinal CCK, tanto en sus aspectos morfológicos como funcionales, ha sido ampliamente estudiada en los mamíferos. Sin embargo, a pesar de su interés comparativo, estos estudios son muy escasos en las aves.

Varios autores han estudiado la presencia y la distribución de los péptidos gastrina-CCK en las aves, tanto en el tracto digestivo como en el sistema nervioso central. La presencia de factores semejantes a la gastrina-CCK en el tracto gastrointestinal del pollo y otras especies de aves ha sido demostrada mediante técnicas inmunológicas y cromatográficas. A pesar de ello, todavía no ha sido determinada de forma concluyente la presencia de CCK a nivel intestinal en el pollo y la presencia de gastrina ha sido confirmada muy recientemente. A partir de la descripción de la gastrina de pollo no se han realizado nuevos estudios de tipo morfológico para demostrar si los factores gastrina-CCK, anteriormente descritos, corresponden únicamente a este péptido tipo gastrina o se deben también a la presencia de factores de tipo CCK.

Los pocos estudios funcionales sobre la CCK en el sistema gastrointestinal de las aves abordan fundamentalmente las acciones reguladoras de la secreción, tanto pancreática como ácida gástrica, de este péptido. Así, la bibliografía únicamente registra un trabajo en el cual se estudian las acciones de la CCK sobre la motilidad gastroduodenal en el pollo. La falta de estudios previos sobre este aspecto de la regulación de la motilidad digestiva en las aves se debe a: 1) los patrones de motilidad gastrointestinal en las aves no se conocen aún en su totalidad, el número de estudios realizados en las aves es, comparativamente, muy inferior al de los realizados en mamíferos; 2) muchos de los mecanismos básicos de regulación de la motilidad gastrointestinal se han caracterizado en las aves muy recientemente, con mucha posterioridad a los mamíferos y 4) hasta muy recientemente no se había puesto a punto una técnica de registro y análisis electromiográfico que permitiera estudiar en profundidad determinados aspectos de la motilidad gastrointestinal en las aves.

De acuerdo con estos antecedentes, el objetivo global de este trabajo ha sido profundizar en el conocimiento de los mecanismos de control de la

motilidad gastrointestinal en las aves y concretamente en el papel de la CCK en los mismos. Con esta finalidad , los objetivos concretos planteados han sido:

1. Estudiar la presencia de factores gastrina-CCK en el tracto digestivo del pollo mediante técnicas inmunohistoquímicas. Diferenciar la presencia específica y la distribución de los factores tipo gastrina y tipo CCK mediante el empleo de anticuerpos específicos.
2. Caracterizar las acciones de los péptidos gastrina de pollo y CCK sobre la actividad motora y la coordinación del área gastroduodenal. Estudiar el mecanismo de acción de la CCK sobre el área gastroduodenal y los receptores implicados en sus acciones.
3. determinar las acciones de la CCK y de la gastrina de pollo sobre la motilidad intestinal, tanto en ayunas como en período postprandial.
4. Comparar las acciones sobre la motilidad gastroduodenal e intestinal de la CCK administrada exógenamente con las observadas en las mismas áreas a partir de la estimulación de su liberación endógena. Como estimulantes de la liberación endógena de CCK se emplearan los lípidos, como componentes de la dieta que en los mamíferos son potentes estimulantes de su liberación endógena.

III - MATERIAL, METODOS Y RESULTADOS

1- ESTUDIO MORFOLOGICO DE LA DISTRIBUCION DE LOS PEPTIDOS GASTRINA Y CCK EN EL TRACTO DIGESTIVO DE LAS AVES.

1.1 - OBJETIVOS

Aunque se ha aislado la CCK del sistema nervioso central del pollo su presencia en el tracto digestivo no ha sido claramente demostrada, a pesar de que existen evidencias, tanto de tipo inmunológico como cromatográfico, de la presencia de factores de tipo gastrina-CCK a este nivel. Recientemente, se ha aislado un péptido con actividad gastrina (gastrina de pollo) en el tracto digestivo de estos animales. Sin embargo no se ha estudiado la distribución relativa de este péptido ni su relación con los factores tipo gastrina-CCK, previamente descritos, mediante técnicas inmunohistoquímicas. Por lo tanto, los objetivos de este estudio han sido:

- A - Estudiar la distribución digestiva de la gastrina de pollo mediante el empleo de anticuerpos específicos.
- B - Determinar la presencia y distribución intestinal de la CCK, enfatizando las diferencias con la gastrina del pollo.
- C - Cuantificar la presencia de la gastrina de pollo y de la CCK en el tracto gastrointestinal.

Para ello se han realizado estudios inmunohistoquímicos, empleando anticuerpos con diferentes especificidades, sobre la presencia y distribución de los péptidos gastrina y CCK a lo largo de todo el tracto gastrointestinal del pollo.

1.2 - MATERIAL Y METODOS

1.2.1 - Obtención y procesado de las muestras.

Para este estudio se emplearon pollos (*gallus gallus*) macho de la estirpe Leghorn Blanca de entre 6 y 8 semanas de edad. Los animales (n=6) fueron eutanasiados mediante una sobredosis *i.v.* de tiopental sódico (Pentothal[®] sódico, Abbott Laboratories). Inmediatamente tras la muerte se abrió la cavidad abdominal, se extraía el tracto digestivo completo y se tomaban muestras de las siguientes localizaciones:

- Estómago: Compartimiento glandular
 Compartimiento muscular
- Píloro
- Duodeno: Rama descendente
 Rama ascendente
- Intestino delgado:
 - Yeyuno proximal
 - Yeyuno distal (a 10 cm pre-divertículo de la vesícula vitelina)
 - Ileon proximal (a 10 cm post-divertículo de la vesícula vitelina)
 - Ileon distal (a 5 cm de la unión íleo-ceco-cólica)
- Colon
- Ciego

Las muestras siguieron el siguiente procesado, previo al estudio inmunohistoquímico:

- 1- Fijación a temperatura ambiente, durante 4 h, en una solución de p-benzoquinona recristalizada al 4% (peso/volumen) en tampón salino de fosfato (PBS) (Cloruro sódico: 0,2 g/l, fosfato bisódico: 1,15 g/l, fosfato monosódico: 0,2 g/l; pH 7,4).
- 2- Fijación, a temperatura ambiente durante 24 h, en una solución de sacarosa al 20% (peso/volumen) en PBS.
- 3- Congelación en nitrógeno líquido.

