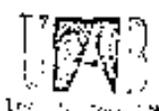


UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA

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.



2.2.4.3 - Curvas dosis-efecto

Los porcentajes de cambios en la actividad eléctrica, tanto aumentos como descensos, fueron estimados a partir del parámetro "delta", de la forma:

$$\% \text{ cambio} = \frac{\text{"delta"}}{Y_{10}} \times 100$$

Siendo Y_{10} la media de los 10 valores integrados correspondientes al tiempo de registro considerado como período basal. Los valores obtenidos de esta fórmula pueden oscilar entre -100 (lo que indica una abolición de la actividad eléctrica del órgano considerado) y + ∞ (lo que indica estimulación de la actividad eléctrica del órgano considerado, en un determinado porcentaje). Este cálculo reduce, aún más que el parámetro "delta", la variabilidad entre los diferentes animales y facilita por tanto los cálculos.

Una vez calculados estos valores se puede hallar la actividad eléctrica total generada por un órgano (AUC) durante un determinado período de tiempo como un sumatorio del tipo:

$$AUC = \sum \% \text{ cambio}$$

El valor de AUC puede ser >0 si hay estimulación, $= 0$ si el órgano se mantiene en su estado basal de actividad o <0 si hay una inhibición de la actividad eléctrica.

Con los valores obtenidos para cada animal y para cada uno de los órganos estudiados se realizó un test de regresión para determinar la existencia de una correlación dosis-efecto.

2.2.5 - Sustancias empleadas

Las sustancias empleadas fueron:

- 1- Octapéptido carboxiterminal sintético, en su forma sulfatada, de la CCK (CCK-8) (1143,3 g/mol) (Peptide Institute Inc., Osaka, Japón). La CCK-8 fue disuelta en una solución acuosa de bicarbonato al 1%.
- 2- Tetrapéptido carboxiterminal (30-33) sintético de la CCK (CCK-4) (Peptide Institute Inc., Osaka, Japón). La CCK-4 (596,7 g/mol) fue disuelta en una solución acuosa (0,9% NaCl) de dimetilsulfóxido al 10%.
- 3- Gastrina de pollo (cG), en su forma no sulfatada (4192,5 g/mol) (Peninsula Laboratories Inc., California, U.S.A.). La cG fue disuelta en una solución acuosa de NaCl al 0,9%.
- 4- Antagonistas específicos de la CCK:
 - L364,718 - antagonista específico de los receptores CCK-A (408 g/mol) (Merck, Sharp and Dome).
 - L365,260 - antagonista específico de los receptores CCK-B (397 g/mol) (Merck, Sharp and Dome).

Los antagonistas fueron preparados para su uso de acuerdo con el protocolo empleado por Huang *et al.* (1989b). Ambos antagonistas fueron disueltos en etanol absoluto a una concentración de 3 mM, esta solución madre se diluyó luego en etanol:H₂O (50:50, v:v) hasta una concentración de 1 mM y por último esta segunda solución madre se diluyó en una solución de dimetilsulfóxido:H₂O (50:50, v:v) hasta una concentración de 0,1 mM. Esta última solución fue la empleada como solución de trabajo. Todas las diluciones posteriores se realizaron en solución salina fisiológica.

2.2.6 - Protocolo experimental

Los péptidos fueron administrados, de forma randomizada, como una infusión *i.v.* de 10 min y un volumen final de 2 ml. Los registros electromiográficos se iniciaron 10 min antes de la infusión y se prolongaron 30 min una vez que ésta había finalizado (tiempo de registro total de 50 min). Infusiones de los diferentes vehículos (bicarbonato sódico, dimetilsulfóxido y suero fisiológico) se administraron como controles (n = 5 para cada uno).

Las dosis empleadas de cada péptido fueron:

- CCK-8 : 10^{-10} , 3×10^{-10} , 10^{-9} , 3×10^{-9} y 10^{-8} moles/kg (n=7 para cada dosis).
- CCK-4 : 2×10^{-10} , 6×10^{-10} , 2×10^{-9} , 6×10^{-9} y 2×10^{-8} moles/kg (n=5 para cada dosis).
- cG : 3×10^{-10} , 10^{-9} y 10^{-8} moles/kg (n=5 para cada dosis).

Los antagonistas de la CCK fueron administrados como un bolus (10^{-8} moles/kg, n=5 para cada antagonista y 10^{-7} moles/kg, n=3 para cada antagonista) 10 minutos antes de una infusión de CCK-8 de 10^{-9} moles/kg.

2.3 - RESULTADOS

2.3.1 - Efectos de los péptidos gastrina-CCK sobre la actividad gástrica

Tanto la CCK-8, como la CCK-4 y la cG produjeron una inhibición de carácter dosis-dependiente de la actividad eléctrica de todas las áreas gástricas estudiadas (fig. III.7A).

La CCK-8 a la dosis más baja (10^{-10} moles/kg/10 min) no modificó el patrón de motilidad gástrica, pero entre las dosis de 3×10^{-10} y la de 10^{-8} moles/kg/10 min se observó una inhibición creciente de la misma. Para la dosis de 3×10^{-10} esta inhibición fue sólo significativa en algunos minutos aislados mientras que para las dosis mayores la misma comenzaba poco después de iniciada la infusión (entre 1 y 4 min según el área gástrica considerada) y duraba hasta una vez pasado el tiempo de infusión (entre 16 y 30 min post-infusión, también según el área gástrica considerada). Esta inhibición, para las dosis más altas llegaba a ser una abolición total de la actividad eléctrica (Figs. III.8 y III.9).

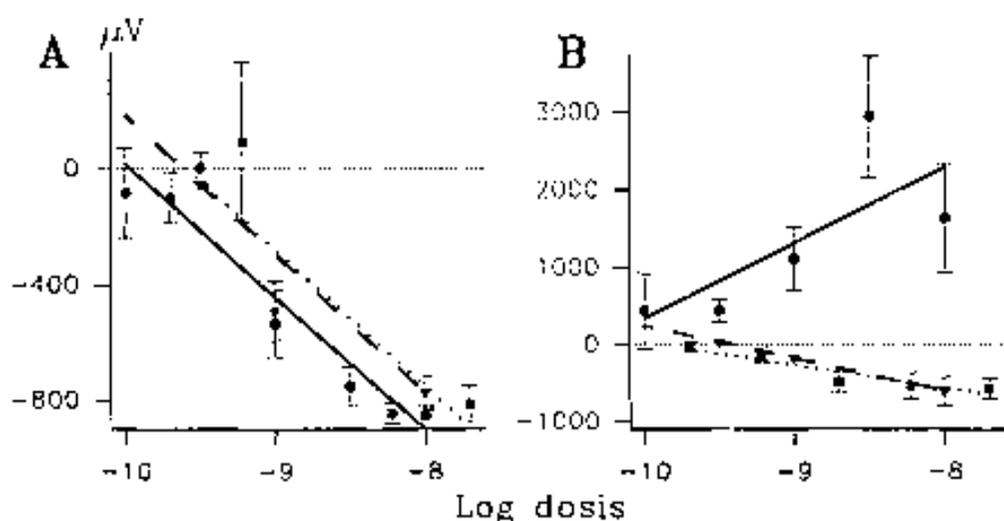


FIG. III.7 - Curvas dosis efecto para el tiempo de infusión de la CCK-8 (●—●), CCK-4 (■--■) y cG (▼···▼) en el músculo cráneo-dorsal del compartimento muscular del estómago (A) y en el duodeno proximal (B).

La CCK-4 produjo efectos inhibitorios similares a los descritos para la CCK-8. La dosis de 2×10^{10} moles/kg/10 min no modificó de forma significativa la actividad eléctrica gástrica y la de 6×10^{10} moles únicamente fue capaz de inducir cambios significativos en la actividad del músculo caudo-dorsal del compartimento muscular del estómago, pero no en las otras áreas gástricas estudiadas. Las dosis entre 2×10^9 y 2×10^8 produjeron una inhibición de carácter dosis-dependiente. Esta se iniciaba entre los 2 y los 5 minutos tras el inicio de la infusión (según la dosis y el área gástrica considerada) y se prolongaba más allá del tiempo de infusión (entre 6 y 20 min una vez acabada la infusión, según la dosis y el área gástrica considerada) (Fig. III.10).

La infusión de cG a una dosis de 3×10^{10} moles/kg/10 min no modificó la actividad gástrica, la dosis de 10^9 produjo una inhibición significativa ($p < 0,05$) en las dos áreas estudiadas del compartimento muscular del estómago pero no fue significativa en el compartimento glandular (Fig. III.10). Sin embargo, la dosis de 10^8 produjo una larga inhibición en todas las zonas estudiadas, que se prolongó unos 30 min una vez finalizada la infusión.

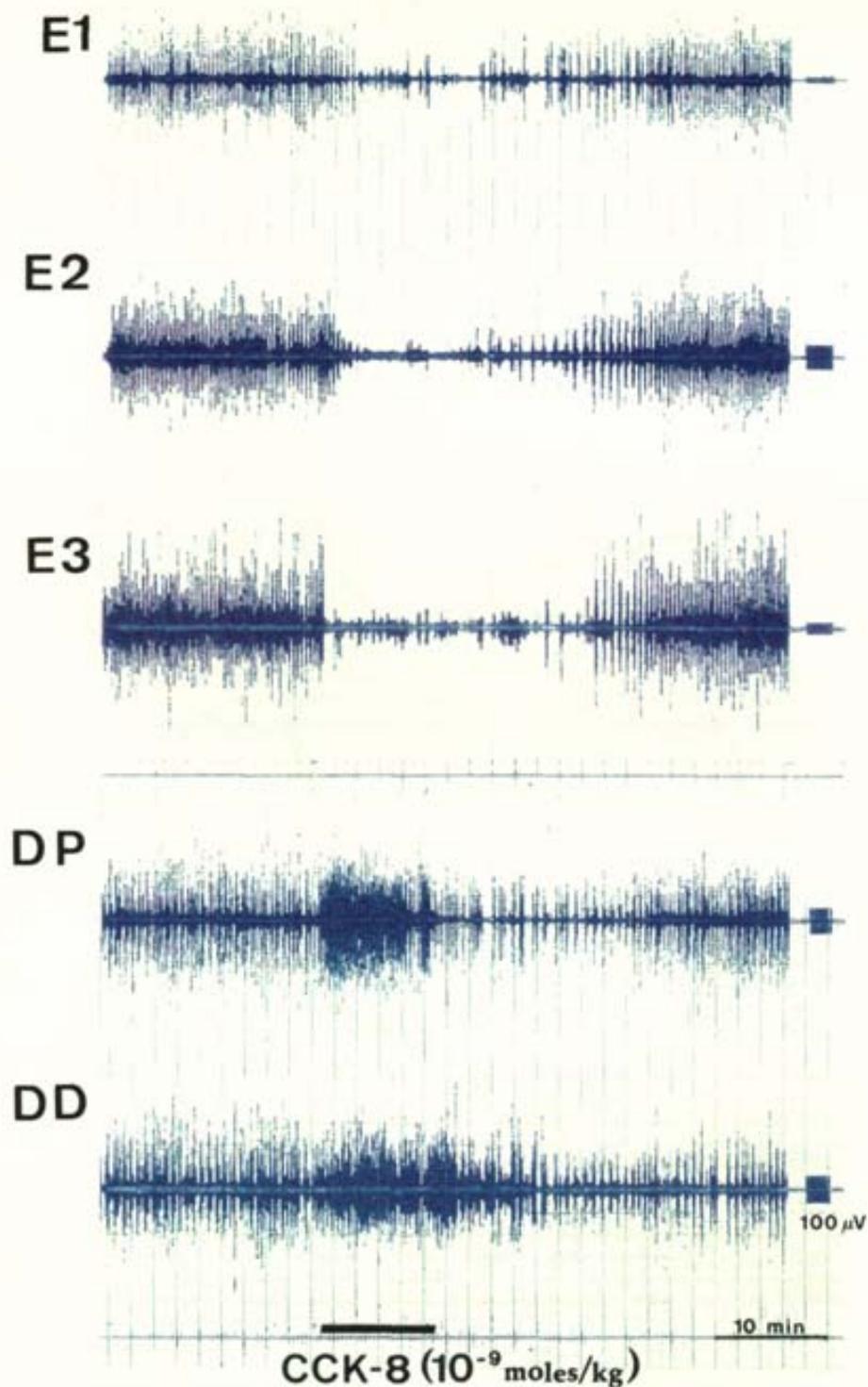


FIG. III.8 - Registro electromiográfico mostrando la acción de la infusión de CCK-8 (10^{-9} moles/Kg/10 min) sobre la actividad eléctrica gastroduodenal. Respuestas semejantes se observaron en todos los animales.

E1, compartimiento glandular del estómago; E2 y E3, músculos cráneo-dorsal y caudo-dorsal de compartimiento muscular del estómago respectivamente; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal.

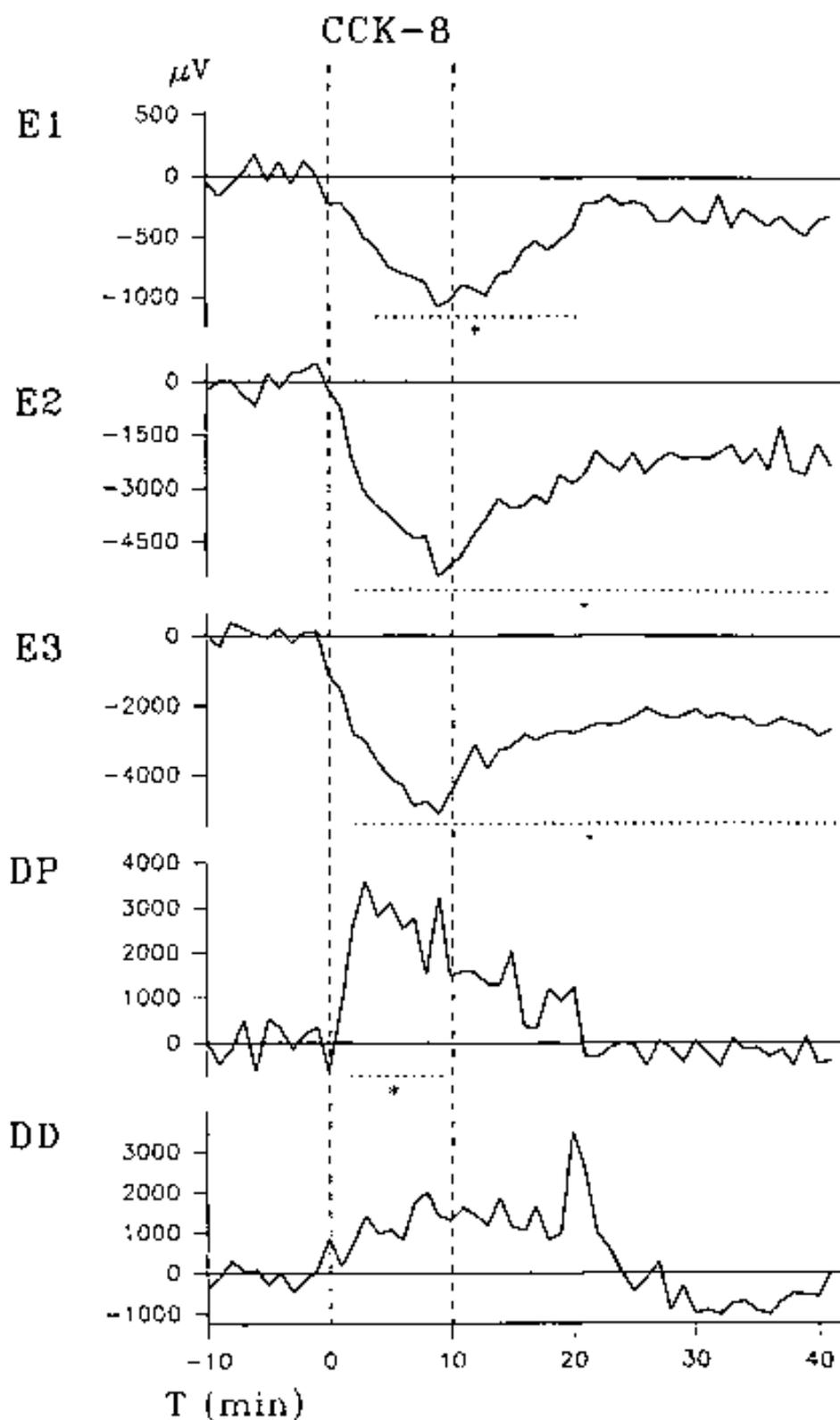


FIG. III.9- Registro integrado de las acciones de la CCK-8 (10^{-9} moles/Kg/10 min) sobre la actividad eléctrica gastroduodenal. Los datos representan la media de 7 animales (* = $p < 0,05$ según el test de Duncan).

E1, compartimiento glandular del estómago; E2 y E3, músculos cráneo-dorsal y caudo-dorsal de compartimiento muscular del estómago respectivamente; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal.

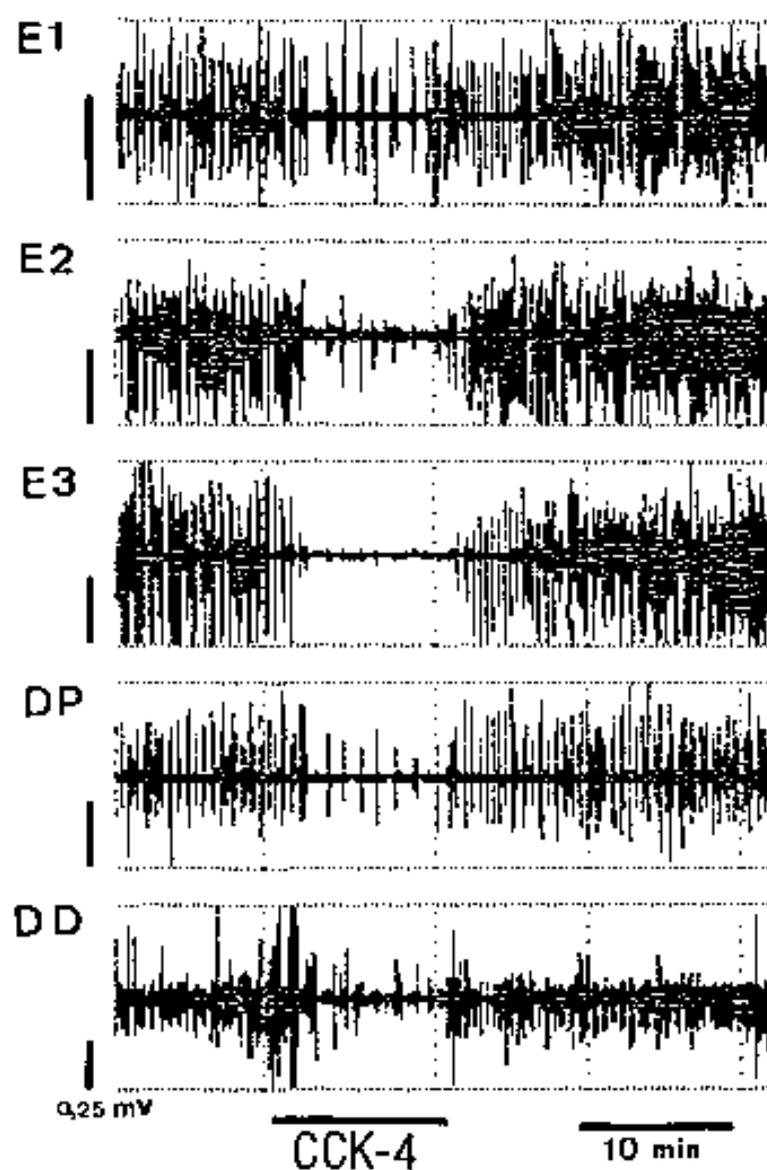


FIG. III.10 - Registro electromiográfico mostrando la acción de la infusión de CCK-4 (2×10^{-9} moles/Kg/10 min) sobre la actividad eléctrica gastroduodenal. Respuestas similares se observaron en todos los animales.

E1, compartimiento glandular del estómago; E2 y E3, músculos cráneo-dorsal y caudo-dorsal de compartimiento muscular del estómago respectivamente; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal.