- 4- Conservación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta el momento de su procesado.

1.2.2 - Tinción de las muestras

A partir de las muestras congeladas se obtenían secciones consecutivas de $10\text{ }\mu\text{m}$ de grosor en criostato. Los cortes fueron teñidos mediante la técnica de inmunofluorescencia (IMF) indirecta de Coons (1956). El protocolo seguido para la tinción fue el siguiente:

- 1- Incubación, durante 16-24 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un ambiente saturado de humedad, con el primer anticuerpo.
- 2- Lavado con PBS del exceso de anticuerpo; se realizaron tres lavados consecutivos con una duración total de 1 h.
- 3- Incubación, durante 30 min a temperatura ambiente, en una zona oscura y en un ambiente saturado de humedad, con el segundo anticuerpo. Este segundo anticuerpo era una IgG anti-conejo obtenida en cabra y conjugada con fluoresceína (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, U.S.A.). La dilución de este segundo anticuerpo fue de 1:16 en PBS.
- 4- Dos lavados de 10 min con PBS.
- 5- Montaje de las secciones en glicerol:PBS (9:1).

Tras este proceso las muestras eran inmediatamente examinadas mediante un microscopio de fluorescencia estándar, usando luz ultravioleta de una longitud de onda de 495 nm .

1.2.3 - Controles y bloqueos de los anticuerpos.

Simultáneamente a la tinción con cada anticuerpo se realizaron sistemáticamente controles. Estos controles eran cortes en cuyo proceso de tinción el primer antisuero era sustituido por suero normal de conejo, para descartar la posible unión inespecífica del segundo anticuerpo a proteínas del tejido.

Para determinar la especificidad de los anticuerpos empleados estos fueron inmunoabsorbidos tanto con CCK-8 como con gastrina del pollo como con CCK-33. Posteriormente, un grupo de secciones fueron teñidas empleando como primer anticuerpo estas soluciones. El proceso de inmunoabsorción se realizó incubando los diferentes anticuerpos en diferentes soluciones conteniendo una concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$ de péptido y de forma que la concentración final del anticuerpo en estas soluciones fuese igual a la dilución de trabajo.

1.2.4 - Recuento de células

Entre 10 y 12 secciones correspondientes a píloro, yeyuno e ileon (tanto proximal como distal), teñidas con todos los anticuerpos fueron empleadas para valorar el número de células inmunorreactivas presentes en estas áreas. En estas secciones se contó el número de células claramente teñidas y diferenciables, en al menos 10 campos por cada sección, empleando un objetivo de x25 aumentos. Los resultados del conteo celular se expresan como media \pm SEM.

1.2.5 - Reactivos y Anticuerpos

Los reactivos químicos empleados en este trabajo fueron adquiridos, si no se especifica lo contrario, a Sigma Chemical (St. Louis, Missouri, U.S.A.) y fueron de grado analítico.

Los anticuerpos empleados fueron de las características siguientes, que se encuentran resumidas en la tabla III.1.

A - L48

Anticuerpo específico para el extremo carboxiterminal común de la gastrina-CCK. Este anticuerpo está obtenido en conejo a partir de su inmunización frente a la fracción C-terminal común de la familia.

B - L293

Anticuerpo específico para la gastrina de pollo (cG) obtenido en conejo a

partir del decapeptido carboxiterminal de la molécula no sulfatada de la cG.

C - Anticuerpo específico para CCK (A-CCK)

Anticuerpo comercial (14176-v, Peptide Institute Inc., Osaka, Japón), obtenido en conejo por inmunización con CCK-33 porcina conjugada con tiroglobulina bovina. Altamente específico para la CCK-33 (entre un 60 y un 100%) y muy baja crossreactividad con la gastrina y la CCK-8 (<0,1%).

Los anticuerpos fueron diluidos hasta la concentración de trabajo en PBS, conteniendo un 0,1% de albúmina sérica bovina y un 0,01% de azida sódica.

TABLA III.1 - CARACTERISTICAS DE LOS ANTICUERPOS.

ANTICUERPO	PROCEDENCIA	OBTENCION	ESPECIFICIDAD	DILUCION
L48	G.J. Dockray ^a	CCK-8 no sulfatada	Específico C-terminal gastrina-CCK	1:200
L293	G.J. Dockray ^a	cG-10 no sulfatada	Específico gastrina de pollo	1:50
A-CCK	Peptide Inst. ^b	CCK-33 porcina	Específico CCK	1:200

^a - Dr. G.J. Dockray, Physiology Department, University of Liverpool, Liverpool, U.K.

^b - Peptide Institute Inc., Osaka, Japón.

1.3 - RESULTADOS

La técnica de inmunofluorescencia reveló la presencia de células, con una clara fluorescencia, distribuidas de forma desigual a lo largo del tracto gastrointestinal. Las células teñidas se localizaban exclusivamente a nivel de la mucosa, eran generalmente de forma piramidal y presentaban un polo apical proyectándose hacia la luz intestinal. La fluorescencia estaba limitada al citoplasma y a grandes aumentos el núcleo celular era claramente diferenciable. Las zonas en las que se observó la presencia de inmunorreactividad (IMR) fueron: piloro, duodeno e intestino delgado. A nivel del intestino delgado ésta se encontraba mayoritariamente en el yeyuno distal y ileon proximal, siendo escasa en el resto de áreas. Ni en las diferentes áreas del estómago ni en colon ni ciegos se observó la presencia de IMR (Figs. III.1 y III.2).

1.3.1 - Características de la IMR del antro pilórico.