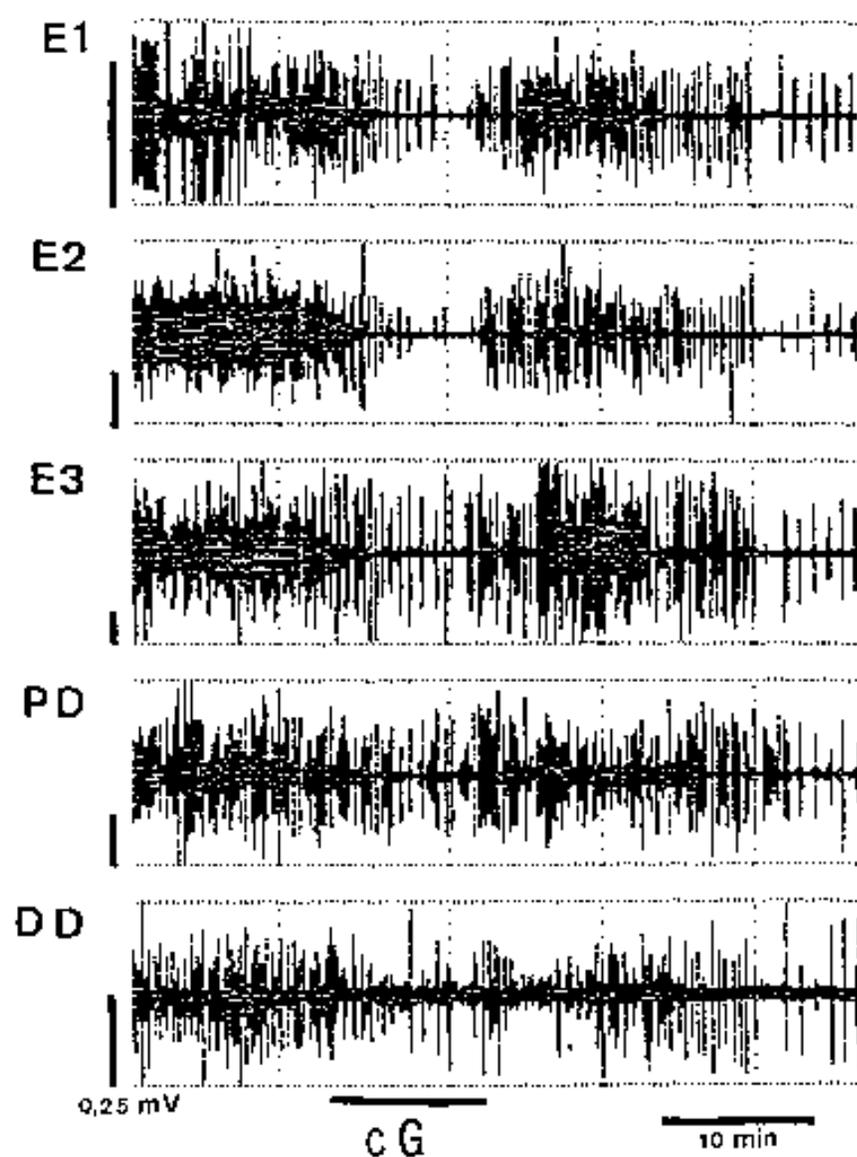


FIG. III.11 - Registro electromiográfico mostrando la acción de la infusión de gastrina de pollo (cG) (10^{-9} moles/Kg/10 min) sobre la actividad eléctrica gastroduodenal. Respuestas similares se observaron en todos los animales.

E1, compartimiento glandular del estómago; E2 y E3, músculos cráneo-dorsal y caudo-dorsal de compartimiento muscular del estómago respectivamente; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal.

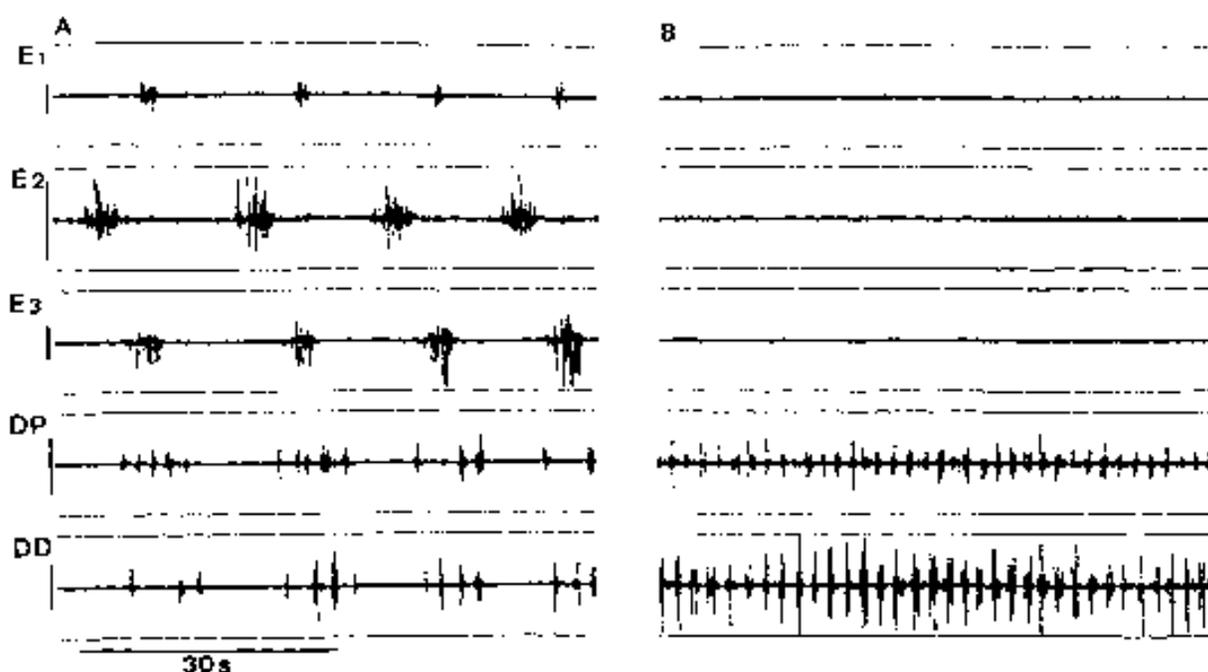


FIG. III.12 - Registro de la actividad eléctrica del área gastroduodenal. (A) muestra el ciclo gastroduodenal en situación control y (B) durante la infusión de CCK-8 (durante una infusión de 10^{-8} moles/kg/10 min). Respuestas similares se observaron en todos los animales.

E1, compartimiento glandular del estómago; E2 y E3, músculos cráneo-dorsal y caudo-dorsal de compartimiento muscular del estómago respectivamente; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal. Barra vertical: 250 μ V.

2.3.2 - Efectos de los péptidos gastrina-CCK sobre la actividad duodenal

En el duodeno los efectos fueron variables según el péptido estudiado. La CCK-8 cambió el patrón continuo y regular de actividad duodenal, consistente en fases de reposo alternadas con fases de actividad formadas por series de potenciales de actividad propagados peristálticamente, transformándolo en un patrón continuo de actividad regular (Fig. III.11). Debido a las características de esta motilidad, la actividad eléctrica total generada en el duodeno estaba incrementada significativamente ($p < 0,05$) respecto a la actividad control. Esta hiperactividad eléctrica duodenal apareció cuando se infundían dosis de péptido iguales o superiores a 3×10^{-10} moles/kg/10 min y fue además de carácter dosis dependiente en la rama

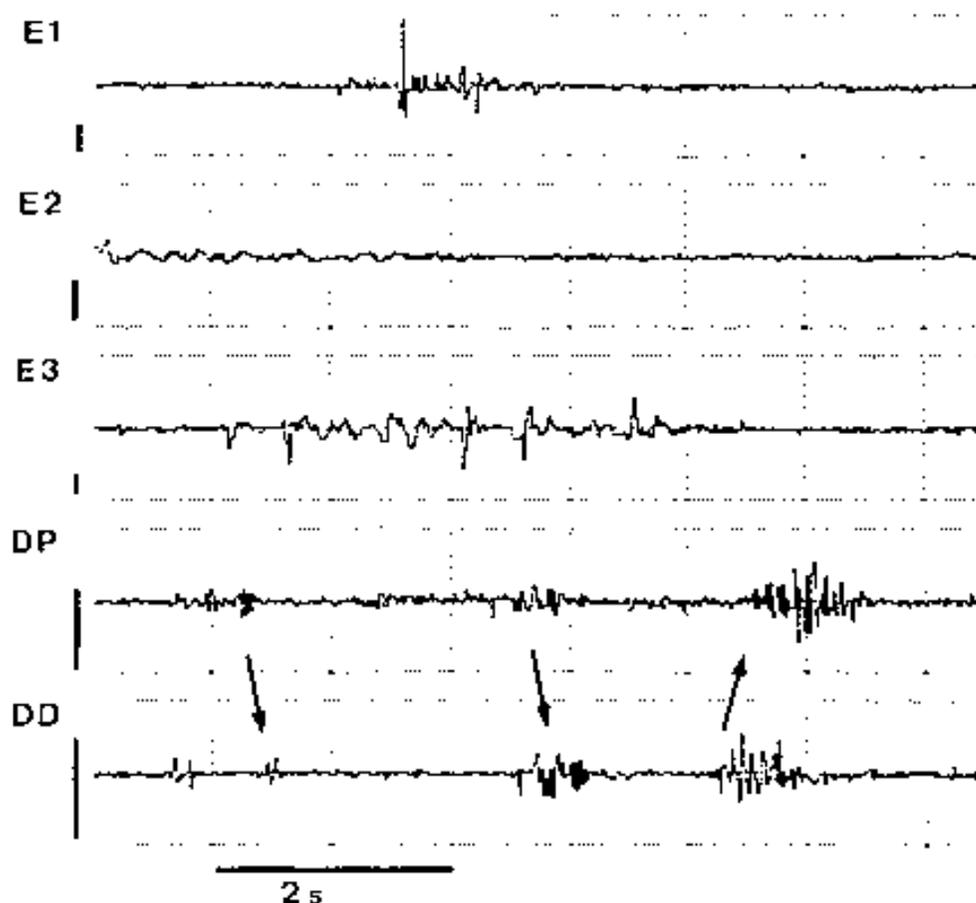
duodenal descendente, ajustándose correctamente a un modelo de regresión lineal ($p < 0.01$) (Fig. III.7B); pero no en la ascendente, que mostró una respuesta del tipo "todo o nada" y en la cual los datos no se ajustaban a un modelo de regresión lineal. La hiperactividad duodenal se iniciaba a los 2-3 minutos de iniciada la infusión, duraba únicamente este período y no era de carácter migratorio puesto que se presentaba simultáneamente en las dos ramas duodenales (Figs. III.8 y III.9).

Para la dosis más baja de CCK (10^{-10} moles/kg/10 min) no se observó incremento significativo en la actividad eléctrica global a nivel duodenal. Sin embargo, cuando se estudió cualitativamente la actividad duodenal se observó un incremento significativo en el número de contracciones de carácter antiperistáltico durante el tiempo de infusión (de $0,57 \pm 0,32$ a $2,86 \pm 0,79$ contracciones antiperistálticas en 10 min, $p < 0,05$). Estas contracciones se caracterizaban por ser de gran amplitud migrando desde la rama ascendente a la descendente del asa duodenal y podían presentarse tanto de forma aislada como intercaladas en una serie de contracciones peristálticas (Fig. III.13).

A diferencia de la CCK-8, la CCK-4 y la cG produjeron una inhibición dosis-dependiente de la actividad duodenal ($p < 0,05$) (Fig. III.7B). Esta inhibición aparecía a los 2-3 min de iniciada la perfusión de los péptidos, era coincidente en ambos duodenos y no se prolongaba más allá del tiempo de infusión (Figs. III.10 y III.11). En el caso de la infusión de cG en 2 de los 5 registros realizados, tanto para la dosis de 10^{-9} como para la de 10^{-8} moles/kg/10 min, aparecieron hiperactividades duodenales, de corta duración, una vez finalizada la infusión del péptido. El estudio cualitativo de la actividad duodenal durante las infusiones de CCK-4 y de cG no mostró cambios significativos respecto al período control.

2.3.3 - Efecto de los péptidos gastrina-CCK sobre la coordinación gastroduodenal.

Como hemos visto, todos los péptidos empleados produjeron una interrupción de la coordinación gastroduodenal, perdiéndose el patrón secuencial de contracción de los diferentes músculos gástricos coordinados con la presencia de contracciones duodenales de carácter peristáltico. La



CCK-8 FIG. III.13 - Registro expandido a alta velocidad de la actividad eléctrica del área gastroduodenal mostrando la acción de la CCK-8 durante una infusión de 10^{-10} moles/kg/10 min. Las flechas muestran el sentido de la propagación de las contracciones duodenales.

E1, compartimiento glandular del estómago; E2 y E3, músculos cráneo-dorsal y caudo-dorsal de compartimiento muscular del estómago respectivamente; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal. Barra vertical: 250 μ V.

CCK-8 indujo disrupción de la coordinación gastroduodenal por inhibición, y en algunos casos, abolición de la actividad gástrica, mientras que el duodeno presentaba un patrón de motilidad continuo simultáneo en ambas ramas duodenales. Por el contrario el efecto disruptivo de la CCK-4 y de la cG estuvo mediado por una respuesta inhibitoria tanto en el estómago como en el duodeno. La inhibición gástrica, en algunos casos, fue una abolición total de la actividad eléctrica; mientras que en el duodeno, durante el tiempo de infusión de estos péptidos, siempre siguieron presentándose contracciones aisladas.

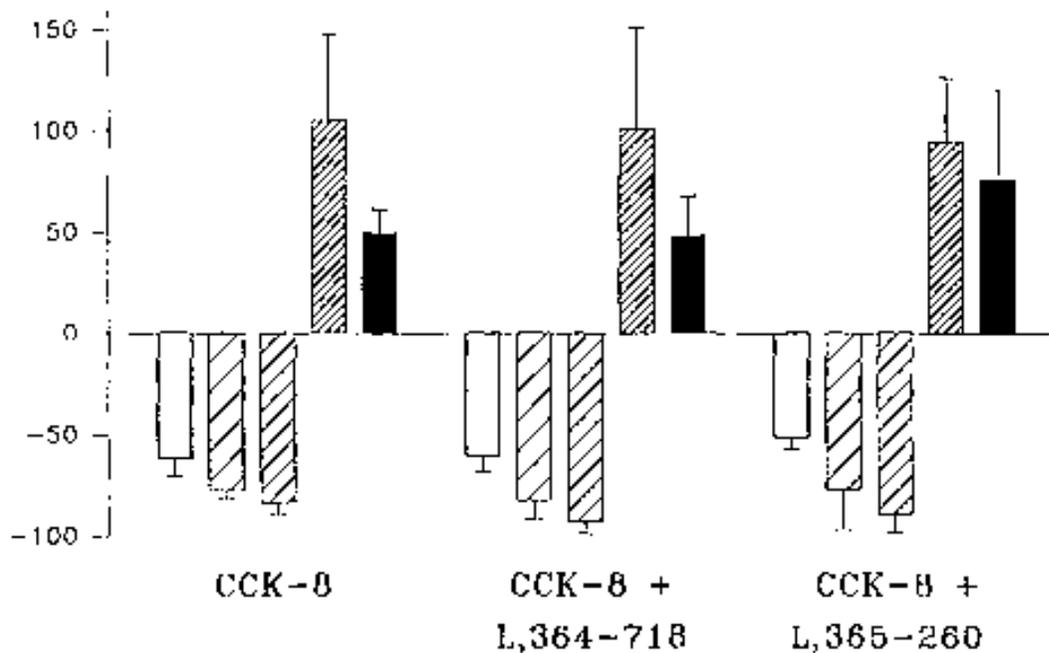


FIG. III.14 - Acción de la CCK-8 (10^{-9} moles/kg h^{-1}) sólo o previa administración de los antagonistas específicos L,364-718 o L,365-260 (10^{-7} moles/kg) sobre la motilidad gastroduodenal. Las barras representan % de incremento o decremento de la actividad eléctrica durante el tiempo de infusión de la CCK con respecto a la actividad basal. Los resultados se expresan como media \pm SEM.

□ , compartimiento glandular del estómago; ▨ , músculo cráneo-dorsal y ▩ , músculo caudo-dorsal del compartimiento glandular del estómago; ▤ , duodeno proximal; ■ , duodeno distal.

2.3.4 - Efecto de los antagonistas de la CCK.

Ni el antagonista específico de los receptores CCK-A L364,718 ni el de los receptores CCK-B L365,260 (bolus de 10^{-9} y 10^{-7} moles/kg) modificaron de forma significativa los efectos sobre la motilidad gastroduodenal de una infusión de 10^{-9} moles/kg/10 min de CCK-8. Los antagonistas, por sí mismos, no modificaron de forma significativa ni la actividad eléctrica total ni la coordinación gastroduodenal (Figs. III.14 y III.15).

Los vehículos usados como controles (bicarbonato sódico, dimetilsulfóxido y solución salina fisiológica) no modificaron en ningún caso el patrón de motilidad gastroduodenal.

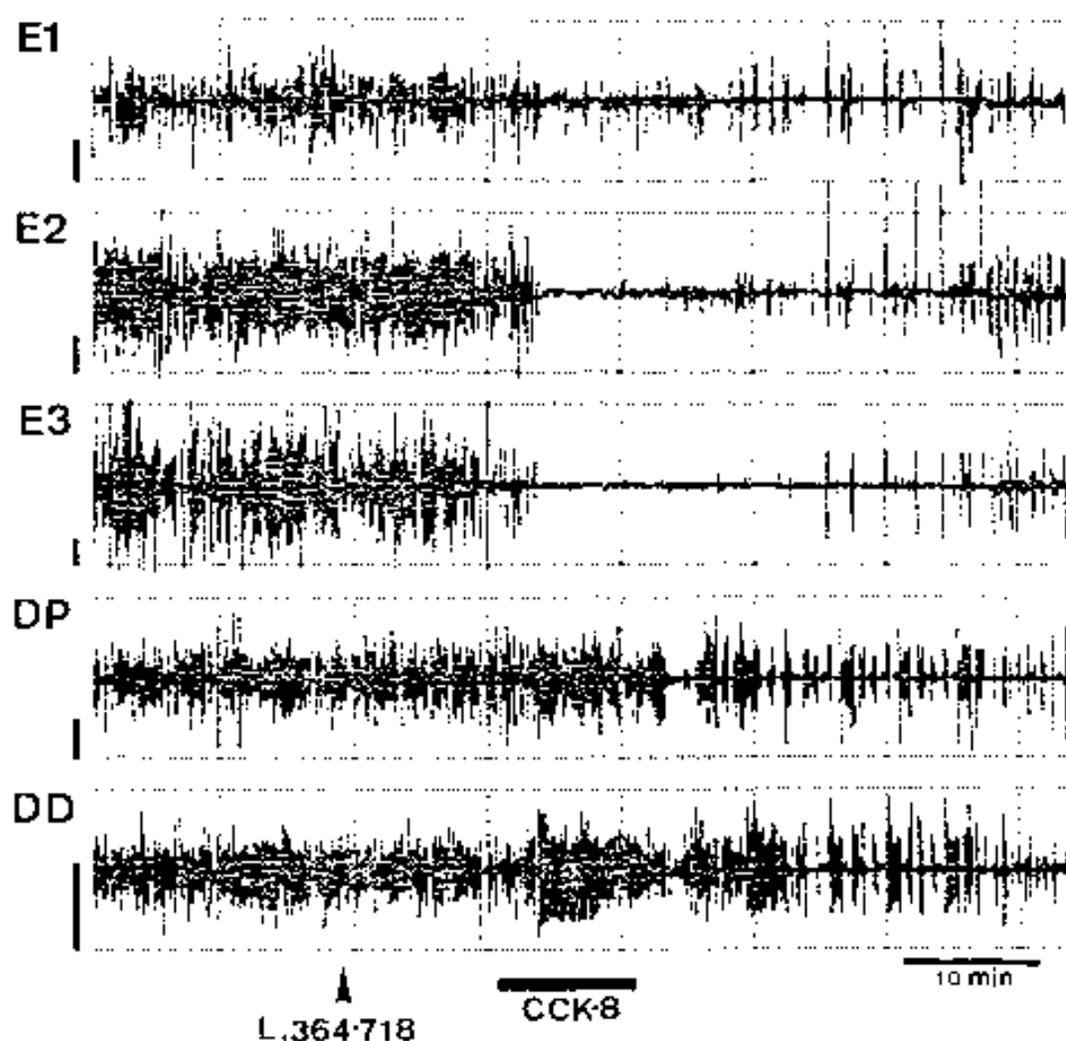


FIG. III.15 - Efecto del antagonista específico de los receptores CCK-A L364,718 (bolus *i.v.* de 10^{-7} moles/kg) sobre la acción de la CCK-8 (10^{-9} moles/Kg/10 min) en la actividad eléctrica gastroduodenal. Respuestas similares se observaron en todos los animales.

E1, compartimiento glandular del estómago; E2 y E3, músculos cráneo-dorsal y caudo-dorsal de compartimiento muscular del estómago respectivamente; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal. Barra vertical: 250 μ V.

3 - MECANISMO DE ACCION DE LA CCK SOBRE LA MOTILIDAD GASTRODUODENAL

3.1 - OBJETIVOS

El mecanismo de acción de la CCK sobre la motilidad gástrica e intestinal ha sido estudiado por múltiples autores tanto por técnicas *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo éste no está totalmente claro y parece haber grandes diferencias de unas especies a otras. Este mecanismo de acción no ha sido nunca estudiado en las aves.

De acuerdo con estos antecedentes, los objetivos planteados en este trabajo han sido:

- A- Estudiar el mecanismo de acción de la CCK en la motilidad del área gastroduodenal del pollo:
 - Implicaciones de los sistemas adrenérgico y colinérgico.
 - Implicación de los opioides endógenos.