El anticuerpo L48 (específico para el extremo C-terminal de los péptidos gastrina-CCK) no tiñó ninguna célula en esta región. Sin embargo, cuando cortes de la misma zona fueron teñidos con el anticuerpo L293 (específico para la gastrina del pollo) (Figs. II.2A y III.3A) o el A-CCK (específico para CCK) se observó una alta densidad de células teñidas (117 ± 40 células/campo $\times 312,5$ para el L293). La IMR observada en este caso era mucho más intensa cuando se empleaba el anticuerpo L293 que cuando se empleaba el A-CCK, aunque en ambos casos se encontraba aproximadamente la misma densidad de células distribuidas homogéneamente a lo largo de toda la mucosa antral (Tabla III.2).

La IMR observada con el anticuerpo L293 fue bloqueada cuando éste se inmunoabsorbió con cG (Fig. III.3B), CCK-33 o CCK-8. La IMR observada al emplear el A-CCK desapareció totalmente al inmunoabsorber el anticuerpo con cG y CCK-33 pero se observó una IMR residual cuando la inmunoabsorción fue realizada con CCK-8.

TABLA III.2 - INMUNORREACTIVIDAD DEBIDA A LOS ANTICUERPOS L48, L293 Y A-CCK: DISTRIBUCION Y EFECTO DE LA INMUNOABSORCION.

L48	CONTROL	INMUNOABSORCION		
		CCK-8	cG	CCK-33
PILORO	-	-	-	-
DUODENO	+	-	-	-
YEUONO	+	-	-	-
ILEON	+++	+/-	-	-
<hr/>				
L293				
PILORO	++++	-	-	+/-
DUODENO	+	+	-	-
YEUONO	++	-	-	-
ILEON	+++	+	-	-
<hr/>				
A-CCK				
PILORO	+++	+/-	-	-
DUODENO	+/++	+/++	+	-
YEUONO	++	++	++	-
ILEON	+++	+++	+++	-

+, ++, +++, +++++: número relativo de células inmunorreactivas
(de menor a mayor).

-: prevención de la inmunorreactividad por preabsorción del anticuerpo.

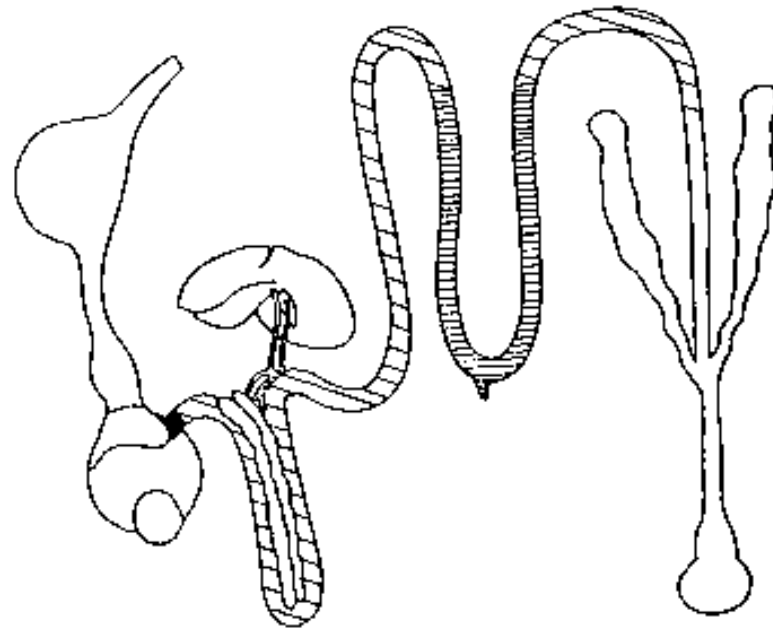


FIG III.1 - Diagrama del tracto digestivo del pollo mostrando la distribución de las células con inmunoreactividad tipo gastrina-CCK.

Número de células por campo $\times 312,5$ aumentos: , 0; , 1-3; , 3-7; , >100 .

1.3.2 - Características de la IMR duodenal.

En el duodeno, los tres anticuerpos empleados tuvieron escasas células tanto en el asa duodenal descendente como en la ascendente. Las células teñidas presentaban la misma morfología que en el píloro y se localizaban en los villi.

La IMR obtenida con el anticuerpo L48 era prevenida mediante su inmuoabsorción con CCK-8, con cG o con CCK-33. La IMR debida al anticuerpo L293 desaparecía por inmuoabsorción del anticuerpo con cG y con CCK-33 pero no con CCK-8. La IMR debida al anticuerpo A CCK sólo se eliminó por inmuoabsorción con CCK-33 pero no cuando se empleó para éllo CCK-8 o cG (Tabla III.2 y Fig. III.4).

Algunos de los cortes realizados correspondían a la zona de transición entre el píloro y el duodeno. En esta zona, podía observarse que la IMR de la

mucosa pilórica era bloqueada satisfactoriamente por inmunoabsorción de los anticuerpos con cG, mientras que en el duodeno, cuando se empleaba el anticuerpo A-CCK, la IMR permanecía tras esta inmunoabsorción.

1.3.3 - Características de la IMR del intestino delgado.

En el intestino todos los anticuerpos revelaron la presencia de células inmunorreactivas, aunque su distribución no era homogénea a lo largo de todo él. La mayor concentración de células inmunorreactivas se encontraba en el yeyuno distal y en el íleon proximal. En el yeyuno proximal y en el íleon distal, las células reactivas eran escasas, presentando una distribución igual a la descrita para el duodeno (Figs. III.2A y III.5A).

La IMR observada con el anticuerpo L48 era mucho mayor en la zona ileal que en el yeyuno y era bloqueada de forma total tanto por la cG como por la CCK-33; sin embargo, tras la inmunoabsorción con CCK-8 permanecía cierta IMR, especialmente en el íleon. El anticuerpo L293 revelaba aproximadamente la misma IMR en yeyuno distal que en íleon proximal y los bloqueos daban resultados iguales a los del caso anterior, con permanencia de cierta IMR en el íleon al emplear para éllo CCK-8. El anticuerpo A-CCK revelaba una distribución de la IMR idéntica a la encontrada con el L48 y el L293. En este caso ni las inmunoabsorciones del anticuerpo con CCK-8 o con cG eran capaces de eliminar la IMR presente en el yeyuno y el íleon, aunque en ocasiones la intensidad de la misma estaba reducida (Figs III.5B). Por el contrario, la inmunoabsorción con CCK-33 hizo desaparecer la IMR en todas las áreas del intestino delgado (Fig. III.5C). Estos hallazgos están resumidos en la tabla III.2.

1.3.4 - Recuento de células

La distribución de la densidad de células inmunorreactivas a lo largo del tracto digestivo se representa en la figura III.1.

En el píloro, el anticuerpo L293, específico para la cG, reveló la presencia de una alta densidad de células (117 ± 40 células/campo $\times 312,5$).

Resultados similares se obtuvieron con el anticuerpo específico para CCK (97 ± 20 células/campo $\times 312,5$) mientras que el L48, como ya hemos dicho, no tiñó esta zona.

En el yeyuno distal se encontró aproximadamente el mismo número de células inmunorreactivas con los tres anticuerpos: $3,0 \pm 0,1$ células/campo para el anticuerpo L48, $2,0 \pm 1,0$ para el L293 y $2,55 \pm 0,19$ para el A-CCK. El número de células teñidas en íleon proximal fue muy similar para los tres anticuerpos y ligeramente superior al del yeyuno: $4,0 \pm 2,0$ células/campo para el anticuerpo L48, $2,33 \pm 0,4$ para el L293 y $3,37 \pm 0,29$ para el A-CCK.

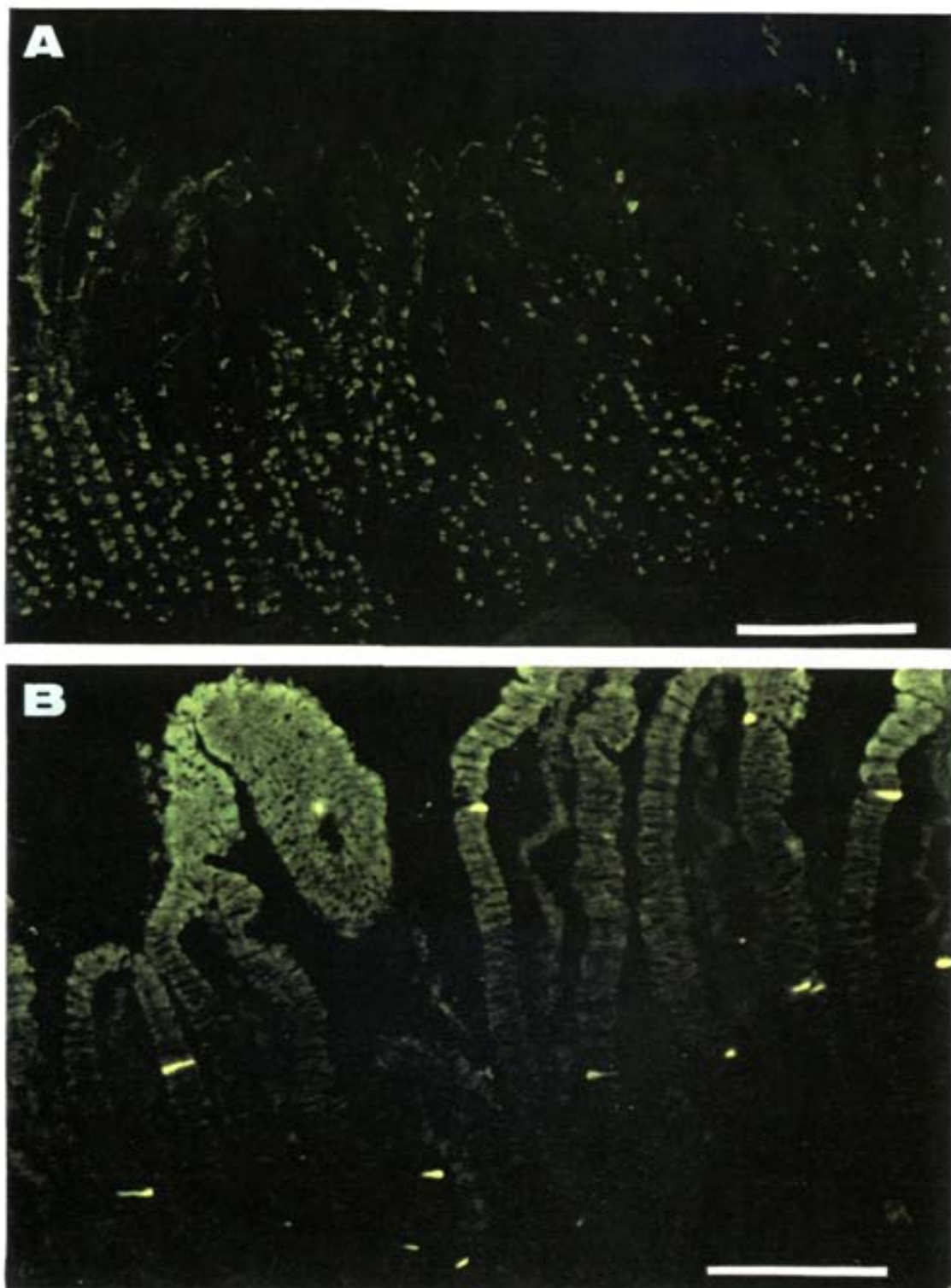


FIG. III.2 - Inmunorreactividad tipo gastrina-CCK en el tracto gastrointestinal del pollo. A) piloro incubado con el anticuerpo L293 y B) ileon proximal incubado con el anticuerpo A-CCK. Escala: 50 μ m.