- B- Determinar si las acciones debidas a la CCK están mediadas por el nervio vago.

- C- Mostrar si el óxido nítrico (NO) puede estar presente como neurotransmisor putativo inhibitorio en el tracto gastrointestinal de las aves.

- D- Determinar si el NO puede estar implicado en los efectos de la CCK sobre la motilidad gastroduodenal.

Para lograr estos objetivos se han estudiado los cambios de la motilidad gastroduodenal inducidos por la CCK en presencia de sustancias agonistas y antagonistas de diferente tipo, valorándose diferentes parámetros indicativos de la actividad motora de esta área.

3.2 - MATERIAL Y METODOS

3.2.1 - Animales de experimentación: estabulación y mantenimiento.

La descripción de los animales de experimentación, su estabulación y su mantenimiento corresponde al punto 2.2.1 (pág. 96). En este caso, sin embargo, se emplearon 14 animales.

3.2.2 - Preparación de los animales de experimentación.

3.2.2.1 - Implantación quirúrgica de los electrodos.

Los protocolos correspondientes a este punto son también los descritos en el apartado 2.2.2.1 (pág. 97).

3.2.2.2 - Cateterización.

Los protocolos correspondientes a este punto son también los descritos en el apartado 2.2.2.2 (pág. 99).

3.2.2.3 - Vagotomía.

Simultáneamente a la implantación de los electrodos, 5 de los 14 animales empleados en el experimento, fueron vagotomizados. La vagotomía se realizó a nivel de la zona proximal del compartimiento glandular del estómago. Para ello se retiró lateralmente el compartimiento glandular a fin de acceder fácilmente a su zona media, por la cual transcurren tanto el nervio vago derecho como el izquierdo. Los dos vagos fueron ligados conjuntamente mediante 2 ligaduras separadas entre sí aproximadamente 1 cm, los nervios se seccionaban entre ellas y una sección de aproximadamente 0,5 cm de nervio era retirada para impedir cualquier proceso de regeneración.

3.2.3 - Registros electromiográficos y análisis

La técnica general empleada para los registros electromiográficos y el análisis posterior de los mismos es el descrito en el apartado 2.2.3 (pág. 100). Aunque, en este caso no se valoró cualitativamente la actividad duodenal durante el tiempo de infusión de la CCK-8. Los tiempos de registro electromiográfico fueron variables según las diferentes sustancias testadas y se exponen junto con el protocolo experimental seguido.

3.2.4 - Tratamiento de los resultados.

3.2.4.1 - Resultados de la integración.

A partir de los resultados de la integración de los registros se calculó la actividad eléctrica total generada por cada órgano durante cada período experimental. Este parámetro se obtiene fácilmente mediante la suma de los valores de la integración correspondientes a cada fase del experimento. Los valores de actividad total obtenidos fueron comparados estadísticamente entre sí mediante un test t de Student, pareado o no pareado según cada caso.

3.2.4.2 - Frecuencia del ciclo gástrico

El tratamiento de estos datos fue igual al descrito previamente en el punto 2.2.4.2 (pág. 101).

3.2.5 - Sustancias empleadas

Las sustancias empleadas en este trabajo fueron:

- 1- CCK-8 - con las mismas características a las descritas en el punto 2.2.5 (pág. 102).
- 2- Nitroprusiato sódico (NaNP)
- 3- Metil ester de la N^G-L-arginina (L-NAME)

- 4- L-arginina (L-Arg)
- 5- Sulfato de atropina
- 6- Hexametonio
- 7- Antagonistas opioides:
 - Naloxona (antagonista μ -opioide)
 - Naltrindol (antagonistas δ -opioide)
- 8- Antagonistas adrenérgicos:
 - Fentolamina
 - Propranolol

Excepto la CCK-8 todas las sustancias fueron obtenidas de Sigma Chemical (St. Louis, Missouri, U.S.A.). Todos los productos fueron administrados usando como vehículo solución salina fisiológica.

3.2.6. - Protocolo experimental

Los registros electromiográficos se iniciaban 10 min antes de la administración de cualquier producto y este período era considerado como de actividad basal. La CCK-8 se infundió durante 10 min a una dosis de 10^{-9} moles/kg, con un volumen final infundido de 2 ml (n=9).

El hexametonio (10 mg/kg, 1 ml de volumen, n=3) y la atropina (0,1 mg/kg, 1 ml de volumen, n=6) fueron administrados como un bolus *i.v.* 10 min antes de iniciar la perfusión de CCK-8.

Los antagonistas adrenérgicos fentolamina (1 mg/kg) y propranolol (0,1 mg/kg) fueron administrados conjuntamente (1,5 ml de volumen final) (n=4) en forma de bolus *i.v.* 10 min antes de la perfusión de CCK-8.

Los antagonistas opioides, naloxona (5×10^{-7} moles/kg) y naltrindol (10^{-6} moles/kg) fueron administrados tanto por separado (n=4 para cada uno) como conjuntamente (n=4) como un bolus *i.v.* (1 ml de volumen final) 10 min antes de la perfusión de CCK-8.

La L-Arg (n=5) y el L-NAME (n=8) fueron administrados como un bolus *i.v.* de 10^{-4} moles/kg (1 ml de volumen final) seguido de una infusión de

40 min de la misma dosis, de forma que la dosis total administrada era de 2×10^{-4} moles/kg/40 min. Los últimos 10 min de infusión los animales recibían simultáneamente una dosis de 10^{-9} moles/kg de CCK-8. En este caso los animales recibían un volumen total de 5 ml por administración *i.v.*.

El NaNP (10^{-8} - 10^{-6} moles/kg, $n = 5$) fue administrado como un bolus *i.v.* en dosis crecientes, con un intervalo de 10 min entre dosis sucesivas. En el caso de las dosis de 5×10^{-7} y 10^{-6} moles/kg fue necesario prolongar este período para permitir que la motilidad gastroduodenal se recuperase hasta niveles basales.

Los animales vagotomizados únicamente recibieron CCK-8 (10^{-9} moles/kg/10 min, $n = 5$) y L-NAME ($n = 5$) siguiendo el protocolo expuesto anteriormente.

3.3 - RESULTADOS

3.3.1 - Efectos de la CCK-8 sobre la motilidad gastroduodenal.

Los efectos obtenidos fueron iguales a los descritos para la experiencia anterior en el punto 2.3 (pág. 102). La CCK-8 produjo disrupción del patrón coordinado de motilidad gastroduodenal. Durante los 10 min de infusión del péptido se observó una inhibición altamente significativa de la motilidad de todas las áreas gástricas estudiadas ($p < 0,001$) (Fig. III.16). Esta inhibición, tal y como ya se ha descrito, se prolongó más allá del tiempo de infusión. El duodeno mostró, durante el tiempo de infusión, una hiperactividad ($p < 0,002$) coincidente en ambas ramas duodenales (Fig. III.17).

3.3.2 - Efecto de la CCK-8 sobre la motilidad gastroduodenal en animales vagotomizados.

La vagotomía produjo cambios en la frecuencia de las contracciones gástricas y pérdida parcial de la coordinación gastroduodenal. Mientras que

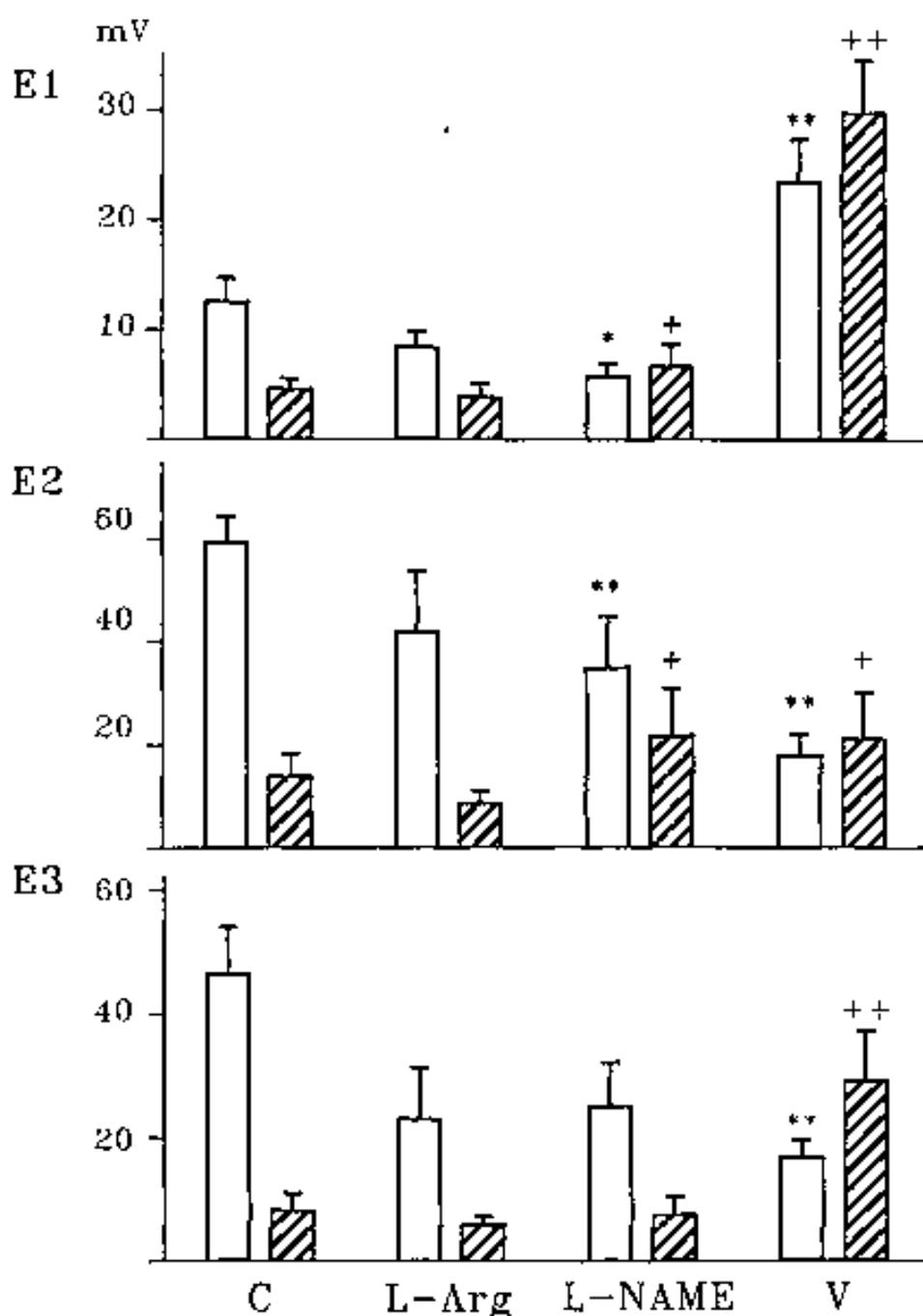


FIG. III.16 - Actividad eléctrica basal (□) y durante la infusión de CCK-8 (10^{-9} moles/kg/10 min) (▨) en diferentes situaciones experimentales (C, control; L-Arg, L-arginina; L-NAME; V, tras la vagotomía) en el estómago: E1, compartimiento glandular; E2 y E3, músculos cráneo-dorsal caudo-dorsal del compartimiento muscular respectivamente. Para simplificar la figura sólo se han representado las diferencias significativas entre la actividad eléctrica basal en cada situación experimental (*) y entre las respuestas de la CCK-8 (+).

*, ** ó +, ++: $p < 0,05$ y $0,01$ respectivamente, de acuerdo con el test t de Student.

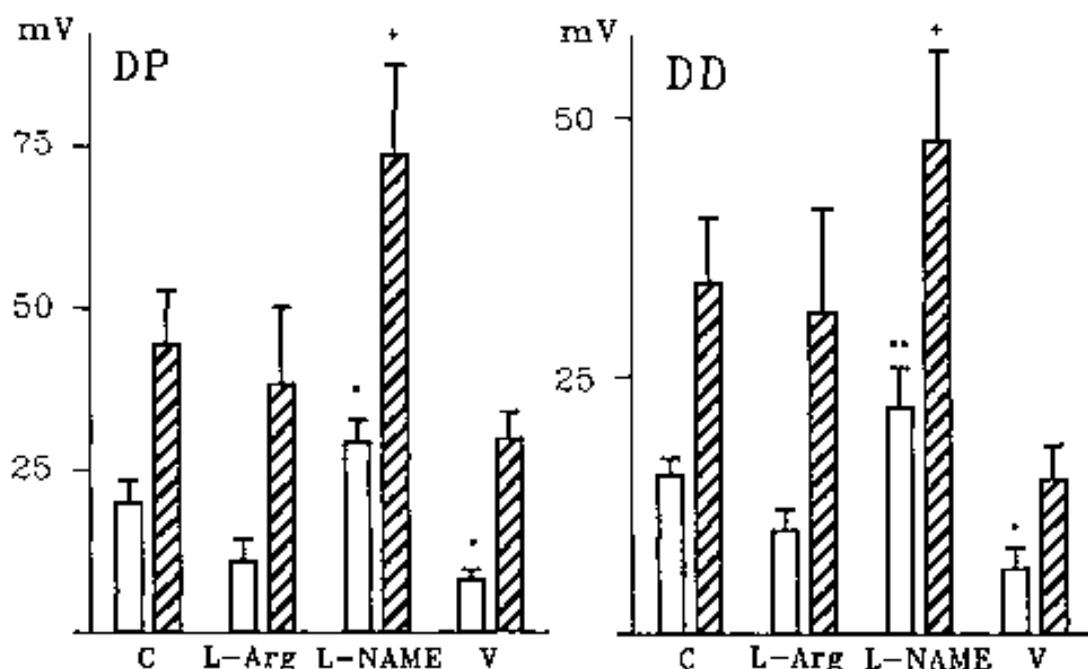


FIG. III.17 - Actividad eléctrica basal (□) y durante la infusión de CCK-8 (10^9 moles/kg/10 min) (▨) en diferentes situaciones experimentales (C, control; L-Arg, L-arginina; L-NAME; V, tras la vagotomía) en el duodeno: DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal. Para simplificar la figura sólo se han representado las diferencias significativas entre la actividad eléctrica basal en cada situación experimental (*) y entre las respuestas de la CCK-8 (+).

*, ** ó +, ++: $p < 0,05$ y $0,01$ respectivamente, de acuerdo con el test t de Student.

el compartimiento glandular presentaba un incremento de su frecuencia de contracciones los músculos cráneo-dorsal y caudo-dorsal del compartimiento muscular presentaban un reducción de la misma. Igualmente el duodeno presentaba también una reducción significativa de su actividad respecto a la motilidad basal de los animales no vagotomizados (Figs. III.16 y III.17).

La infusión de CCK-8 en los animales vagotomizados produjo efectos muy diferentes a los observados en animales no vagotomizados. La CCK-8 no produjo inhibición en ninguna de las áreas gástricas estudiadas (Fig. III.18).

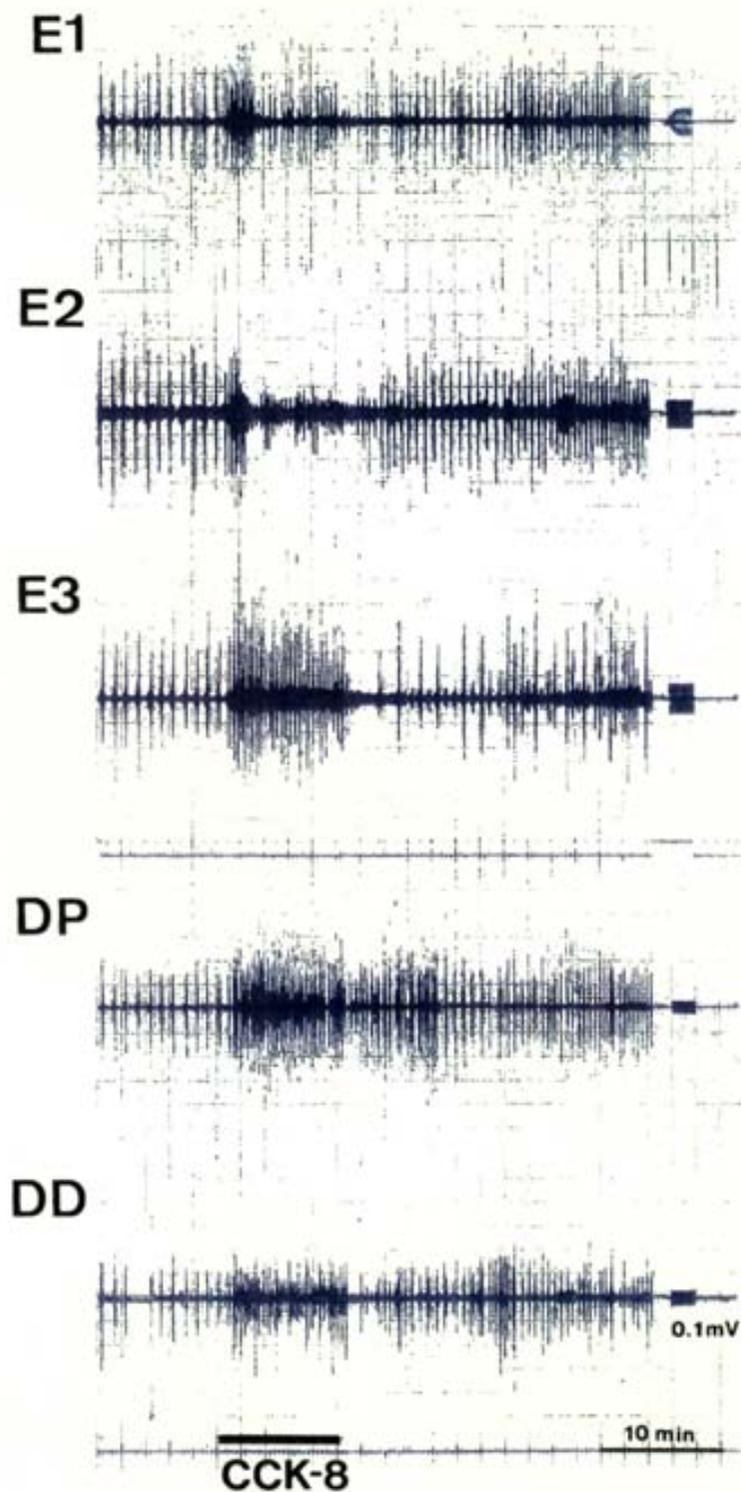


FIG: III.18 - Registro electromiográfico mostrando la acción de la infusión de CCK-8 (10^{-9} moles/Kg/10 min) sobre la actividad eléctrica gastroduodenal en un animal vagotomizado. Respuestas semejantes se observaron en todos los animales.

E1, compartimiento glandular del estómago; E2 y E3, músculos cráneo-dorsal y caudo-dorsal de compartimiento muscular del estómago respectivamente; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal.

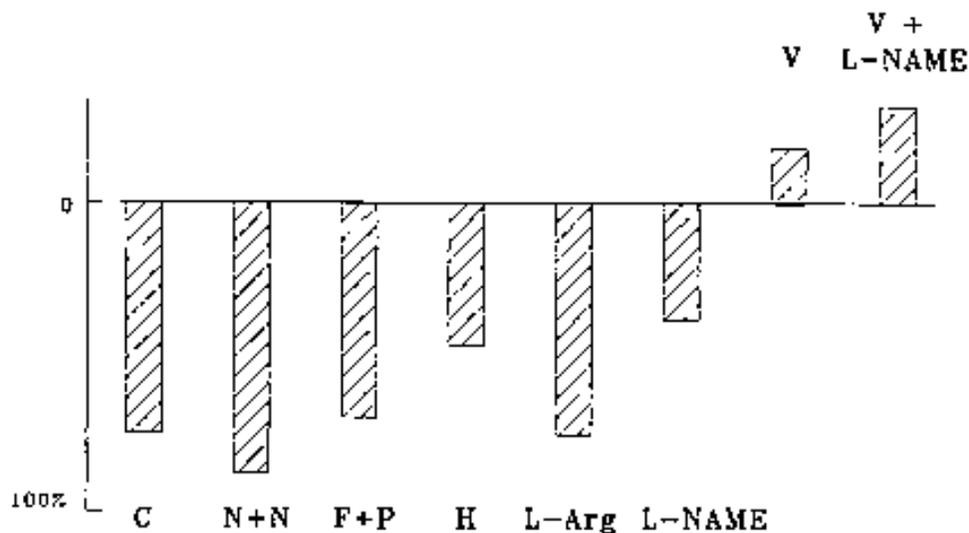


FIG. III.19 - Porcentaje de inhibición de la actividad eléctrica en el músculo cráneo-dorsal del compartimiento muscular del estómago durante el periodo de infusión de la CCK-8 (10^{-9} moles/kg/10 min) en diferentes situaciones experimentales: C, control; N+N, naltrindol+naloxona; F+P, fentolamina+propranolol; H, hexametonio; L-Arg, L-arginina; L-NAME; V, tras la vagotomía; V+L-NAME, vagotomía+L-NAME.