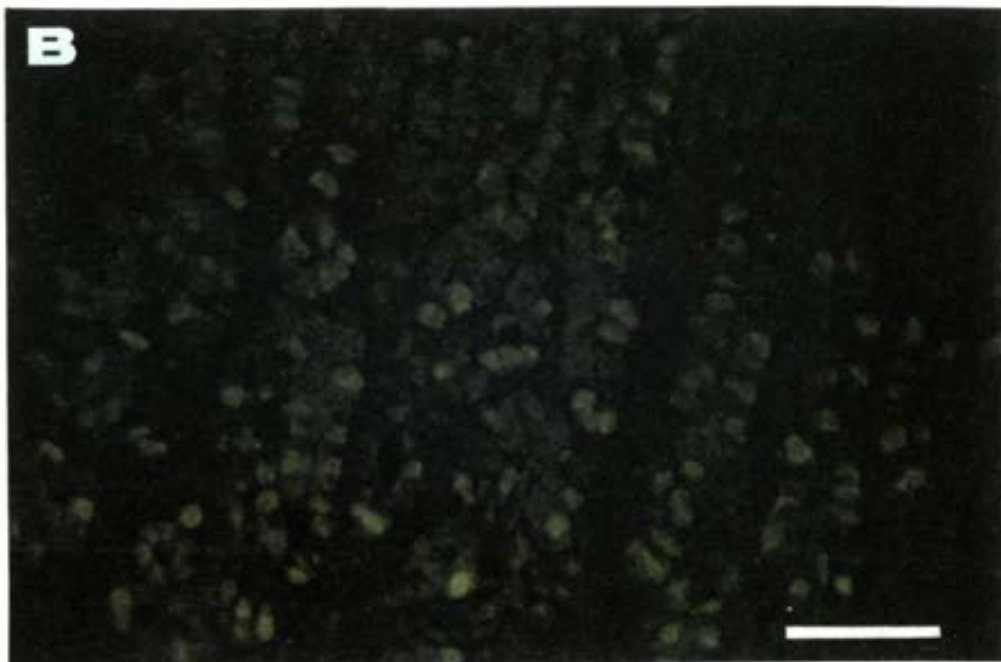
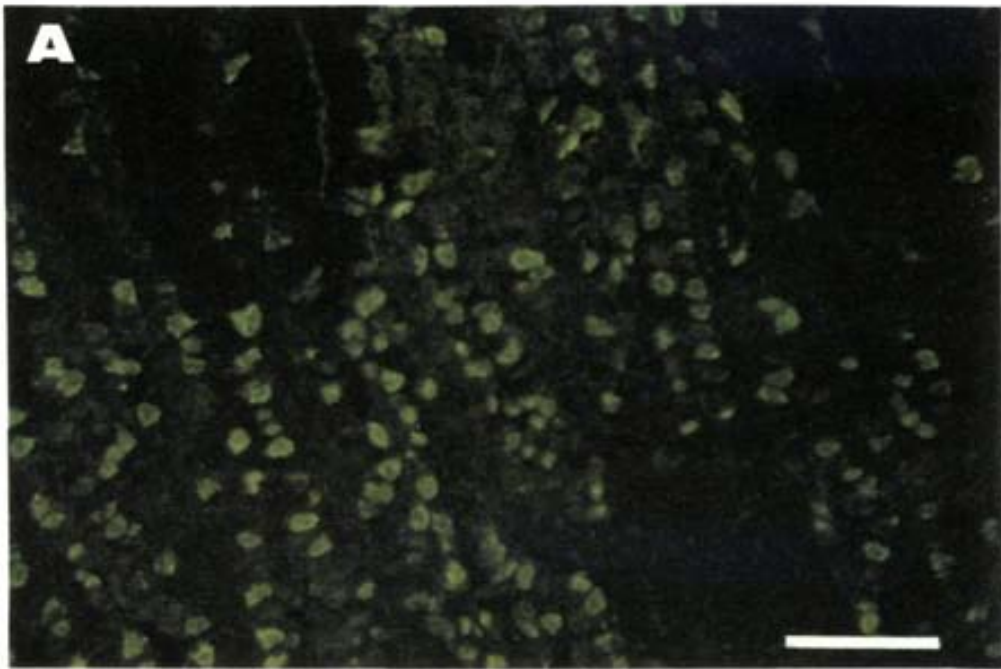
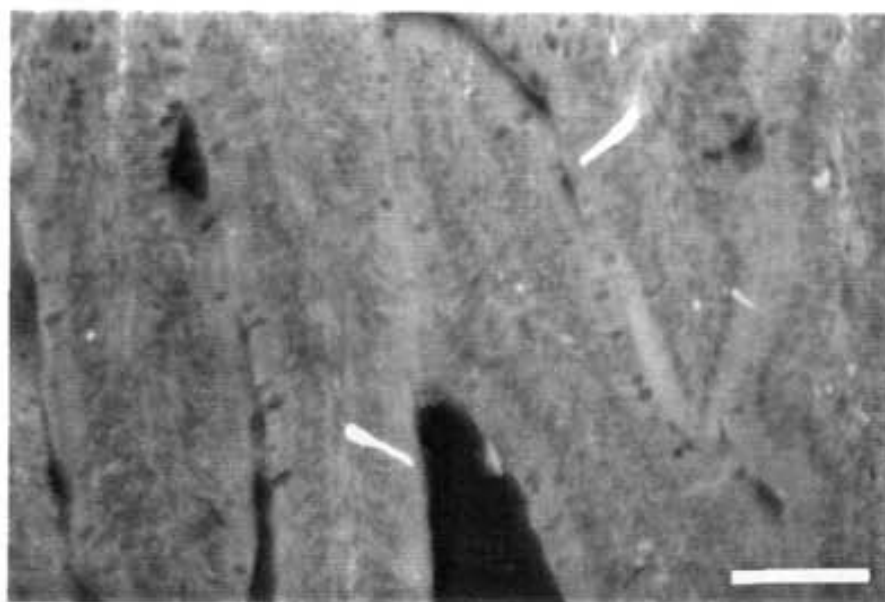


FIG. III.3 - Secciones consecutivas correspondientes al píloro mostrando la IMR debida al anticuerpo L293: A) control; B) tras la inmunodepleción del anticuerpo con gastrina de pollo. Escala: 20 μ m.

A



B

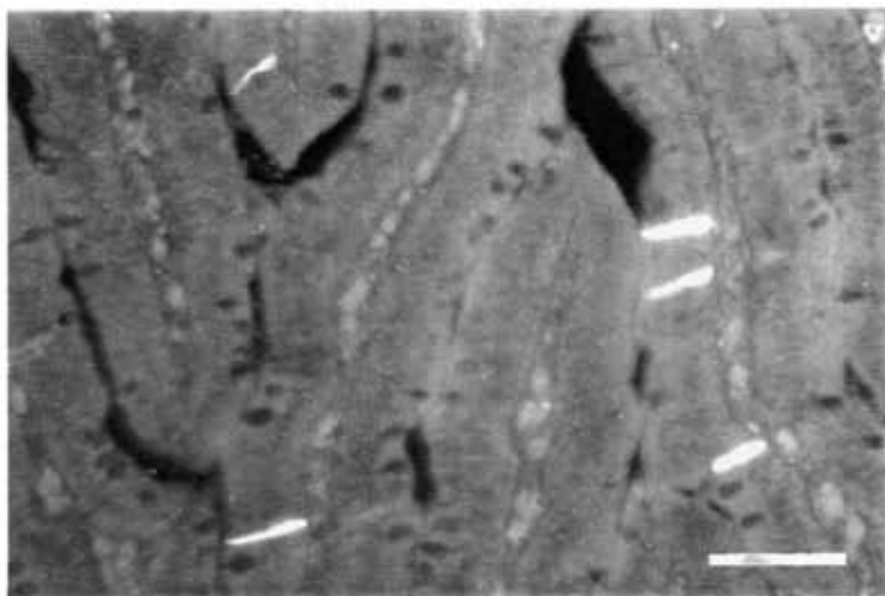


FIG. III.4 - Secciones consecutivas correspondientes al duodeno mostrando la IMR debida al anticuerpo A-CCK: A) control; B) tras la inmunoabsorción del anticuerpo con gastrina de pollo. Escala: 20 μ m.

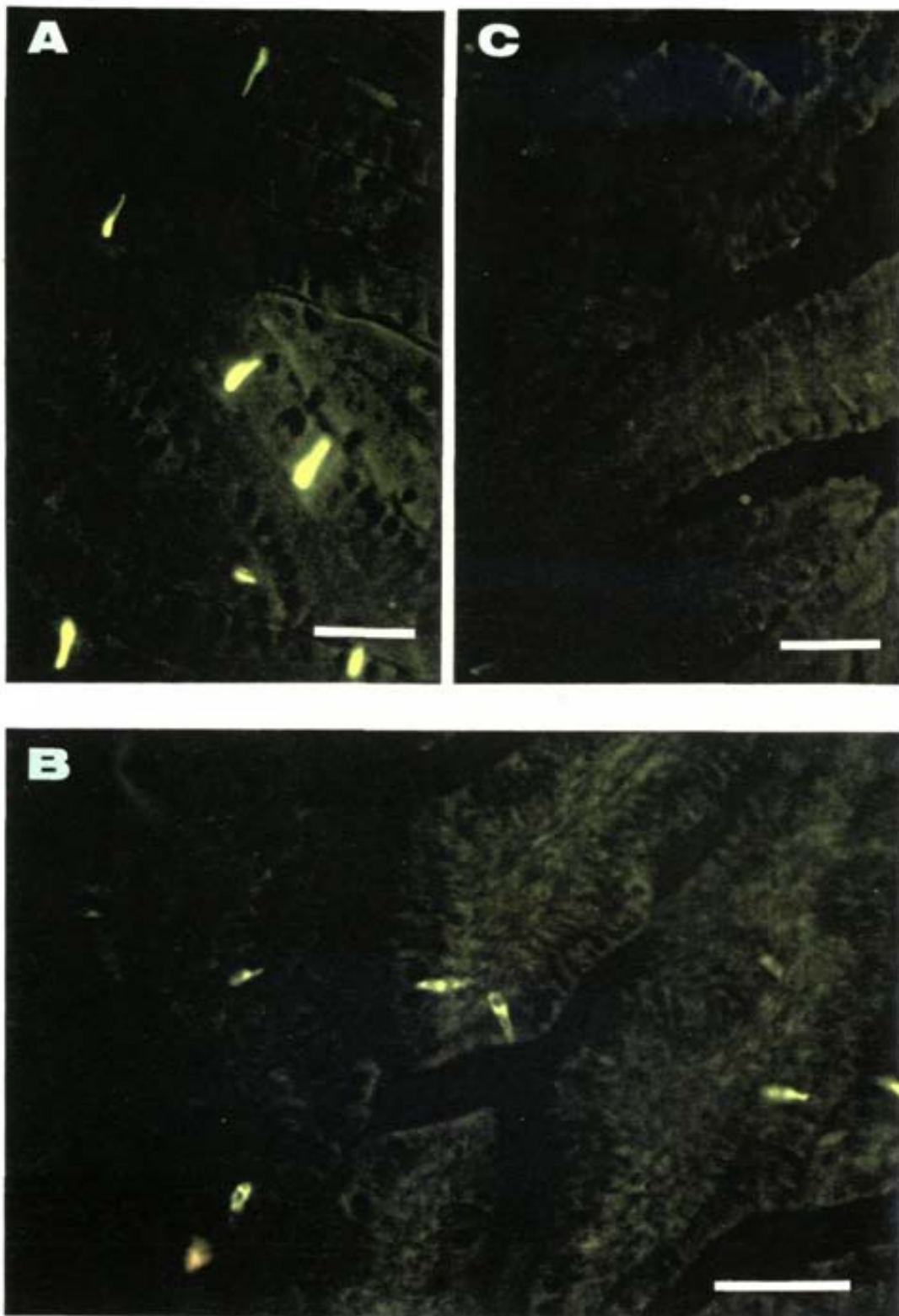


FIG. III.5 - Secciones consecutivas correspondientes al ileon proximal mostrando la IMR debida a: A) al anticuerpo L48; B) al anticuerpo A-CCK tras su inmunoprecipitación con cG y C) al anticuerpo A-CCK tras su inmunoprecipitación con CCK-33. Escala: 20 μ m.

2 - ACCIONES DE LOS PEPTIDOS DE LA FAMILIA GASTRINA-CCK SOBRE LA COORDINACION Y LA ACTIVIDAD MOTORA GASTRODUODENAL

2.1 - OBJETIVOS

Los péptidos de la familia gastrina-CCK participan de forma fisiológica en el control de la motilidad gastrointestinal. Esta actividad ha sido ampliamente estudiada en los mamíferos, se conocen los receptores implicados en estas acciones y se ha estudiado la potencia relativa de diferentes formas moleculares y de moléculas análogas.