Así, cuando la actividad eléctrica total generada en las diferentes áreas gástricas durante los 10 min de perfusión del péptido se comparó con el mismo parámetro en los animales no vagotomizados las diferencias fueron altamente significativas: $p < 0,002$ para el compartimiento glandular, $p < 0,05$ para el músculo cráneo-dorsal y $p < 0,002$ para el músculo caudo-dorsal del compartimiento muscular (Figs. III, 16 y III. 19). Además, en el músculo caudo-dorsal del compartimiento muscular se observó un incremento significativo de la frecuencia de contracciones respecto a la motilidad basal durante el período de infusión del péptido ($p < 0,01$) (Tabla III.4). La respuesta duodenal a la CCK-8 no fue modificada por la vagotomía.

3.3.3 - Efectos del hexametonio sobre las acciones de la CCK-8 en la motilidad gastroduodenal.

El hexametonio produjo una reducción en la frecuencia de las contracciones de todas las áreas estudiadas (Fig. III.20). Cuando la CCK-8 fue infundida 10 min tras la administración del hexametonio se observó un

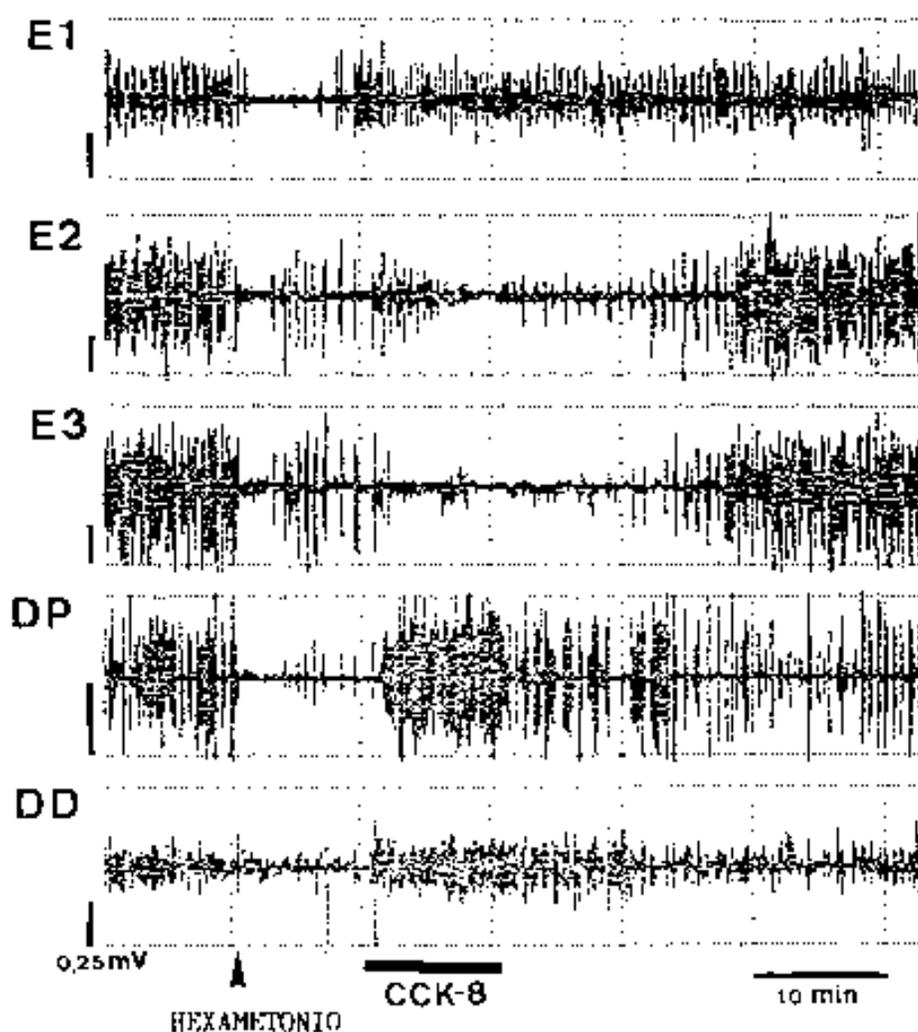


FIG: III.20 - Registro electromiográfico mostrando el efecto del hexametonio (10 mg/kg) sobre la actividad eléctrica gastroduodenal y la respuesta a la infusión de CCK-8 (10^{-8} moles/Kg/10 min) en estas condiciones. Respuestas semejantes se observaron en todos los animales.

E1, compartimiento glandular del estómago; E2 y E3, músculos cráneo-dorsal y caudo-dorsal de compartimiento muscular del estómago respectivamente; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal

bloqueo parcial de la respuesta en el compartimiento glandular y en el músculo cráneo-dorsal del compartimiento muscular respecto a las respuestas obtenidas sin tratamiento previo con hexametonio (Fig. III.19). Durante los primeros 4-5 min de infusión de la CCK-8 se observó un aumento en la frecuencia de contracción en estos dos órganos. Sin embargo, el hexametonio no modificó la respuesta a la CCK-8 en el músculo caudo-dorsal del compartimiento muscular del estómago (Fig. III.20 y Tabla III.4).

En el duodeno, el hexametonio no bloqueó la respuesta a la CCK-8 y además, en el duodeno distal, se observó un incremento significativo en la hiperactividad eléctrica observada ($p < 0,01$).

3.3.4 - Efectos de los antagonistas opioides sobre las acciones de la CCK-8 en la motilidad gastroduodenal.

Por sí mismos, ni el antagonista μ -opioides naloxona ni el δ -opioides naltrindol modificaron la actividad basal del área gastroduodenal cuando fueron administrados por separado o conjuntamente. Cuando la CCK-8 se perfundió 10 min después a la administración de los antagonistas la respuesta motora gastroduodenal no se vio modificada (Fig. III.19).

3.3.5 - Efectos de los antagonistas adrenérgicos sobre las acciones motoras de la CCK-8 en la motilidad gastroduodenal

Los antagonistas adrenérgicos fentolamina y propranolol administrados conjuntamente no modificaron por sí mismos la motilidad gastroduodenal y tampoco modificaron la respuesta a una infusión de CCK-8 10 min tras su administración (Fig. III.19).

3.3.6 - Efectos de la atropina sobre las acciones de la CCK-8 en la motilidad gastroduodenal.

La atropina modificó la motilidad gastroduodenal produciendo una abolición de la actividad motora de las áreas gástricas estudiadas y una

TABLA III.4 - FRECUENCIA (ciclos/10 min) OBSERVADA EN LAS DIFERENTES AREAS GASTRICAS EN DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES: durante los 10 min anteriores (BASAL) y los 10 min de la infusión de CCK-8 (10^{-9} moles/kg/10min) (CCK-8).

		E1	E2	E3
CONTROL	BASAL	37,1±2,4	35,6±2,6	35,9±2,6
	CCK-8	3,8±0,7 ***	3,4±1,0 ***	2,1±0,6 ***
L-NAME	BASAL	14,9±2,5	19,2±3,6	21,0±5,4
	CCK-8	14,6±2,6	17,4±3,1	12,4±4,3
VAGOTOMIA	BASAL	24,9±2,0	14,7±1,9	13,4±1,6
	CCK-8	31,4±4,5	15,0±6,0	25,2±2,9 **
VAGOTOMIA + L-NAME	BASAL	22,4±2,5	17,2±3,2	17,2±3,4
	CCK-8	28,0±4,1 *	30,6±1,9 **	26,8±1,6 **
HEXAMETONIO	BASAL	2,0±0,1	8,3±2,2	8,3±2,8
	CCK-8	19,0±5,7 **	17,0±3,7 **	12,3±6,0

E1: compartimiento glandular; E2: músculo cráneo-dorsal del compartimiento muscular; E3: músculo caudo-dorsal del compartimiento muscular.

*, **, ***: Incrementos o decrementos significativos ($p < 0.5$, 0.01 y 0.001 respectivamente) de la frecuencia durante la infusión de CCK-8, respecto a la frecuencia basal, de acuerdo con el test U de Mann-Whitney.

reducción parcial de la actividad duodenal; en casos aislados aparecieron hiperactividades de corta duración en el duodeno distal. La abolición de la actividad gástrica se prolongó 30-45 min post-administración y durante este período la administración de CCK-8 no produjo ningún tipo de cambio en este estado. En el duodeno, la CCK indujo una hiperactividad no significativamente diferente de la observada durante una infusión control.

3.3.7 - Efectos de la L-Arg y del L-NAME sobre las acciones motoras de la CCK-8 en la motilidad gastroduodenal.

La infusión de L-NAME alteró el patrón basal de motilidad gastroduodenal. La actividad eléctrica duodenal media durante los 30 min de infusión mostró un incremento significativo respecto a la motilidad basal ($p < 0,02$ para el duodeno proximal y $p < 0,01$ para el distal) (Fig. III.17). Este incremento en la actividad se debía a un cambio en el patrón de motilidad duodenal. Durante el tiempo de infusión aparecieron hiperactividades duodenales, semejantes a fases III duodenales del MMC, que migraban de la zona proximal del duodeno a la distal. Estas hiperactividades se alternaban con fases de actividad reducida (Fig. III.21). A nivel gástrico se observó un descenso en la frecuencia de contracciones en todas las áreas estudiadas ($p < 0,001$ para el compartimiento glandular, $p < 0,001$ para el músculo cráneo-dorsal y $p < 0,01$ para el caudo-dorsal del compartimiento muscular) (Tabla III.4) y una reducción significativa en la actividad eléctrica total generada en estas áreas, respecto al período basal (Figs. III.16 y III.21).

El L-NAME produjo un bloqueo significativo de la respuesta inhibitoria producida por la infusión de CCK-8 en situación control tanto en el compartimiento glandular ($p < 0,001$) como en el músculo cráneo-dorsal del compartimiento muscular ($p < 0,01$) (Figs. III.16 y III.19). En estas áreas se observó además un aumento en la frecuencia de contracción durante los primeros 7-8 min de infusión, tras los cuales las respuestas inhibitorias se hacían evidentes. Esto hace que la frecuencia total de contracción durante los 10 minutos de infusión de la CCK-8 no cambie de forma significativa en relación al período de infusión del L-NAME (Tabla III.4). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la respuesta a la infusión de CCK-8 en el músculo caudo-dorsal del compartimiento muscular (Fig. III.16).

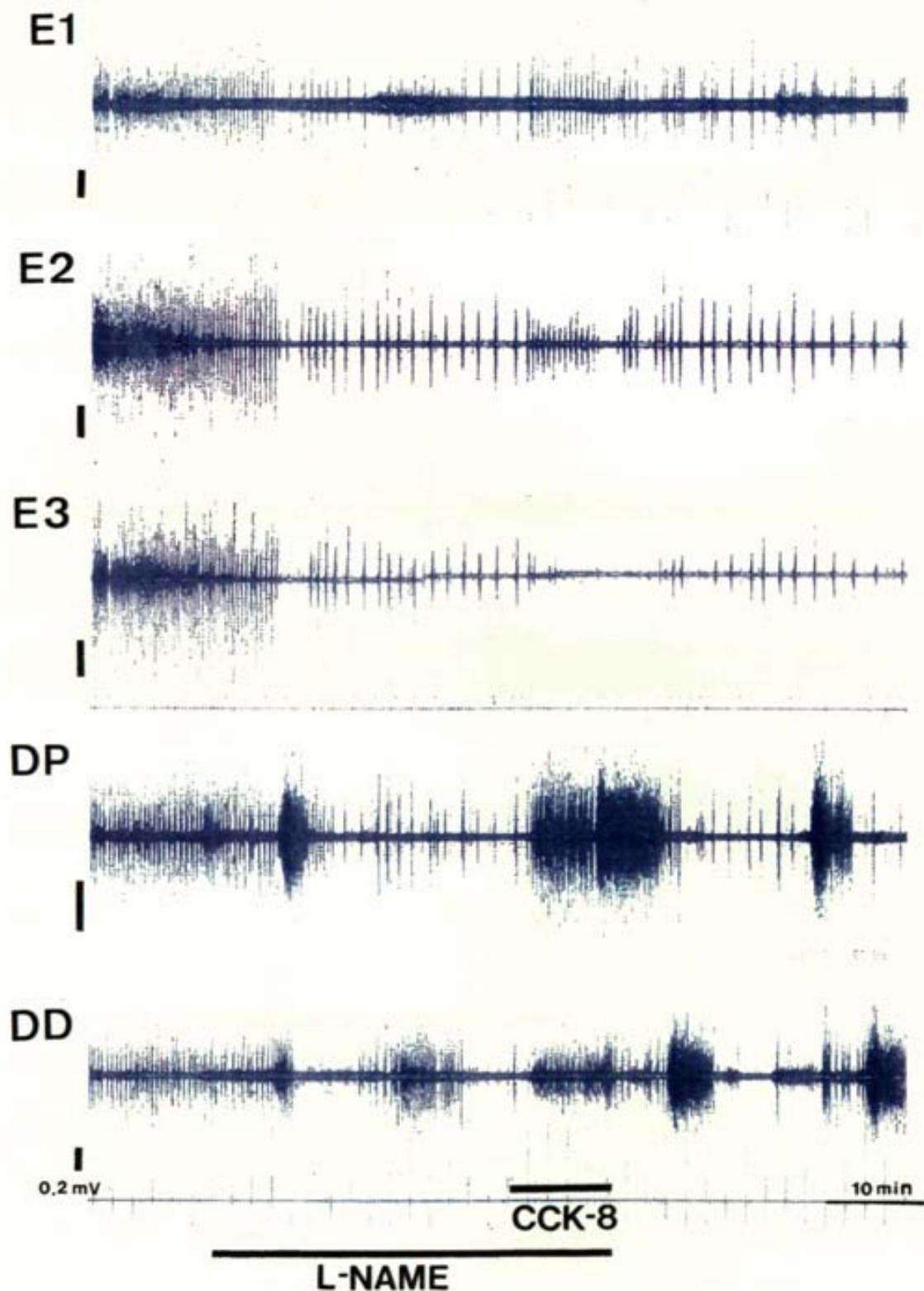


FIG: III.21 - Registro EMG de la actividad gastroduodenal: efecto de una infusión de L-NAME (2×10^{-4} moles/kg/40 min) y respuesta a la infusión de CCK-8 (10^{-9} moles/Kg/10 min) en estas condiciones. Respuestas semejantes se observaron en todos los animales.

E1, compartimiento glandular del estómago; E2 y E3, músculos cráneo- y caudo-dorsal del compartimiento muscular del estómago respectivamente; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal.

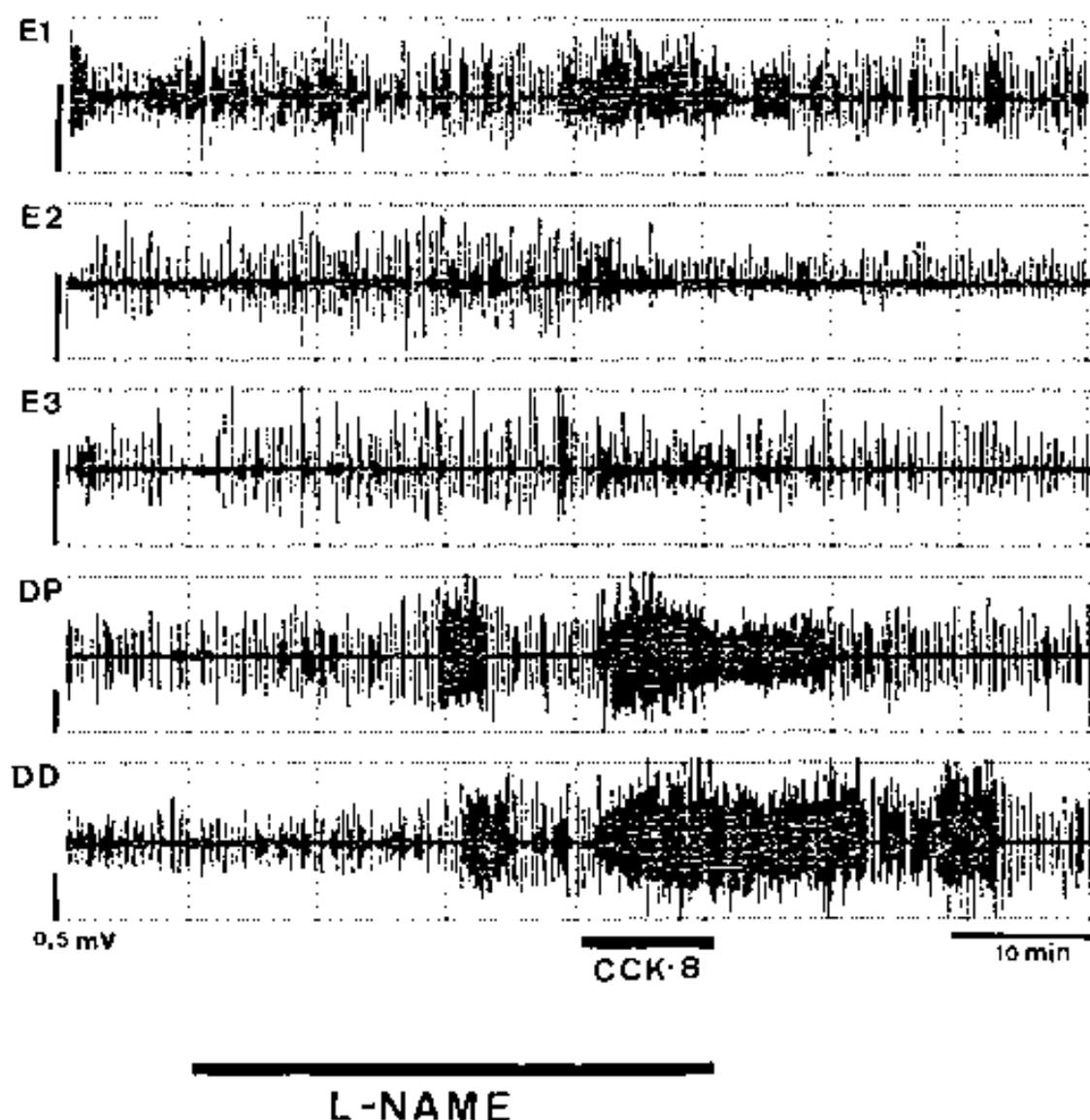


FIG: III,22 - Registro electromiográfico de la actividad gastroduodenal mostrando el efecto de una infusión de L-NAME (2×10^{-4} moles/kg/40 min) y la respuesta a la infusión de CCK-8 (10^{-9} moles/Kg/10 min) en estas condiciones, en un pollo vagotomizado. Respuestas semejantes se observaron en todos los animales.

E1, compartimiento glandular del estómago; E2 y E3, músculos cráneo-dorsal y caudo-dorsal de compartimiento muscular del estómago respectivamente; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal.

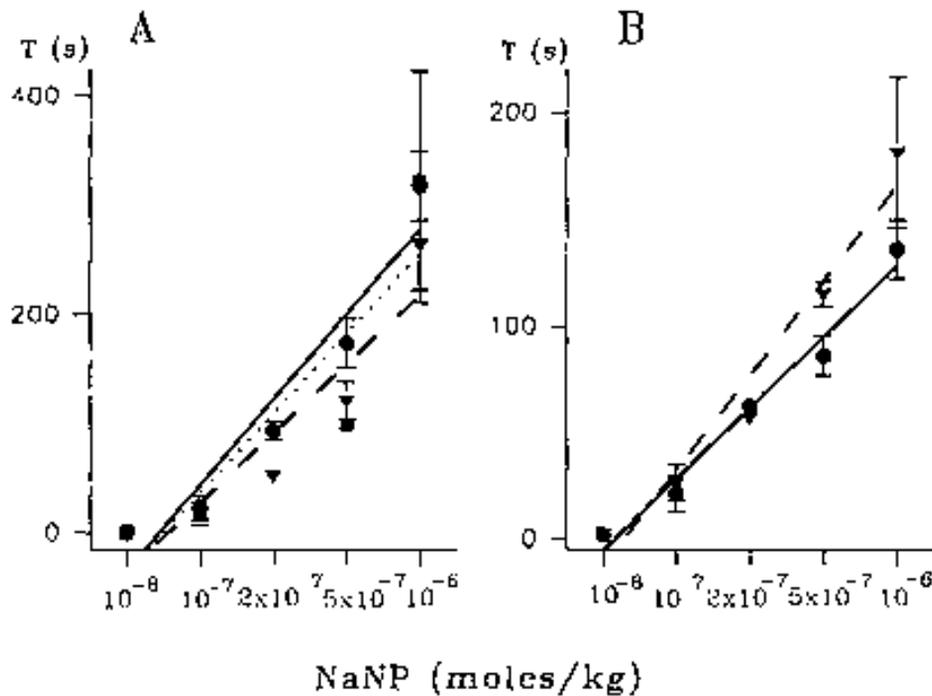


FIG. III.24 - Curvas dosis efecto para el nitroprusiato sódico en: (A) estómago : (●) compartimiento glandular , músculos cráneo-dorsal y caudo -dorsal (▼ , ■) del compartimiento muscular y (B) duodeno proximal (●-●) y distal (▼-▼).