Sin embargo, en el pollo, como ya hemos visto, no se conoce la forma molecular de la CCK intestinal y los estudios realizados empleando formas moleculares propias de los mamíferos son muy escasos. Respecto a la única molécula de esta familia aislada en el pollo, la gastrina de pollo (cG), no se han realizado estudios tendientes a determinar la actividad de esta molécula en el control de la actividad motora gastrointestinal en las aves. De acuerdo con estos antecedentes, los objetivos planteados en este primer estudio funcional han sido:

- A - Estudiar el efecto de la CCK-8, la CCK-4 y la gastrina de pollo sobre la actividad motora y la coordinación del área gastroduodenal.
- B - Valorar la actividad de estos péptidos realizando curvas dosis-respuesta para los mismos.
- C - Estudiar los receptores de CCK implicados en los efectos observados debidos a este péptido.

Para lograr estos objetivos se han realizado estudios electromiográficos de la actividad eléctrica del área gastroduodenal en períodos control y durante la infusión de diferentes dosis de los péptidos a estudiar, valorándose diferentes parámetros indicativos de la actividad motora de esta zona del tracto gastrointestinal.

2.2 - MATERIAL Y METODOS

2.2.1 - Animales de experimentación: estabulación y mantenimiento

Las experiencias fueron realizadas con pollos (*Gallus gallus*) macho de la estirpe Leghorn Blanca. Se emplearon 16 animales, de entre 6 y 9 semanas de edad y un peso que oscilaba entre los 600 y los 1000 g durante todo el período experimental.

Los animales fueron mantenidos en grupo desde el día de su nacimiento hasta el día de la implantación quirúrgica de los electrodos para electromiografía. A partir de este momento se alojaron en cubículos individualizados. Durante todo el período experimental el fotoperíodo fue constante, de ciclos de 12 horas luz/12 horas oscuridad, durando las fases de luz de 8:30 a 20:30 horas. De la misma forma, el agua y el alimento fue de libre acceso durante todo el período.

La composición de la dieta fue variable a lo largo del período de cría de los animales. Entre el día 1 y el 15 de vida los animales recibieron un pienso comercial estándar para pollos en crecimiento (Unipollo, Gallina Blanca Purina), cuya composición puede verse en la tabla III.3. A partir del día 15 de vida y ya de forma constante durante todo el período experimental los animales recibieron una dieta consistente en una mezcla del pienso para pollos descrito anteriormente y de un pienso comercial estándar para gallinas ponedoras (Unipuesta, Gallina Blanca Purina), en una proporción 80-20%; la composición de esta dieta puede verse en la tabla III.3. Este cambio en la alimentación se consideró el más apropiado, ya que la composición de esta dieta es similar a la que reciben estos animales (machos de gallina ponedora) de forma estándar.

TABLA III.3 - COMPOSICION DE LAS DIETAS RECIBIDAS POR LOS ANIMALES*.

	UNIPOLLO	UNIPOLLO/UNI- PUESTA (80/20 %)
Humedad	11,7 %	11,0 %
Proteína Bruta	17,0 %	15,2 %
Grasa Bruta	5,0 %	3,9 %
Fibra Bruta	3,7 %	4,7 %
Cenizas Brutas	6,2 %	8,1 %
Extracto libre de nitrógeno	56,4 %	57,1 %

* Sin tener en cuenta el corrector vitamínico.

2.2.2 - Preparación de los animales de experimentación

2.2.2.1 - Implantación quirúrgica de los electrodos

Los electrodos se implantan crónicamente en la pared muscular del tracto gastrointestinal mediante una intervención quirúrgica, previa anestesia total de los animales. La técnica anestésica empleada consta de dos pasos:

- Preanestesia: Diazepam (10 mg/kg *i.m.*)
Sulfato de atropina (0,1 mg/kg *i.m.*)
- Anestesia: Pentobarbital sódico (20 mg/kg *i.v.*)

En el momento de la implantación de los electrodos los animales tenían 4 semanas de edad y entre 400 y 450 g de peso.

Los electrodos empleados para los registros electromiográficos son de una aleación de níquel/cromo (80/20 %) recubiertos de poliamida aislante, con un diámetro de 120 μm (Microfilm Industries, Renens-Lausanne, Suiza). La técnica de implantación de los mismos fue descrita por Roche (1971) en la gallina y usada posteriormente con éxito por diferentes autores. Consiste en un abordaje de la cavidad abdominal mediante una laparotomía lateral izquierda. Una vez abierta la cavidad abdominal se localizan las diferentes áreas anatómicas del tracto gastrointestinal donde se desea implantar los electrodos.

La implantación crónica de los electrodos se realiza mediante una aguja hipodérmica con la que, a modo de trocar, se atraviesa la pared muscular del intestino, sin llegar a la luz del mismo. Por la luz de la aguja, a modo de fiador, se introduce un extremo del electrodo, del que previamente se ha eliminado la capa de poliamida aislante. Cuando se retira la aguja, el electrodo queda atravesando la pared muscular. La fijación de éste al intestino se realiza mediante el trenzado de uno de sus extremos alrededor del otro, formando una especie de bucle (Fig. III.6). La eliminación previa de la capa de poliamida asegura que la zona conductora del electrodo quede en contacto con la capa muscular. En la implantación, los electrodos se colocan en grupos de tres, separándose entre sí de 3 a 5 mm; aunque luego en los registros se emplean sólo dos electrodos. Esta técnica permite registrar con varias combinaciones de dos electrodos, aumentando la seguridad de la implantación.

Finalizada la implantación, los electrodos se agrupan y se exteriorizan a través de una contraabertura en la pared abdominal y se llevan, mediante una tunelización en el tejido subcutáneo, hasta el dorso del animal, donde se extraen. Entonces son recubiertos con cinta adhesiva protectora y sujetos convenientemente al dorso del animal hasta el momento del registro.

Para este experimento se implantaron 5 tripletes de electrodos en:

- Compartimiento glandular del estómago.
- Músculo cráneo-dorsal del compartimiento muscular del estómago
- Músculo caudo-dorsal del compartimiento muscular del estómago
- Rama descendente del asa duodenal (6 cm del píloro) (duodeno proximal)
- Rama ascendente del asa duodenal (15 cm del píloro) (duodeno distal).

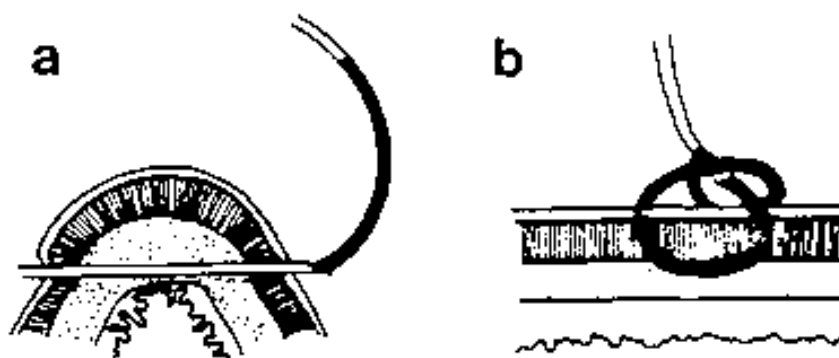


FIG. III.6 - Representación esquemática de la técnica de implantación crónica de electrodos en la musculatura gastrointestinal (modificado de Ruckebush y Brady, 1982).

- a) Introducción del trocar en la musculatura y paso del electrodo.
- b) Fijación del electrodo a la pared muscular.

Estos electrodos nos permiten registrar todos los eventos eléctricos que se producen durante un ciclo gastroduodenal y por lo tanto estudiar la actividad motora y la coordinación de esta área.

2.2.2.2- Cateterización

Un día antes de iniciarse los registros electromiográficos los animales fueron equipados con un catéter de polivinilo (0,50 y 0,80 mm de diámetros interno y externo respectivamente) (Clear Vinyl Tube, Dural palastics & engineering, Auburn, Australia) implantado crónicamente en una vena del ala (*V. basilica*). Previa anestesia local (Clorhidrato de mepivacaína, Scandínivsa 1%^R) la vena era disecada y ligada y el catéter introducido en su luz y fijado mediante una doble ligadura.

Los catéteres fueron periódicamente revisados y su luz se mantuvo abierta mediante su perfusión con suero fisiológico heparinizado, que prevenía la formación de coágulos.

2.2.3 - Registros electromiográficos y análisis

Los registros electromiográficos se iniciaron a los 15 días de la implantación de los electrodos, cuando, de acuerdo con los estudios de Jiménez (1991) y Jiménez *et al.* (1993a), la actividad motora puede considerarse totalmente recuperada.

Durante los períodos de registro los animales se situaban en una zona aislada, con temperatura y ambiente controlados, separados del investigador. Los electrodos fueron conectados a un "interface" (pb 40070, Panlab Ltd., Barcelona) situado al lado de la jaula que ocupaba el animal y que estaba conectado a su vez a un sistema de amplificadores de alta ganancia y a un banco de filtros (Lectromed MT8P, Lectromed Ltd., Jersey Channel Islands, U.K.). El filtrado de la señal se realizó mediante la asociación de un sistema de filtros formado por un filtro pasa-bajos (50 Hz, -6 dB) y un filtro pasa-altos (32 Hz, -6dB). Estos filtros permiten registrar las salvas de potencial asociadas a las contracciones musculares de una forma neta (Jiménez, 1991; Jiménez *et al.*, 1992c).

La señal era registrada sobre papel mediante un registrador (Multitrace 8, Lectromed Ltd., Jersey Channel Islands, U.K.) a una velocidad de 0,25 cm/min y simultáneamente digitalizadas para su posterior análisis. El sistema de digitalización empleado consta de un conversor analógico/digital/analógico (A/D/A) de 8 bites de resolución y con una frecuencia de muestreo de 50 Hz (50 muestras por segundo y canal registrado). Los datos digitalizados eran almacenados en el disco duro de un ordenador para su posterior análisis. Este sistema de captación y almacenamiento de la señal electromiográfica ha sido descrito y empleado con éxito en las aves por Jiménez (1991) y Jiménez *et al.* (1992c) y se describe también en la introducción de esta memoria.

Los registros almacenados en el ordenador fueron sometidos a un análisis consistente en:

- 1 - Integración, a intervalos de tiempo de 1 min.
- 2 - Valoración de la frecuencia de contracciones gástricas durante los 10 min de registro control y durante los 10 min correspondientes al

tratamiento.

- 3 - Estudio cualitativo de la actividad duodenal, tanto durante el período de control como durante el tiempo de tratamiento, a partir de la reproducción de los archivos electromiográficos a alta velocidad.

2.2.4 - Tratamiento de los resultados

2.2.4.1 - Resultados de la integración

Los valores obtenidos de la integración de los registros fueron traspasados a una hoja de cálculo informatizada (Lotus-123). Para evitar la variabilidad interindividual debida a la calidad de la implantación y facilitar la comparación entre los diferentes animales, se calculó el valor medio de los 10 min de período basal de registro. Esta media se restó entonces de todos los datos resultantes del proceso de integración y el valor obtenido de esta operación se denominó "delta". Este parámetro "delta" puede ser un valor tanto positivo (mostrando entonces incrementos de actividad eléctrica respecto del valor basal) como negativo (mostrando descensos de la actividad eléctrica respecto del valor basal).

Los valores obtenidos de este cálculo fueron analizados estadísticamente mediante el programa estadístico SPSS para PC. Los datos fueron sometidos a un análisis de la varianza y posteriormente a un test de Duncan, que permite determinar diferencias existentes entre una serie de datos individuales y una población considerada como un control. Se consideró que existían diferencias significativas entre los datos estudiados cuando $p < 0,05$.

2.2.4.2 - Frecuencia del ciclo gástrico

La frecuencia de contracción de todas las áreas gástricas fue estimada como ciclos/10 min, tanto para el período de registro basal como para el período de infusión de las diferentes sustancias testadas. Los resultados obtenidos se compararon mediante el test estadístico no paramétrico U de Mann-Whitney. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.