En el duodeno, el L-NAME incrementó de forma significativa las respuestas excitatorias inducidas por la infusión de CCK: $p < 0,05$ para el duodeno proximal y $p < 0,02$ para el distal (Fig. III.17).

En los animales vagotomizados, el L-NAME no modificó significativamente la motilidad gástrica y en el duodeno en 2 de las 5 experiencias realizadas se observó la presencia de hiperactividades migratorias semejantes a las observadas en los animales no vagotomizados. La infusión de CCK-8 en estas condiciones indujo un incremento significativo de la frecuencia de contracción en todas las áreas gástricas ($p < 0,05$ para el compartimiento glandular y $p < 0,01$ tanto para el músculo cráneo-dorsal como para el caudo-dorsal del compartimiento muscular) (Tabla III.4 y Fig III.19). Respecto a la respuesta duodenal, la infusión de L-NAME potenció la hiperactividad duodenal en su zona proximal ($p < 0,05$) pero no en la distal (Fig. III.22).

La infusión de L-Arg no modificó ni la motilidad basal gastroduodenal ni las respuestas motoras debidas a la infusión de CCK-8 (Figs. III.16, III.17 y III.19).

3.3.8 - Acciones del NaNP sobre la motilidad gastroduodenal.

El NaNP a la dosis de 10^8 moles/kg no modificó la motilidad gastroduodenal. Las dosis entre 10^7 y 10^6 moles/kg indujo una inhibición total de la actividad eléctrica tanto gástrica como duodenal. La duración de esta abolición de la actividad fue dosis-dependiente (Fig. III.23). Para determinar la correlación dosis-efecto se estimó el tiempo de abolición total de la actividad eléctrica y con estos valores se realizaron curvas dosis-efecto para cada órgano. En todas las áreas estudiadas se halló una correlación dosis-efecto altamente significativa ($p < 0,02$ para todos los órganos) (Fig. III.24).

Tras la administración de las dosis más altas de NaNP (5×10^7 y 10^8 moles/kg) se observaron hiperactividades duodenales de corta duración (3-4 min), migrando aboralmente desde el duodeno proximal al distal (Fig. III.23).

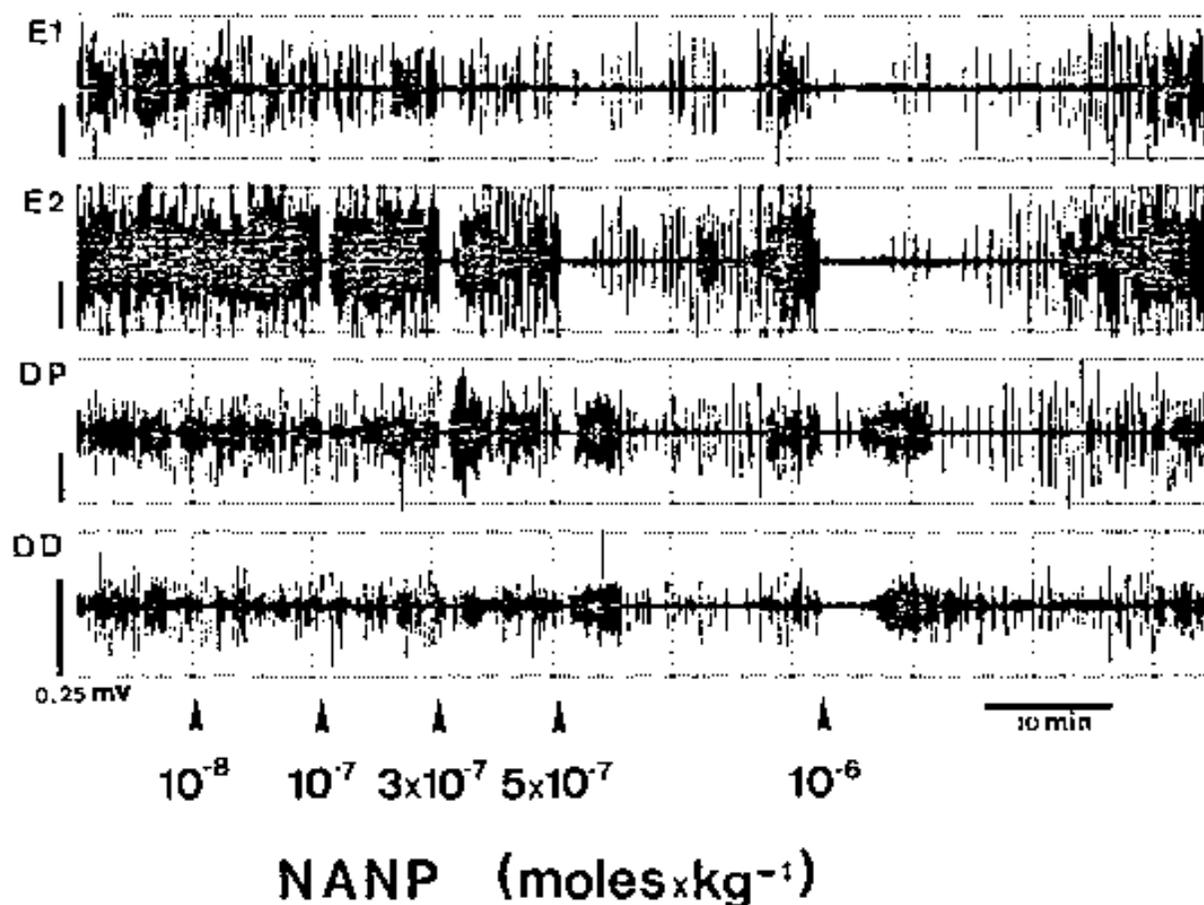


FIG: III.23 - Registro electromiográfico de la actividad gastroduodenal mostrando el efecto del nitroprusiato sódico sobre las actividades gástrica y duodenal.

E1, compartimiento glandular del estómago; E2, músculo cráneo-dorsal del compartimiento muscular del estómago; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal.

4 - ACCIONES DE LOS PEPTIDOS DE LA FAMILIA GASTRINA-CCK SOBRE LA ACTIVIDAD MOTORA INTESTINAL

4.1 - OBJETIVOS

En los mamíferos, los péptidos de la familia gastrina-CCK participan en el control fisiológico de la motilidad intestinal, y parecen estar implicados en los cambios de la misma que se presentan entre el período de ayunas y el período postprandial. El paso de la motilidad de ayunas a la postprandial se debe a la ingestión de nutrientes y a su presencia en el tracto digestivo. Estos, según parece, actúan a través de la liberación postprandial de hormonas gastrointestinales (entre ellas la gastrina y la CCK).

En las aves, la organización de la motilidad del intestino delgado en forma de complejos mioeléctricos migratorios, como en los mamíferos, ha sido descrita recientemente y, no se ha estudiado la participación de los péptidos de la familia gastrina-CCK en su regulación.

De acuerdo con estos antecedentes, los objetivos de este experimento han sido:

- A - Estudiar el papel de la CCK en la regulación de los complejos mioeléctricos migratorios (MMCs), durante el período postprandial.
- B - Estudiar el papel de la CCK en la regulación de los MMCs en período de ayunas.
- C - Estudiar el papel de la gastrina del pollo en la regulación de los MMCs.

Para alcanzar estos objetivos se han realizado estudios de la actividad eléctrica del intestino delgado en diferentes condiciones experimentales, analizando posteriormente los cambios provocados en los parámetros más característicos de la motilidad intestinal.

4.2 - MATERIAL Y METODOS

4.2.1 - Animales de experimentación: estabulación y mantenimiento.

Este punto se corresponde con el descrito anteriormente en el apartado 2.2.1 (pág. 96). Para la realización de este trabajo se emplearon 17 animales.

4.2.2 - Preparación de los animales de experimentación.

4.2.2.1 - Implantación quirúrgica de los electrodos.

Los protocolos básicos correspondientes a este punto son iguales a los descritos en el apartado 2.2.2.1 (pág. 97).

Para este experimento los animales fueron implantados con 8 triplete de electrodos, en las siguientes localizaciones:

- 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 (duodeno proximal) (7 cm del píloro).
- Rama ascendente del asa duodenal (duodeno distal) (19 cm del píloro).
- Yeyuno (60 cm del píloro y 10 pre-divertículo vitelino).
- Ileon proximal (80 cm del píloro y 10 post-divertículo vitelino).
- Ileon distal (100 cm del píloro y 11 de la unión ileo-ceco-cólica).

La posición de los electrodos fue determinada en la necropsia de los animales. La longitud total del intestino (píloro-cloaca) en los animales fue de 124 ± 6 cm (media \pm SEM).

4.2.2.2 - Cateterización.

La implantación del catéter venoso para la infusión de péptidos ha sido anteriormente descrita en el punto 2.2.2.2 (pág. 99).

4.2.3 - Registros electromiográficos y análisis.

Las características generales del sistema de registro son las mismas a las descritas en el punto 2.2.3 (pág. 100). En este caso, sin embargo, los registros se iniciaron a los 21 días de la implantación de los electrodos, ya que experimentos previos demostraron que se requería, al menos, este período de tiempo para que la motilidad intestinal se recuperase totalmente. El tiempo de registro fue variable de acuerdo con cada protocolo seguido.

El análisis de los registros se realizó únicamente por integración de los mismos en intervalos de tiempo de 1 min.

4.2.4 - Tratamiento de los resultados

Sobre los ficheros numéricos obtenidos del proceso de integración se diferenciaban manualmente las tres fases del MMC. Los siguientes parámetros característicos del MMC fueron calculados:

- Duración total en cada área intestinal estudiada.
- Duración de cada una de sus fases en todas las áreas del intestino.
- Velocidad global de propagación del frente de acción (fase III).
- Velocidad parcial de propagación de la fase III entre electrodos consecutivos.

4.2.5 - Sustancias empleadas

Las sustancias empleadas en esta experiencia fueron los péptidos de la familia gastrina-CCK CCK-8 y cG, con iguales características a las descritas en el punto 2.2.5 (pág. 102).

4.2.6 - Protocolo experimental.

Cuando se valoró la acción de los péptidos gastrina-CCK sobre la motilidad intestinal en período postprandial, tanto la CCK-8 como la cG fueron

administradas a los animales de forma randomizada con un tiempo de perfusión de 2 h y un volumen total perfundido de 2 ml. Las dosis de las diferentes sustancias empleadas fueron:

- CCK-8 : 10^{-11} (n=6), 3×10^{-11} (n=5) y 10^{-10} moles/kg min^{-1} (n=5).
- cG : 10^{-10} moles/kg min^{-1} (n=5).

Antes de la perfusión se registró al menos un MMC completo y ésta se inició 10 min después de haberse registrado una fase III clara en el electrodo del intestino delgado en posición más craneal (yeyuno). A partir de este momento el registro se prolongó durante 4 h más, 2 correspondientes al período de perfusión y 2 como período de recuperación post-perfusión.

En todos los animales se realizó además un registro control, de aproximadamente 4 horas de duración, durante el cual no se perfundió ninguna sustancia.

A fin de mimetizar el estado postprandial mediante el empleo de CCK, un grupo de animales (n=6) se dejó en ayunas 18 h antes de realizar los registros EMG. En este caso se realizaron registros de aproximadamente 3 h previas a la infusión de CCK-8 (6×10^{-11} moles/kg h^{-1} x3h) y ésta se inició 10 min después de registrarse una fase III clara en el electrodo más proximal del intestino delgado. A partir de estos registros se caracterizó el MMC en estado de ayunas y durante la perfusión de la CCK-8. Los parámetros valorados fueron los mismos que los enumerados en el punto 4.2.4, valorándose además el punto anatómico de origen del MMC. Los resultados obtenidos durante el período de infusión fueron comparados con los correspondientes a las fases de ayuno y a los obtenidos en estado postprandial mediante un test t de Student o el test no paramétrico U de Mann-Whitney según los parámetros estudiados.

4.3 - RESULTADOS

4.3.1 - Motilidad intestinal en ayunas y en período postprandial.

Los registros electromiográficos obtenidos revelaban la presencia de una motilidad intestinal organizada en forma de MMCs en todo el intestino delgado, migrando desde las áreas más proximales hasta la unión íleo-cecocolica. La organización en forma de MMCs se encontraba tanto en estado de ayunas como en estado postprandial. En estos MMCs podían distinguirse claramente las mismas tres fases descritas en los mamíferos (Fig. III.25).

En estado postprandial, la duración de los MMCs mostró una alta homogeneidad, siendo aproximadamente de 60 min en todas las áreas del intestino delgado estudiadas. La duración de las tres fases del MMC fue muy similar en todas las áreas del intestino delgado estudiadas, siendo de aproximadamente 20 min para la fase I, de 30 min para la II y de 4 min para la III (Tabla III.5). La velocidad de migración de la fase III, tanto parcialmente considerada entre dos electrodos consecutivos como la global, mostró también una alta homogeneidad (Fig. III.26), oscilando entre 0,6 y 0,7 cm/min. En estas condiciones, el 57% de los MMCs se iniciaron a nivel duodenal y el 40% en el yeyuno (Fig. III.27). El inicio de un MMC a nivel duodenal coincidía con un descenso en la frecuencia gástrica que duraba aproximadamente el mismo período que la hiperactividad duodenal, recuperándose la coordinación gastroduodenal inmediatamente tras esta hiperactividad (Fig. III.25).

En ayunas, aproximadamente el 90% de los MMCs se originaron a nivel gástrico (Fig. III.27). En estos casos el estómago mostraba un incremento de su actividad previa a la aparición de una fase III duodenal y además, la actividad gástrica se mantenía durante dicha hiperactividad (Fig. III.28). En este caso la duración del MMC oscilaba aproximadamente entre los 70 y los 90 min, y aparecía significativamente alargado, respecto al estado postprandial, tanto en el íleon proximal ($p = 0,01$) como en el distal ($p < 0,05$).

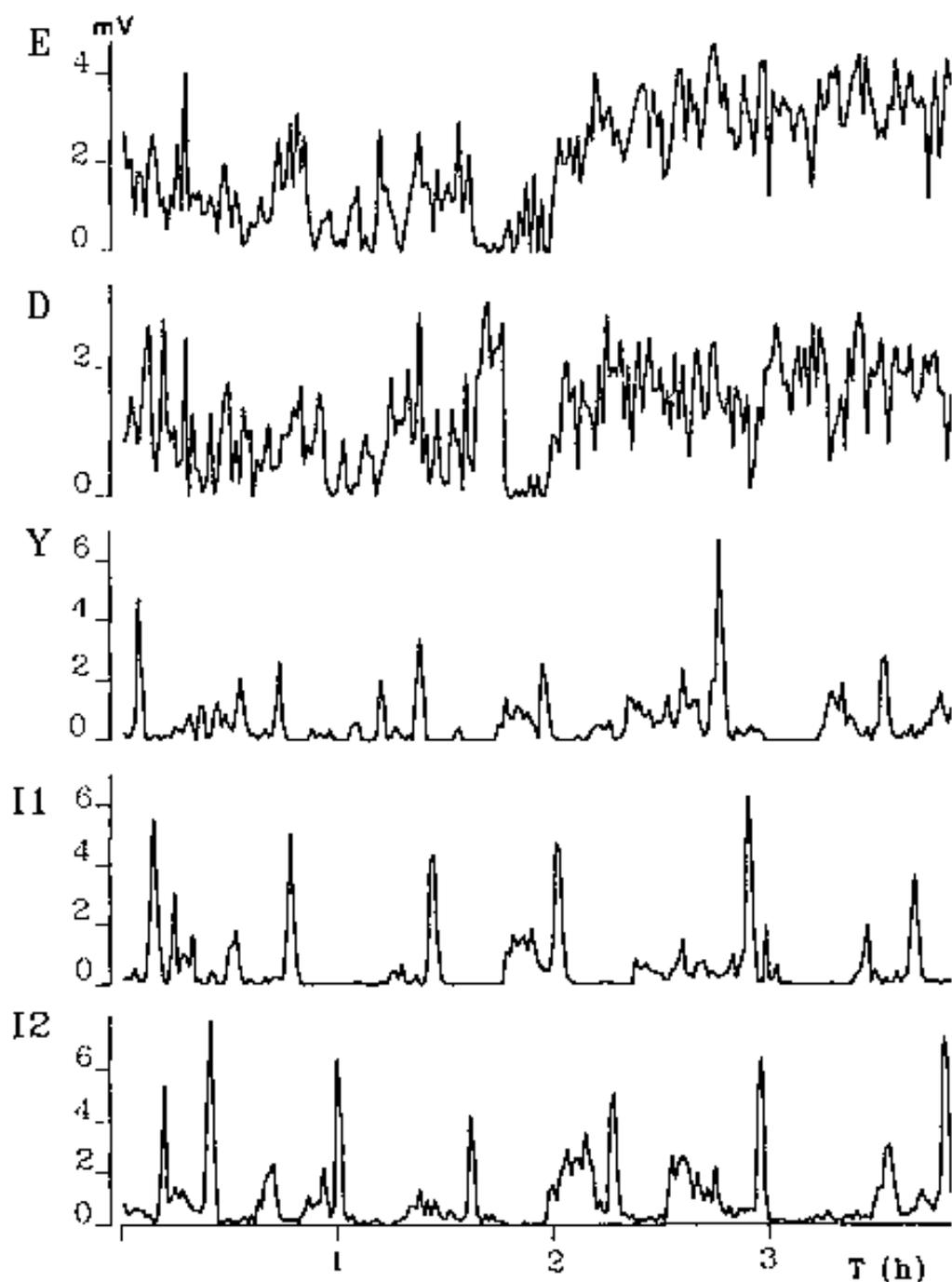


FIG. III.25 - Registro integrado de la actividad eléctrica gastrointestinal en un pollo en estado postprandial, mostrando la organización de la motilidad del intestino en forma de MMCs.

E, músculo cráneo-dorsal del compartimiento muscular del estómago; D, duodeno distal; Y, yeyuno; I1 e I2, íleon proximal y distal respectivamente.

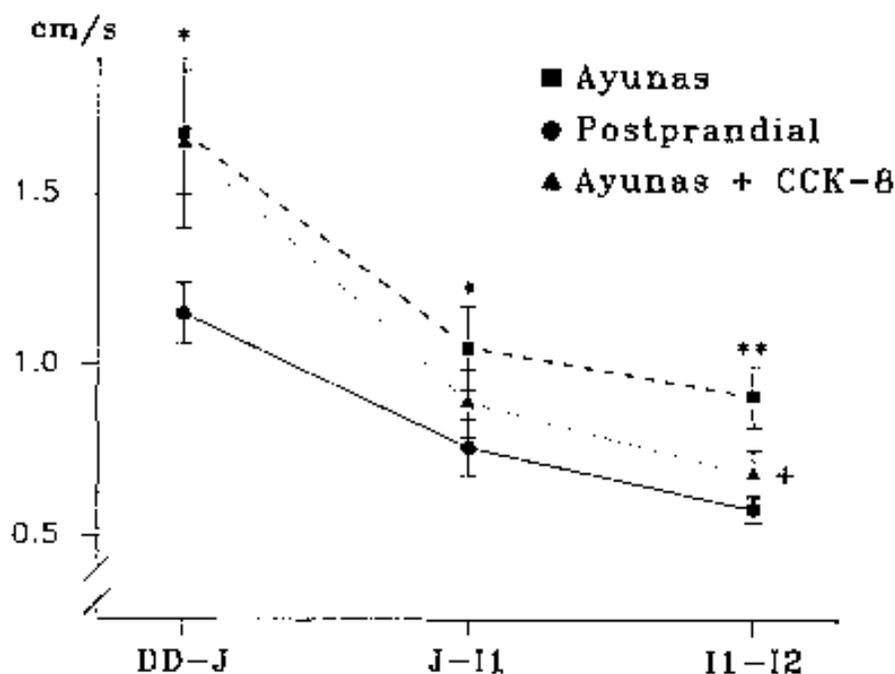


FIG. III.26 - Velocidad de propagación de la fase III del MMC en diferentes condiciones experimentales.

DD-J, velocidad de propagación entre el duodeno distal y el yeyuno; J-I1, velocidad de propagación entre el yeyuno y el íleon proximal; I1-I2, velocidad de propagación entre el íleon proximal y el distal.

Los datos están expresados como media \pm SEM.

*, **, diferencias significativas con el estado postprandial ($p < 0,05$ y $0,01$ respectivamente, de acuerdo con el test t de Student).

+, diferencias significativas con el estado de ayunas ($p < 0,05$, de acuerdo con el test t de Student).

La duración de la fase I fue aproximadamente de 50 min, estando significativamente alargada, respecto al período postprandial, tanto en el yeyuno como en el íleon. La duración de la fase II fue de aproximadamente 24 min. y estaba significativamente acortada respecto al período postprandial tanto en el íleon proximal como en el distal pero no en el yeyuno donde el acortamiento no llegó a ser estadísticamente significativo. La duración de la

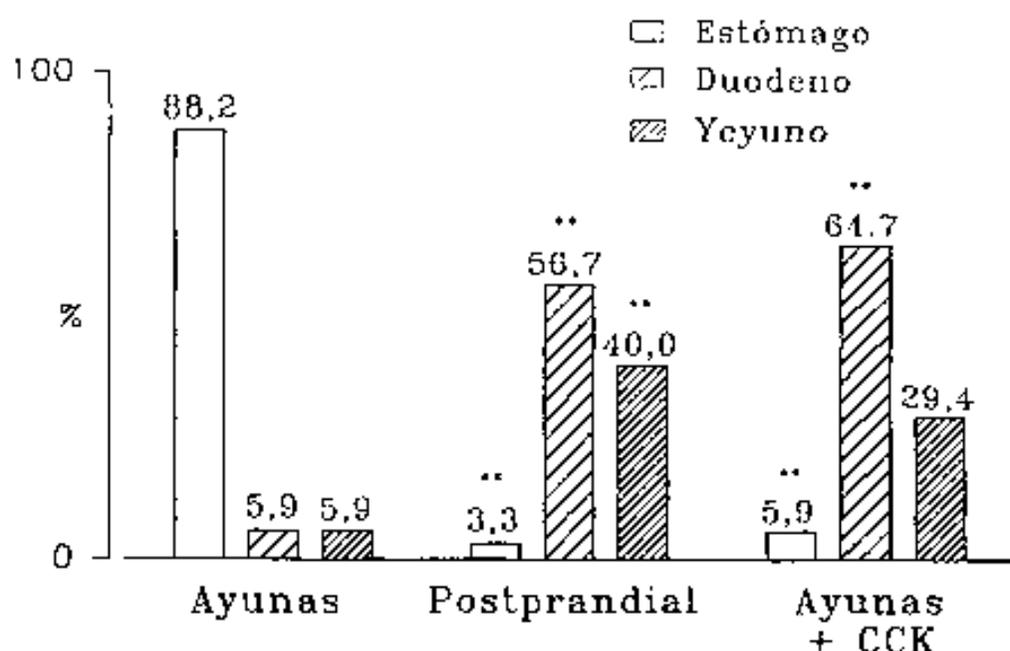


FIG. III.27 - Porcentaje de MMCs originados en estómago, duodeno o yeyuno en las diferentes condiciones experimentales.

** , diferencias significativas con la misma área anatómica durante el estado de ayunas ($p < 0.01$ de acuerdo con el test U de Mann-Whitney).

fase III fue también muy constante, oscilando entre los 5 y los 7 min según el área intestinal considerada y estaba alargada significativamente con respecto al período postprandial en el yeyuno y en el ileon proximal, pero no en el distal (Tabla III.5). La velocidad de propagación de la fase III apareció significativamente incrementada, en todas las áreas consideradas, respecto al estado postprandial (Fig. III.26).

4.3.2 - Efecto de la CCK sobre la motilidad intestinal en ayunas.

Durante la perfusión de CCK (6×10^{-11} moles/kg/h x 3h) en animales mantenidos en ayunas durante 18 h antes del experimento, aproximadamente el 60% de los MMCs se originó a nivel duodenal, el 30% a nivel yeyunal y sólo el 6% a nivel gástrico (Fig. III.27). En los MMCs originados a nivel duodenal no se encontró participación del estómago (Fig. III.28).

Durante la perfusión de CCK la duración total del MMC osciló entre los 60 y los 90 min según el área considerada (Tabla III.5). En general, su duración se redujo, respecto al estado de ayunas, en todas las áreas intestinales estudiadas. Los resultados obtenidos no mostraron en ningún caso diferencias significativas con los correspondientes al período postprandial. Cuando se analizó la duración de las tres fases del MMC se encontró una tendencia al acortamiento de la fase I y al alargamiento de la II respecto al estado de ayunas. De forma similar, en general, la fase I aparecía más larga y la dos más corta que en período postprandial. La duración de la fase III sólo se alteró de forma significativa en el yeyuno, en el cual apareció significativamente alargada con respecto al período postprandial.

La velocidad de migración de la fase III durante la perfusión de CCK apareció reducida respecto al período de ayunas, pero esta reducción sólo fue significativa para la propagación entre el íleon proximal y el distal. En ningún caso se encontraron diferencias significativas entre las velocidades de migración durante el período de perfusión de la CCK y las correspondientes al estado postprandial (Fig. III.26).

En general la perfusión de CCK en animales en ayunas transformó los parámetros característicos del MMC desde los propios del estado de ayunas a unos cercanos a los del período postprandial.

TABLA III.5 - DURACION DEL MMC Y SUS FASES (min) EN AYUNAS Y EN PERIODO POSTPRANDIAL. EFECTO DE LA INFUSION DE CCK-8 EN AYUNAS.

	POSTPRANDIAL	AYUNAS	AYUNAS + CCK-8
DUODENO			
Duración total		69,9±5,99	67,8±7,80
YEYUNO			
Duración total	62,2±5,76	74,9±7,30	70,7±7,50
Fase I	19,3±1,79	45,0±8,50; **	37,5±5,60; **
Fase II	35,5±5,60	24,6±4,60	25,0±3,00
Fase III	4,9±0,27	6,6±0,30; ***	6,2±0,40; *
ILEON PROX.			
Duración total	55,4±10,30	93,5±7,60; **	71,0±7,3; +
Fase I	22,4±4,91	59,1±6,20; ***	30,7±5,10; +++
Fase II	33,5±3,53	24,1±2,70; *	32,4±3,10; +
Fase III	4,3±0,40	5,8±0,40; *	5,2±0,50
ILEON DISTAL			
Duración total	66,6±7,00	94,4±9,70; *	82,5±11,10
Fase I	16,3±0,94	53,0±10,80; **	33,5±6,40; *
Fase II	45,6±5,99	24,3±2,80; **	29,8±4,10; *
Fase III	4,64±0,40	5,5±0,40	5,7±0,50

*, **, ***: p<0,05, 0,01 y 0,001 respecto al estado postprandial (t de Student).

+, ++, +++: p<0,05, 0,01 y 0,001 respecto al estado de ayunas (t de Student).

Los datos están expresados como media±SEM.

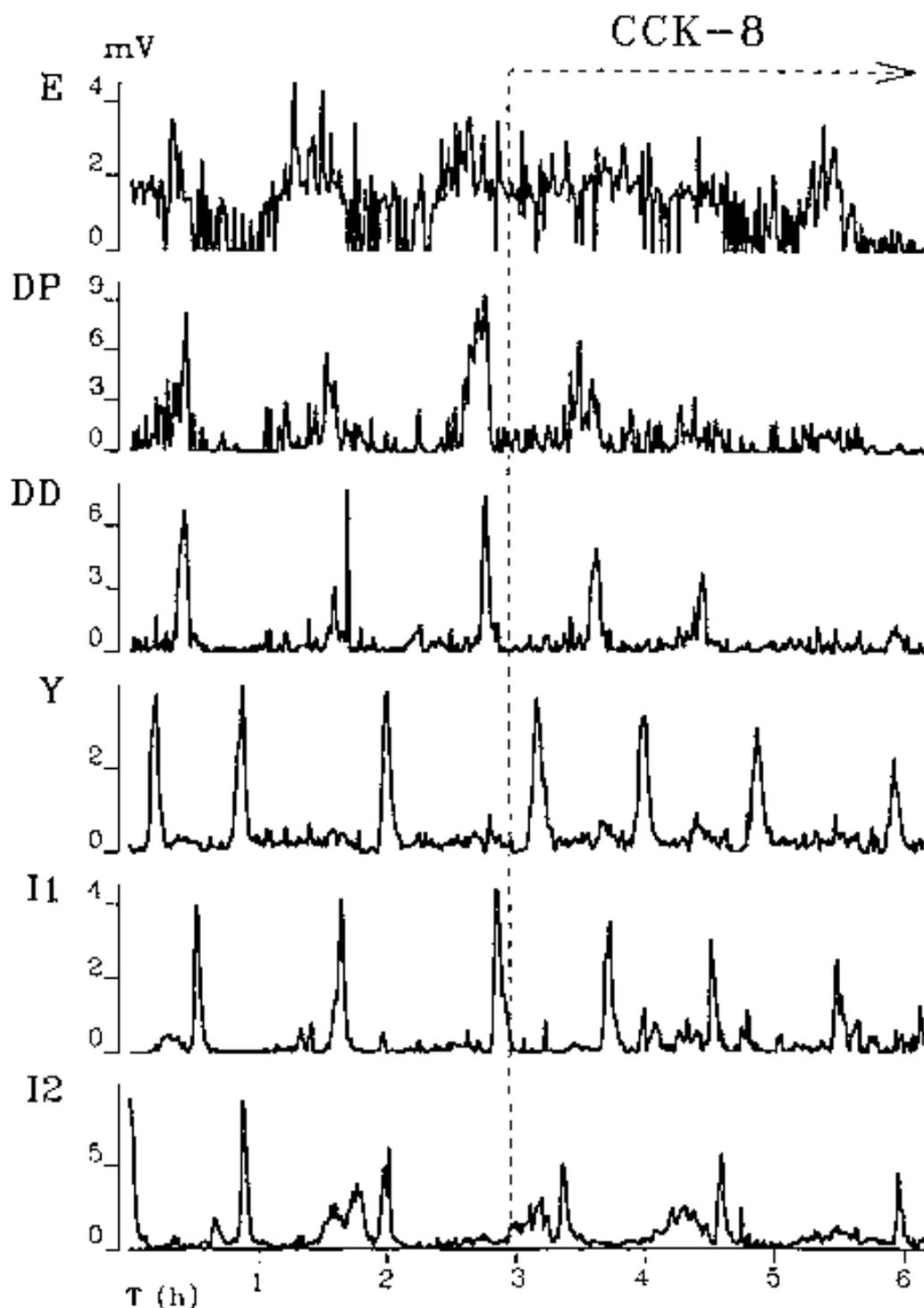


FIG. III.28 - Registro integrado de la actividad eléctrica gastrointestinal en un pollo en ayunas mostrando el efecto de la infusión de CCK-8 (6×10^{-12} moles/kg/h x 3h) sobre la misma.

E, músculo cráneo-dorsal del compartimiento muscular del estómago; DP y DD, duodeno proximal y distal respectivamente; Y, yeyuno; I1 e I2, ileon proximal y distal respectivamente.

TABLA III.6 - DURACIÓN DEL MMC (min) EN ESTADO POSTPRANDIAL (CONTROL) Y DURANTE LA PERFUSION DE CCK-8 Y cG.

	YEYUNO	ILEON PROXIMAL	ILEON DISTAL
CONTROL	60,1±4,6 n=30	56,1±4,8 n=24	61,4±3,9 n=34
cG (10 ⁻¹⁰ moles/kg/min)	84,1±7,5 n=9	67,0±3,1 n=7	64,3±6,8 n=12
CCK-8 (10 ⁻¹¹ moles/kg/min)	63,2±7,4 n=13	72,3±11,5 n=8	102,8±14,7 n=6, ***
CCK-8 (3x10 ⁻¹¹ moles/kg/min)	91,8±17,9 n=6, *	93,0±14,9 n=7, **	-
CCK-8 (10 ⁻¹⁰ moles/kg/min)	Disrupción	Disrupción	Disrupción

Los datos están expresados como media±SEM.

*, **, ***: p<0,05, p<0,01 y p<0,001 respectivamente (test t de Student).

4.3.3 - Efectos de la CCK-8 sobre la motilidad intestinal en estado postprandial.

El efecto de la CCK-8 sobre los MMCs fue de tipo dosis-dependiente. La dosis de 10⁻¹¹ moles/kg/min x 2h no alteró la duración total del MMC ni en el yeyuno ni en el íleon proximal, aunque en esta zona se observó una tendencia, no significativa, al alargamiento del mismo (Fig. III.29). Sin embargo, esta tendencia a la elongación sí que fue significativa en el íleon distal (p<0,001) (Tabla III.6). Por fases, ni la duración de la fase I (Tabla III.7) ni la de la III (Tabla III.9) fueron modificadas en ninguna área de las estudiadas, sin embargo la fase II apareció alargada de forma significativa

tanto en el yeyuno proximal ($p < 0,05$) como en el distal ($p < 0,02$) (Tabla III.8). Ni la velocidad global de migración de la fase III ni las velocidades parciales entre electrodos consecutivos fueron alteradas de forma significativa por esta dosis de CCK-8 (tabla III.10).

La CCK-8, a una dosis de 3×10^{-11} moles/kg/min x 2h, produjo cambios significativos en la duración del MMC en todas las áreas del intestino delgado, observándose un alargamiento del mismo con una duración de entre 80 y 100 min según el área intestinal considerada (Fig. III.30). Este proceso de elongación del MMC era mucho más evidente a medida que el área intestinal considerada era más distal (Tabla III.6). En el íleon distal en ninguno de los casos llegó a registrarse un MMC completo durante las 2 horas de perfusión, sin embargo, sí que se registraron fases III migrando desde el íleon proximal y actividades tipo fase I y II. Cuando las fases del MMC eran evaluadas por separado se observó que en todas las áreas intestinales había un acortamiento significativo de la fase I (con una duración de entre 5 y 10 min, según el área considerada) (Tabla III.7) y un alargamiento de la fase II (con una duración de entre 65 y 80 min, también según el área intestinal considerada) (Tabla III.8). La duración de la fase III no se modificó de forma significativa en ninguna de las zonas estudiadas (Tabla III.9). Junto con este alargamiento del MMC se observó una reducción en la velocidad de propagación de la fase III tanto considerada globalmente ($p < 0,05$) como entre el íleon proximal y el distal ($p < 0,05$), pero no entre el yeyuno y el íleon proximal (Fig. III.29 y Tabla III.10).

El efecto de la CCK-8 a una dosis de 10^{-10} moles/kg/min x 2 h fue de interrupción del MMC en todas las áreas del intestino delgado durante todo el tiempo de infusión. Durante este período el intestino presentó una motilidad irregular y desorganizada, consistente en contracciones continuas de alta amplitud en todas las áreas sin una clara relación entre unas y otras (Fig. III.31).

4.3.4 - Efectos de la cG sobre la motilidad intestinal.

La infusión de cG a una dosis de 10^{-10} moles/kg/min durante un período de 2 h (Fig III.33) no modificó la duración global del MMC (Tabla III.6), ni de

nninguna de sus fases, en ninguna de las áreas intestinales (Tablas III.7, III.8 y III.9); ni tampoco la velocidad de migración de la fase III, tanto global como parcial entre electrodos consecutivos (Tabla III.10).

TABLA III.7 - DURACION DE LA FASE I DEL MMC (min) EN ESTADO POSTPRANDIAL (CONTROL) Y DURANTE LA PERFUSION DE CCK-8 Y cG.

	YEYUNO	ILEON PROXIMAL	ILEON DISTAL
CONTROL	22,3±2,4 n=18	20,8±1,3 n=19	21,9±1,7 n=20
cG (10 ⁻¹⁰ moles/kg/min)	26,4±4,5 n=8	19,6±1,2 n=8	24,5±3,8 n=10
CCK-8 (10 ⁻¹¹ moles/kg/min)	19,9±4,3 n=8	17,2±8,3 n=5	13,3±6,0 n=6
CCK-8 (3x10 ⁻¹¹ moles/kg/min)	11,8±5,0 n=6, *	5,3±2,6 n=7, ***	8,3±5,7 n=4, **
CCK-8 (10 ⁻¹⁰ moles/kg/min)	Disrupción	Disrupción	Disrupción

Los datos están expresados como media±SEM.

*, **, ***: p<0,05, p<0,01 y p<0,001 respectivamente, de acuerdo con el test t de Student.

TABLA III.8 - DURACION DE LA FASE II DEL MMC (min) EN ESTADO POSTPRANDIAL (CONTROL) Y DURANTE LA PERFUSION DE CCK-8 Y cG.

	YEYUNO	ILEON PROXIMAL	ILEON DISTAL
CONTROL	32,3±4,5 n=20	28,9±3,1 n=18	35,8±4,0 n=21
cG (10 ⁻¹⁰ moles/kg/min)	42,3±5,4 n=8	36,8±3,0 n=5	34,4±6,7 n=9
CCK-8 (10 ⁻¹¹ moles/kg/min)	29,5±5,0 n=8	45,0±8,7 n=5, *	64,8±15,3 n=4, *
CCK-8 (3x10 ⁻¹¹ moles/kg/min)	73,5±17,9 n=6, **	74,9±14,1 n=7, **	111,2±10,5 n=4, ***
CCK-8 (10 ⁻¹⁰ moles/kg/min)	Disrupción	Disrupción	Disrupción

Los datos están expresados como media±SEM.

*, **, ***: p<0,05, p<0,01 y p<0,001 respectivamente, de acuerdo con el test t de Student.

TABLA III.9 - DURACION DE LA FASE III DEL MMC (min) EN ESTADO POSTPRANDIAL (CONTROL) Y DURANTE LA PERFUSION DE CCK-8 Y DE Y cG.

	YEYUNO	ILEON PROXIMAL	ILEON DISTAL
CONTROL	4,5±0,4 n=27	3,9±0,3 n=28	4,0±0,3 n=32
cG (10 ⁻¹⁰ moles/kg/min)	5,6±0,7 n=8	4,8±0,5 n=8	4,1±0,5 n=10
CCK-8 (10 ⁻¹¹ moles/kg/min)	3,7±0,5 n=10	4,3±0,6 n=7	3,9±0,4 n=8
CCK-8 (3x10 ⁻¹¹ moles/kg/min)	4,6±0,8 n=5	3,6±0,7 n=8	4,2±0,5 n=6
CCK-8 (10 ⁻¹⁰ moles/kg/min)	Disrupción	Disrupción	Disrupción

Los datos están expresados como media±SEM.

TABLA III.10 - VELOCIDAD DE PROPAGACION DE LA FASE III DEL MMC (cm/min) EN ESTADO POSTPRANDIAL Y DURANTE LA PERFUSION DE CCK-8 Y cG.

	GLOBAL	YEYUNO - ILEON PROXIMAL	ILEON PROXIMAL - ILEON DISTAL
CONTROL	0,59±0,03 n=28	0,71±0,06 n=29	0,66±0,04 n=33
cG (10 ⁻¹⁰ moles/kg/min)	0,70±0,10 n=11	0,68±0,14 n=7	0,64±0,09 n=11
CCK-8 (10 ⁻¹¹ moles/kg/min)	0,62±0,08 n=11	0,81±0,14 n=9	0,58±0,07 n=7
CCK-8 (3x10 ⁻¹¹ moles/kg/min)	0,43±0,08 n=7, *	0,45±0,14 n=6	0,43±0,09 n=7, *
CCK-8 (10 ⁻¹⁰ moles/kg/min)	Disrupción	Disrupción	Disrupción

Los datos están expresados como media±SEM.

*: p<0,05, de acuerdo con el test t de Student.

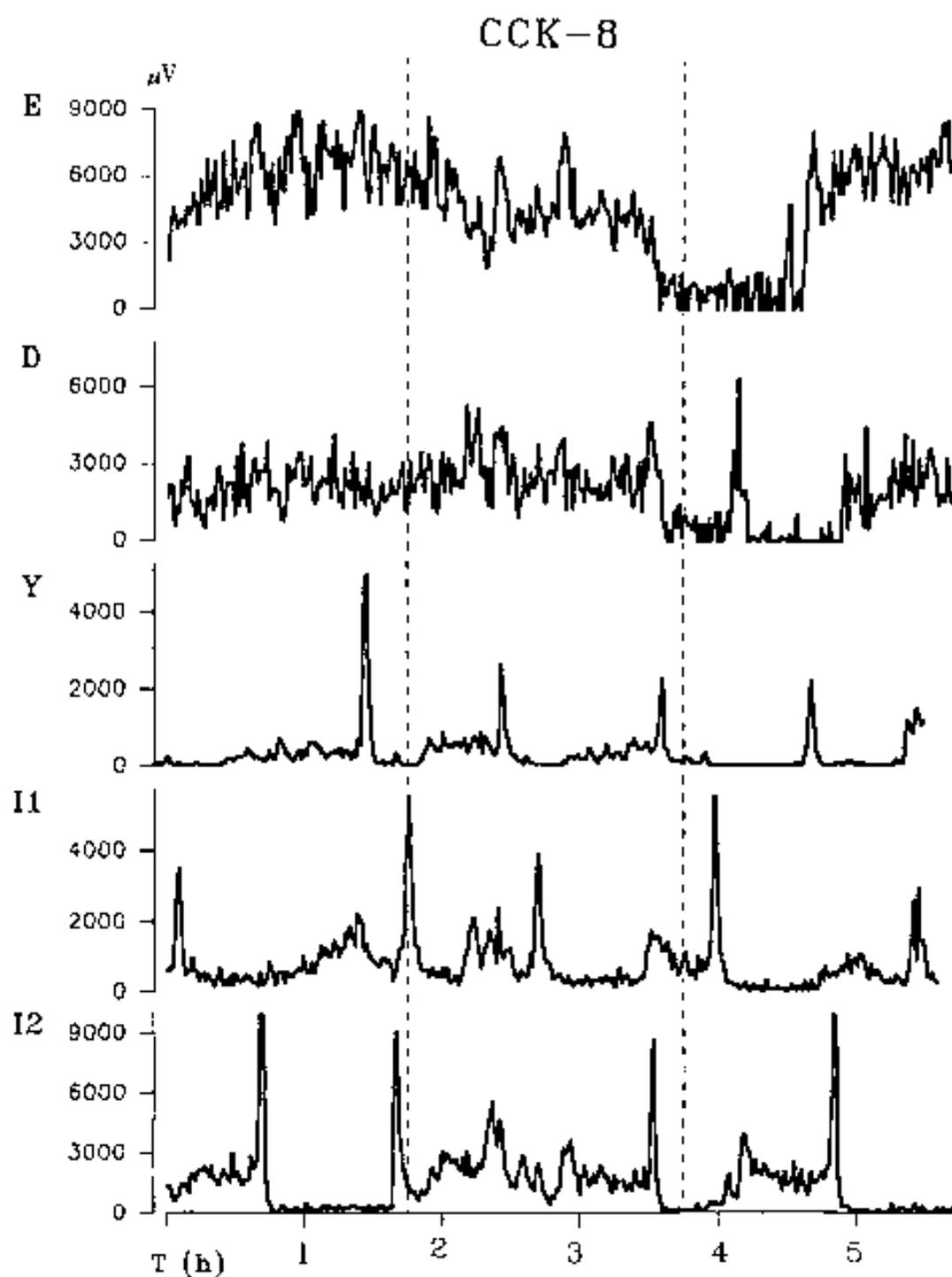


FIG. III.29 - Registro integrado de la actividad eléctrica gastrointestinal en un pollo en estado postprandial, mostrando el efecto de una infusión de CCK-8 (10^{-11} moles/kg/min x2h). Respuestas similares se observaron en todos los animales.

E, músculo cráneo-dorsal del compartimiento muscular del estómago; D, duodeno distal; Y, yeyuno; I1 e I2, ileon proximal y distal respectivamente.

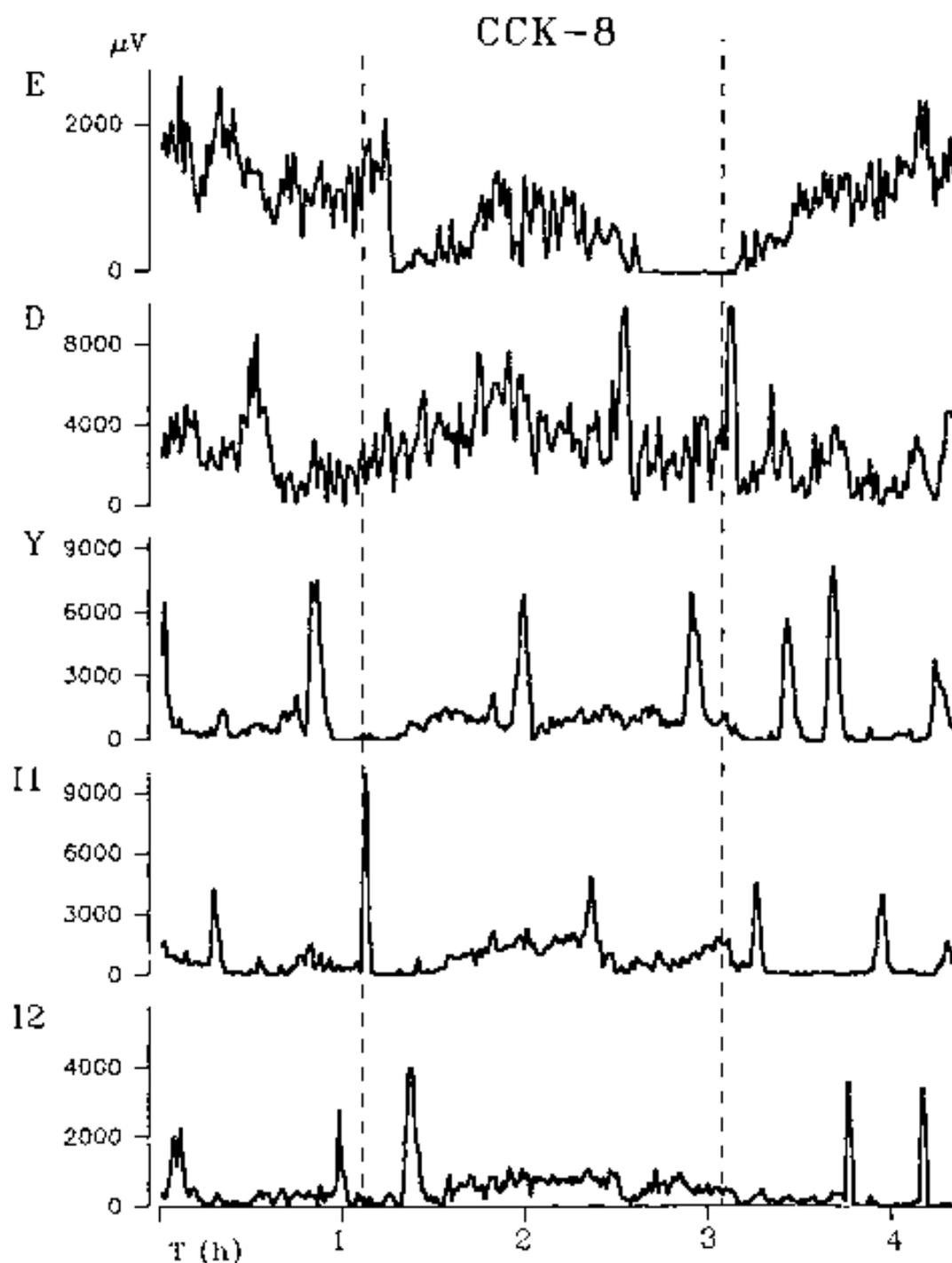


FIG. III.30 - Registro integrado de la actividad eléctrica gastrointestinal en un pollo en estado postprandial, mostrando el efecto de una infusión de CCK-8 (3×10^{-11} moles/kg/min \times 2h). Respuestas similares se observaron en todos los animales. E, músculo cráneo-dorsal del compartimiento muscular del estómago; D, duodeno distal; Y, yeyuno; I1 e I2, ileon proximal y distal respectivamente.

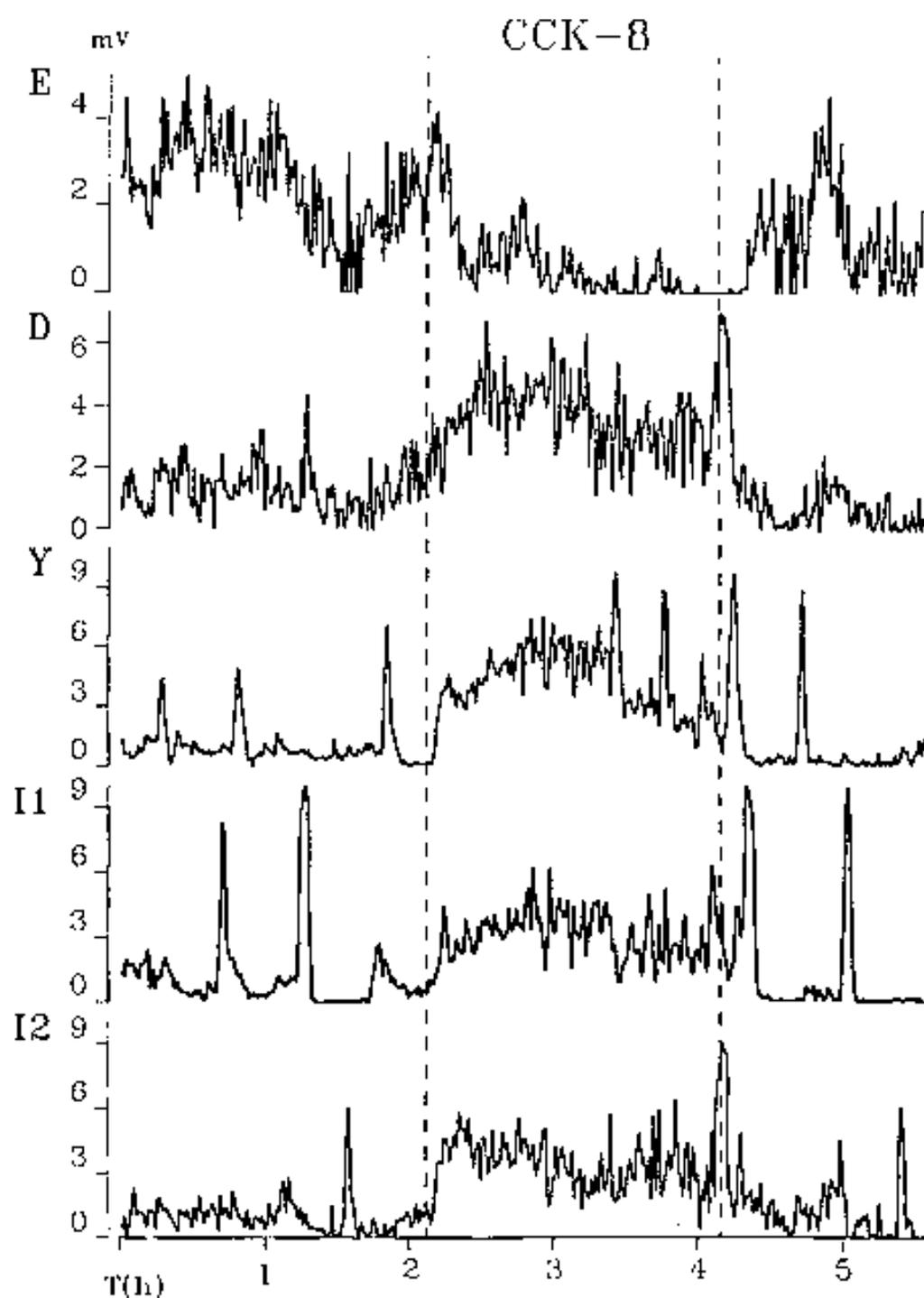


FIG. III.31 - Registro integrado de la actividad eléctrica gastrointestinal en un pollo en estado postprandial, mostrando el efecto de una infusión de CCK-8 (10^{-10} moles/kg/min \times 2h). Respuestas similares se observaron en todos los animales. E, músculo cráneo-dorsal del compartimiento muscular del estómago; D, duodeno distal; Y, yeyuno; I1 e I2, ileon proximal y distal respectivamente.

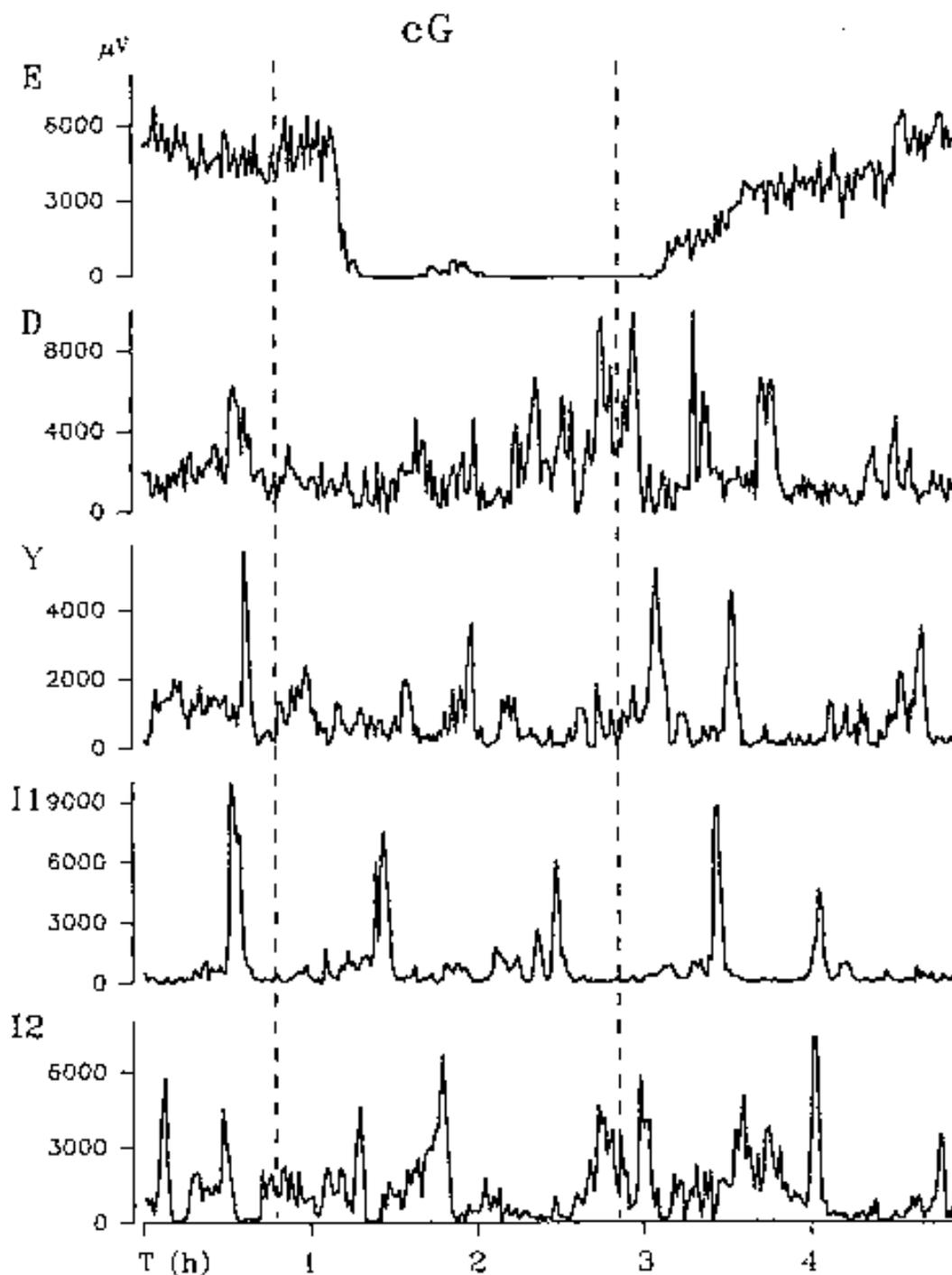


FIG. III.32 - Registro integrado de la actividad eléctrica gastrointestinal en un pollo en estado postprandial, mostrando el efecto de una infusión de gastrina de pollo (cG) (10^{-10} moles/kg/min \times 2h). Respuestas similares se observaron en todos los animales. E, músculo cráneo-dorsal del compartimiento muscular del estómago; D, duodeno distal; Y, yeyuno; I1 e I2, ileon proximal y distal respectivamente.

5 - EFECTOS DE LOS LÍPIDOS SOBRE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL.

5.1 - OBJETIVOS

En los mamíferos se sabe que los componentes de la dieta actúan modificando la motilidad gástrica y la intestinal. En las aves se sabe que diversos componentes de la dieta (lípidos, aminoácidos o fibra) actúan alterando de formas diferentes la motilidad y el tiempo de tránsito gastrointestinal. Hasta el momento, sólo hay un estudio sobre las acciones que los lípidos de la dieta tienen sobre la actividad motora gastroduodenal en las aves pero no se han estudiado las acciones de estos compuestos sobre la motilidad intestinal.

Así, los objetivos de este trabajo han sido:

- A - Estudiar el efecto de los lípidos sobre la motilidad del área gastroduodenal del pollo y la relación de éstos con su forma química y la vía de administración de los mismos.
- B - Estudiar las acciones de los lípidos, perfundidos intraluminalmente por diferentes vías, sobre la motilidad del intestino delgado.

5.2 - MATERIAL Y METODOS

5.2.1 - Animales de experimentación: estabulación y mantenimiento.

La descripción de este punto corresponde a la desarrollada en el apartado 2.2.1 (pág. 96). En este experimento se emplearon 16 animales.

5.2.2 - Preparación de los animales de experimentación.

5.2.2.1 - Implantación quirúrgica de los electrodos.

Los protocolos correspondientes a este punto son iguales a los descritos en 2.2.2.1 (pág. 97).

Para este trabajo los animales fueron divididos en dos grupos:

- A - 10 de los animales, empleados para el estudio de la motilidad gastroduodenal, fueron implantados con 5 tripletes de electrodos en las mismas localizaciones que las especificadas en el punto 2.2.2.1 (pág. 97).
- B - 6 animales, empleados para el estudio de la motilidad intestinal, fueron implantados con 8 tripletes de electrodos en las localizaciones especificadas en el punto 4.2.2.1 (pág 134). Estos animales fueron empleados también para parte del experimento descrito en el apartado 4 (pág 133).

5.2.2.2 - Cateterización.

Simultáneamente a la implantación de los electrodos los animales eran equipados con dos catéteres (de iguales características a los empleados para la cateterización venosa) en:

- Esófago torácico.
- Ileon proximal (5 cm post divertículo de la vesícula vitelina).

Estos catéteres eran preparados previamente realizando un reborde en su pared, por calentamiento del propio catéter, a 1,5 cm de uno de sus extremos. La implantación crónica, tanto a nivel esofágico como ileal, se realizaba practicando una pequeña incisión (2 mm aproximadamente) en la pared del órgano. Por este orificio se introducía el extremo del catéter en el que previamente se había realizado el reborde, dejando dentro de la luz del

órgano, y en sentido caudal, todo el espacio comprendido entre dicho reborde y el final del catéter. A continuación se suturaba la incisión mediante sutura de microcirugía no absorbible. El reborde realizado en el catéter sirve de tope al contactar con la pared interna ileal o esofágica, y evita que éste pueda salirse de la luz del órgano. Los catéteres se exteriorizaban y se dirigían hacia la misma abertura dorsal por la cual se extraían los electrodos, alojándose con éstos cuando no se estaban realizando registros.

Estos catéteres fueron periódicamente revisados y perfundidos con solución salina fisiológica, para mantener abierta su luz. Su colocación era comprobada en la necropsia de los animales.

5.2.3 - registros electromiográficos y análisis.

La técnica general empleada para los registros electromiográficos corresponde a la expuesta en el apartado 2.2.3 (pág. 98).

Cuando se estudió la motilidad gastroduodenal el tiempo de registro fue de 70 min, repartido en tres bloques:

- 10 min de registro, considerados como motilidad basal.
- 30 min, correspondientes al tiempo de infusión de las diferentes sustancias testadas.
- 30 min de registro post-infusión, como período de recuperación.

Los registros digitalizados fueron analizados mediante valoración de la actividad eléctrica total generada durante todo el tiempo de registro (integración, con intervalos de tiempo de 1 min) y estudio manual de los cambios cualitativos presentes en la motilidad duodenal.

En los estudios de la motilidad intestinal se registró al menos un MMC completo antes de empezar la perfusión del lípido y ésta se inició 10 min después de haberse registrado una fase III clara en el electrodo del intestino delgado en posición más craneal (yeyuno). A partir de este momento el registro se prolongó durante 4 h más, 2 correspondientes al periodo de perfusión y 2 como periodo de recuperación post-perfusión.

5.2.4 - Tratamiento de los resultados.

5.2.4.1 - Resultados de la integración.

El tratamiento correspondiente a los resultados del proceso de integración corresponde al expuesto en el apartado 2.2.4.1 (pág. 99).

5.2.4.2 - Valoración cualitativa de la motilidad gastroduodenal.

Los registros digitalizados fueron reproducidos a alta velocidad (9,6 cm/min) por impresora, mediante uno de los módulos del sistema de software empleado en la digitalización y análisis de la señal. A esta velocidad el ciclo gastroduodenal queda ampliamente expandido y es posible diferenciar la secuencia de contracciones en todos los canales registrados. La motilidad del área duodenal fue valorada de forma que las contracciones presentes se clasificaron en:

- **Peristálticas:** cuando se originaban en la rama duodenal descendente y se propagaban aboralmente al duodeno distal.
- **Antiperistálticas:** cuando se originaban totalmente o en parte en la rama duodenal ascendente y se propagaban oralmente a la rama descendente.

El número de contracciones totales y el de antiperistálticas fue valorado en intervalos de 10 min, desde el inicio del registro hasta el fin del mismo, expresándose por lo tanto como contracciones (totales o antiperistálticas) / 10 min. Los valores obtenidos durante los períodos de perfusión y de recuperación fueron comparados con los basales, correspondientes a los 10 min de registro anteriores al inicio de la perfusión, mediante el test de estadística no paramétrica U de Mann-Whitney. Se consideró que existían diferencias significativas entre los datos estudiados cuando $p < 0,05$.

5.2.4.3 - Analisis de la motilidad intestinal

A partir de los valores obtenidos en el proceso de integración se

valoraron los mismos parámetros del MMC expuestos para la experiencia anterior en el apartado 4.2.4 (pág. 135).

5.2.5 - Sustancias empleadas.

Las sustancias empleadas en esta experiencia fueron:

- 1- **Acido cis-9-octadecenoico ($C_{18}H_{34}O_2$) (ácido oléico (OA)) -**
Se empleó un OA libre (282,5 g/mol) de un 95% de pureza y una densidad de 0,89 g/ml (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, U.S.A.).
- 2- **Trioleína($C_{18:1,[cis]-9}$) (1,2,3-tri-[(cis)-9 octadecenoil] glicerol; giceril trioleato) (885,4 g/mol), con una pureza aproximada del 95%, y una densidad de 0,91 g/ml) (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, U.S.A.).**

5.2.6 - Protocolo experimental.

Cuando se estudiaron las acciones sobre la coordinación gastroduodenal, los registros electromiográficos se iniciaban 10 min antes de la administración de cualquier producto y este período era considerado como de actividad motora basal.

Los animales recibieron de forma randomizada perfusiones de AO y de trioleína (TO), tanto por vía esofágicas ($n=8$ para el AO y para la TO) como ileal ($n=8$ para el AO y para la TO). Las dosis perfundidas de estos lípidos fueron tales que en ambos casos la cantidad final de moléculas de oleato libre fuese la misma. Así se perfundieron $6,3 \times 10^{-3}$ moles/30 min de OA, con un volumen final de 2 ml y $2,1 \times 10^{-3}$ moles/30 min de TO (que contienen $6,3 \times 10^{-3}$ moles de oleato libre), con un volumen final de 2,04 ml. Los animales recibieron además perfusiones, por vía esofágica e ileal, de solución salina fisiológica como control, con un volumen final de 2 ml/30 min.

Tras los 30 min de perfusión, los registros electromiográficos se prolongaron 30 min más como período de recuperación.

El efecto del AO sobre la motilidad intestinal postprandial se estudió a partir de la perfusión de 6×10^{-3} moles/2 h de AO, tanto por vía esofágica (n = 6) como por vía yeyunal (n = 5).

5.3 - RESULTADOS

5.3.1 - Efectos de la perfusión esofágica de lípidos sobre la motilidad gastroduodenal.

La perfusión esofágica de AO produjo una inhibición significativa ($p < 0,05$) de la actividad eléctrica de todas las áreas gástricas. En el compartimiento glandular del estómago la inhibición se inició a los 10 min de iniciada la perfusión y se prolongó hasta los 30 min tras su fin. La acción en el compartimiento glandular se inició a los 15-20 min del inicio de la perfusión y duró hasta los 30 min tras su finalización. Durante todo el período de registro la actividad eléctrica total del duodeno no se modificó de forma significativa (Tabla III.11 y Fig. III.33). Sin embargo, el número de contracciones duodenales disminuyó de forma significativa a partir del minuto 11 de perfusión, y este descenso se mantuvo hasta el final del período de registro. Cualitativamente, se observó un incremento significativo en el número de contracciones duodenales antiperistálticas, a partir de los 20 min del inicio de la perfusión (Tabla III.12 y Fig. III.34A).

La perfusión de TO por la misma vía produjo una inhibición significativa de la actividad eléctrica de todas las áreas gástricas estudiadas (Fig. III.35). La acción inhibitoria se inició aproximadamente a los 15 min del inicio de la perfusión y duró hasta los 30 min tras el final de la misma (Tabla III.11). La actividad eléctrica total duodenal se modificó únicamente durante minutos aislados en todo el período de registro, observándose además un descenso significativo en la frecuencia de contracción a partir del minuto 11 de perfusión, prolongándose hasta el final del registro. Igualmente se observó un incremento significativo en el número de contracciones antiperistálticas a partir del minuto 20 de perfusión (Tabla III.13).

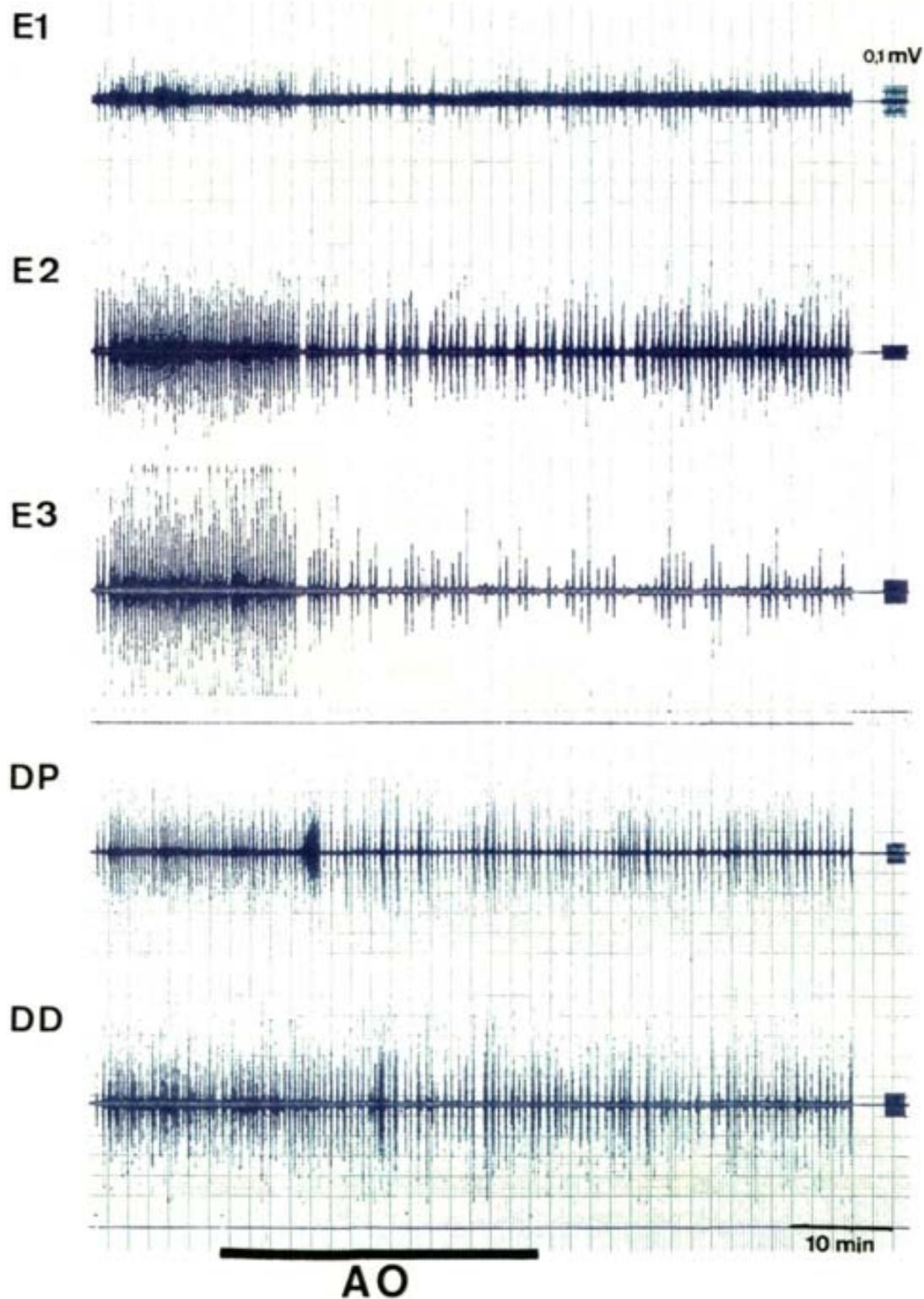


FIG. III.33 - Registro electromiográfico mostrando la acción de la infusión esofágica de ácido oléico (AO) ($6,3 \times 10^{-3}$ moles/30 min) sobre la actividad eléctrica gastroduodenal. Respuestas semejantes se observaron en todos los animales.

E1, compartimiento glandular del estómago; E2 y E3, músculos cráneo-dorsal y caudo-dorsal de compartimiento muscular del estómago respectivamente; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal.

TABLA III.11 - ACCION DE LA PERFUSION ESOFAGICA E ILEAL DE LIPIDOS EN LA ACTIVIDAD ELECTRICA DEL AREA GASTRODUODENAL.

		Compart. Glandular	Msc. Cráneo- Dorsal	Msc. Caudal- Dorsal	Duodeno Descend.	Duodeno Ascend.
SF	Esófago	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Ileon	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
AO	Esófago	9, 16 26-60	20-60	14 18-60	n.s.	n.s.
	Ileon	n.s.	15-47	15-60	n.s.	n.s.
TO	Esófago	16-60	16-60	15-60	27-28 30, 42 44, 46	23-24 27
	Ileon	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Los valores indican los minutos tras el inicio de la perfusión (min 0) en los que la inhibición de la actividad eléctrica era significativa ($P < 0,05$), de acuerdo con el test de Duncan.

n.s.: no significativo.

SF: suero fisiológico; AO: ácido oléico; TO: trioleína.

5.3.2 - Efectos de la perfusión ileal de lípidos sobre la motilidad gastroduodenal.

La perfusión ileal de AO no modificó de forma significativa la actividad eléctrica del compartimiento glandular del estómago pero si la del muscular, observándose una inhibición significativa ($p < 0,05$) a partir del minuto 15 y prolongándose hasta el final del período de registro. La actividad total duodenal no se modificó en ningún momento durante el tiempo de registro (Tabla III.11 y Fig. III.36). Sin embargo, el número de contracciones

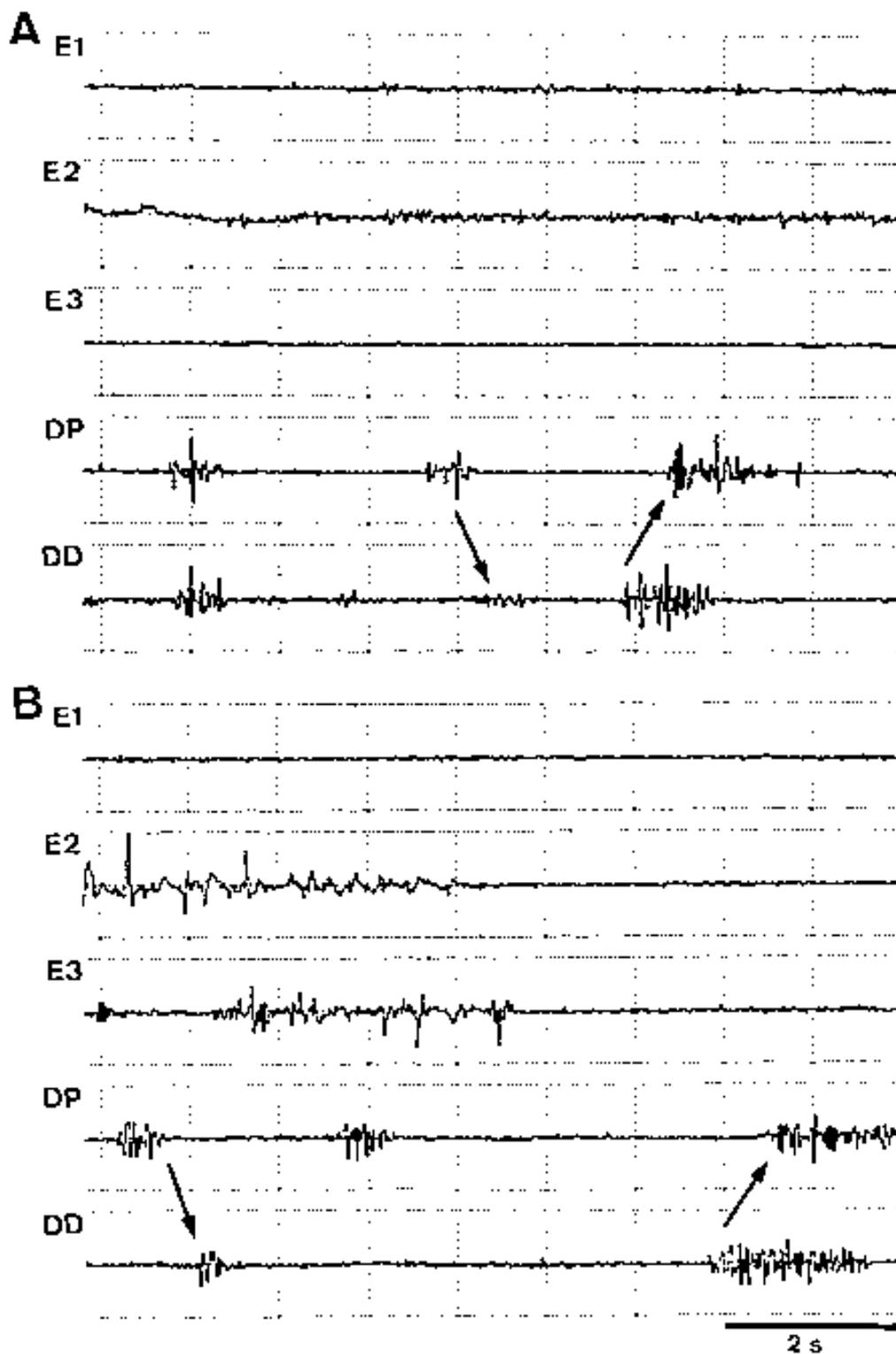


FIG. III.34 - Registro electromiográfico expandido de la actividad gastroduodenal durante la perfusión de ácido oléico ($6,3 \times 10^{-3}$ moles/30 min) vía esofágica (A) y vía ileal (B). Las flechas muestran la propagación peristáltica i antiperistáltica de las contracciones duodenales.

E1, compartimiento glandular del estómago; E2 y E3, músculos cráneo-dorsal y caudo-dorsal de compartimiento muscular del estómago respectivamente; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal.

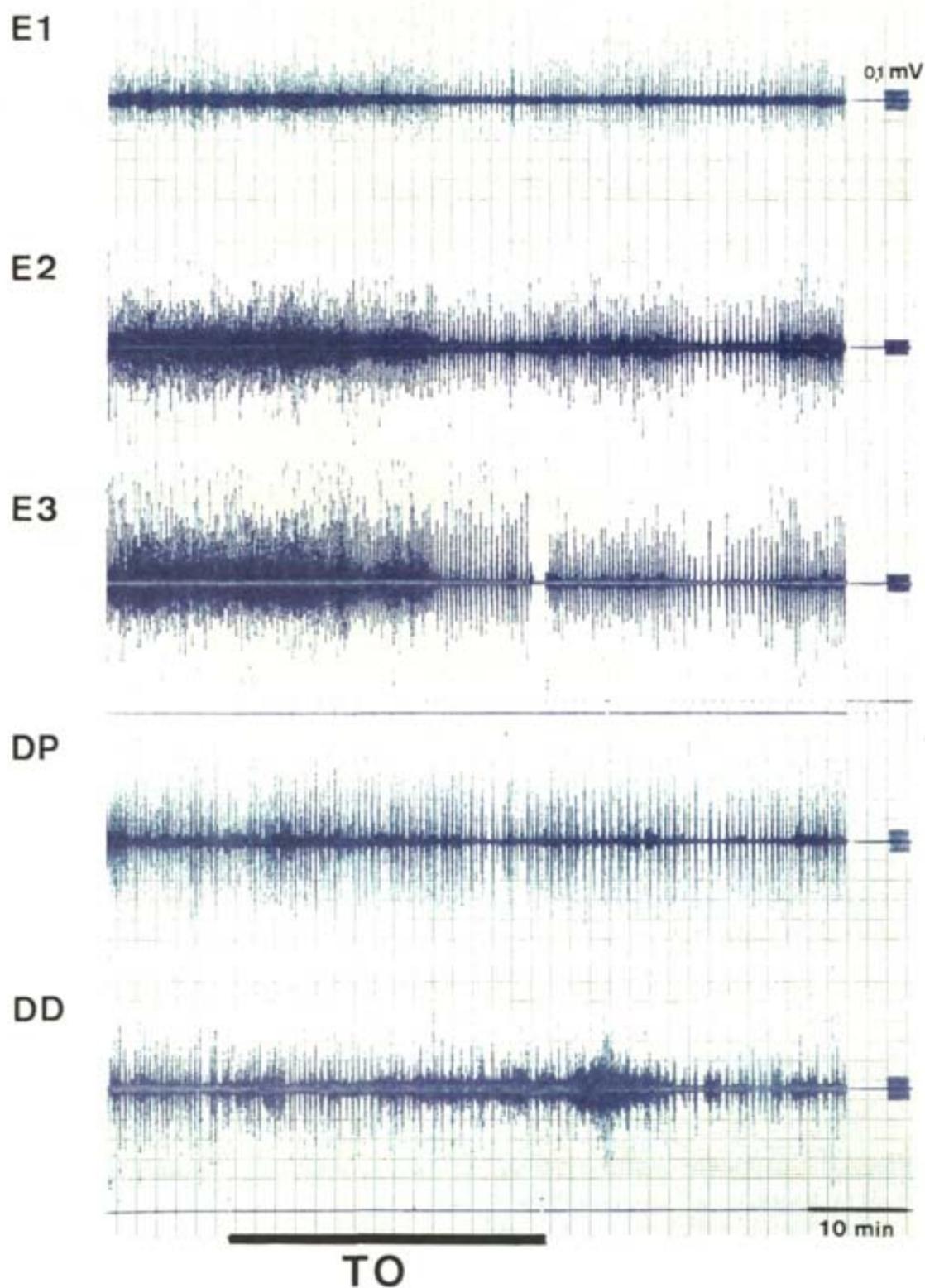


FIG. III.35 - Registro electromiográfico mostrando la acción de la infusión esofágica de trioleína (TO) ($6,3 \times 10^{-3}$ moles/30 min) sobre la actividad eléctrica gastroduodenal. Respuestas semejantes se observaron en todos los animales.

E1, compartimiento glandular del estómago; E2 y E3, músculos cráneo-dorsal y caudo-dorsal de compartimiento muscular del estómago respectivamente; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal.

duodenales se redujo de forma significativa a partir del minuto 11 de perfusión y duró hasta el final del registro. Simultáneamente se observó, también a partir del minuto 11, un incremento significativo en el número de contracciones duodenales antiperistálticas (Tabla III.12 y Fig. III.34B).

La perfusión yeyunal de TO no modificó en ningún momento la actividad eléctrica total generada ni en estómago ni en duodeno (Tabla III.11 y Fig. III.37). De la misma forma tampoco modificó cualitativamente la actividad duodenal (Tabla III.13).

Perfusiones esofágicas e ileales de suero fisiológico, empleadas como control, no modificaron ni cualitativa ni cuantitativamente ni la actividad gástrica ni la duodenal.

TABLA III.12 - EFECTO DE LA INFUSION DE ACIDO OLEICO SOBRE LA ACTIVIDAD MOTORA DUODENAL: FRECUENCIA TOTAL Y DE CONTRACCIONES ANTIPERISTALTICAS (ciclos/10 min).

Tiempo (min)	YEYUNO		ESOFAGO	
	Contracciones	Contracciones Antiperistált.	Contracciones	Contracciones Antiperistált.
Control	35,25±0,90	0,87±0,55	32,13±4,05	1,00±0,45
1-10	29,50±2,13 n.s.	2,25±1,10 n.s.	33,88±1,80 n.s.	1,25±0,44 n.s.
11-20	24,75±3,35 *	4,25±0,89 ***	23,13±4,00 **	2,38±0,78 n.s.
21-30	19,75±0,02 *	2,86±0,89 *	20,00±2,52 **	3,25±0,89 **
31-40	15,50±3,38 **	3,00±1,43 *	21,50±3,23 **	2,38±1,23 n.s.
41-50	14,75±2,40 **	1,88±0,47 *	17,75±3,23 **	3,63±1,19 **
51-60	17,88±4,20 **	1,75±0,66 n.s.	21,43±3,84 *	2,71±1,10 *

*, **, ***: diferencias significativas respecto al periodo control ($p < 0,05$, $0,01$ y $0,001$ respectivamente), de acuerdo con el test U de Mann-Whitney.

TABLA III.13 - EFECTO DE LA INFUSION DE TRIOLEINA SOBRE LA ACTIVIDAD MOTORA DUODENAL: FRECUENCIA TOTAL Y DE CONTRACCIONES ANTIPERISTALTICAS (ciclos/10 min).

Tiempo (min)	YEYUNO		ESOFAGO	
	Contracciones	Contracciones Antiperist.	Contracciones	Contracciones Antiperist.
Control	34,38±2,38	0,63±0,35	37,50±1,70	0,63±0,40
1-10	35,75±2,30 n.s.	1,13±0,51 n.s.	36,13±1,82 n.s.	0,75±0,27 n.s.
11-20	34,50±2,13 n.s.	2,50±1,05 n.s.	29,88±2,64 **	1,50±0,67 n.s.
21-30	31,63±2,55 n.s.	1,38±0,45 n.s.	23,50±2,98 **	3,50±1,05 **
31-40	30,38±3,51 n.s.	0,88±0,43 n.s.	24,38±2,85 **	3,25±1,23 **
41-50	31,25±3,56 n.s.	0,88±0,32 n.s.	19,50±1,91 **	2,63±0,45 **
51-60	29,50±4,22 n.s.	1,75±0,90 n.s.	21,14±3,25 *	2,00±0,82 *

*, **: diferencias significativas respecto al periodo control (p<0,05 y 0,01 respectivamente), de acuerdo con el test U de Mann-Whitney.

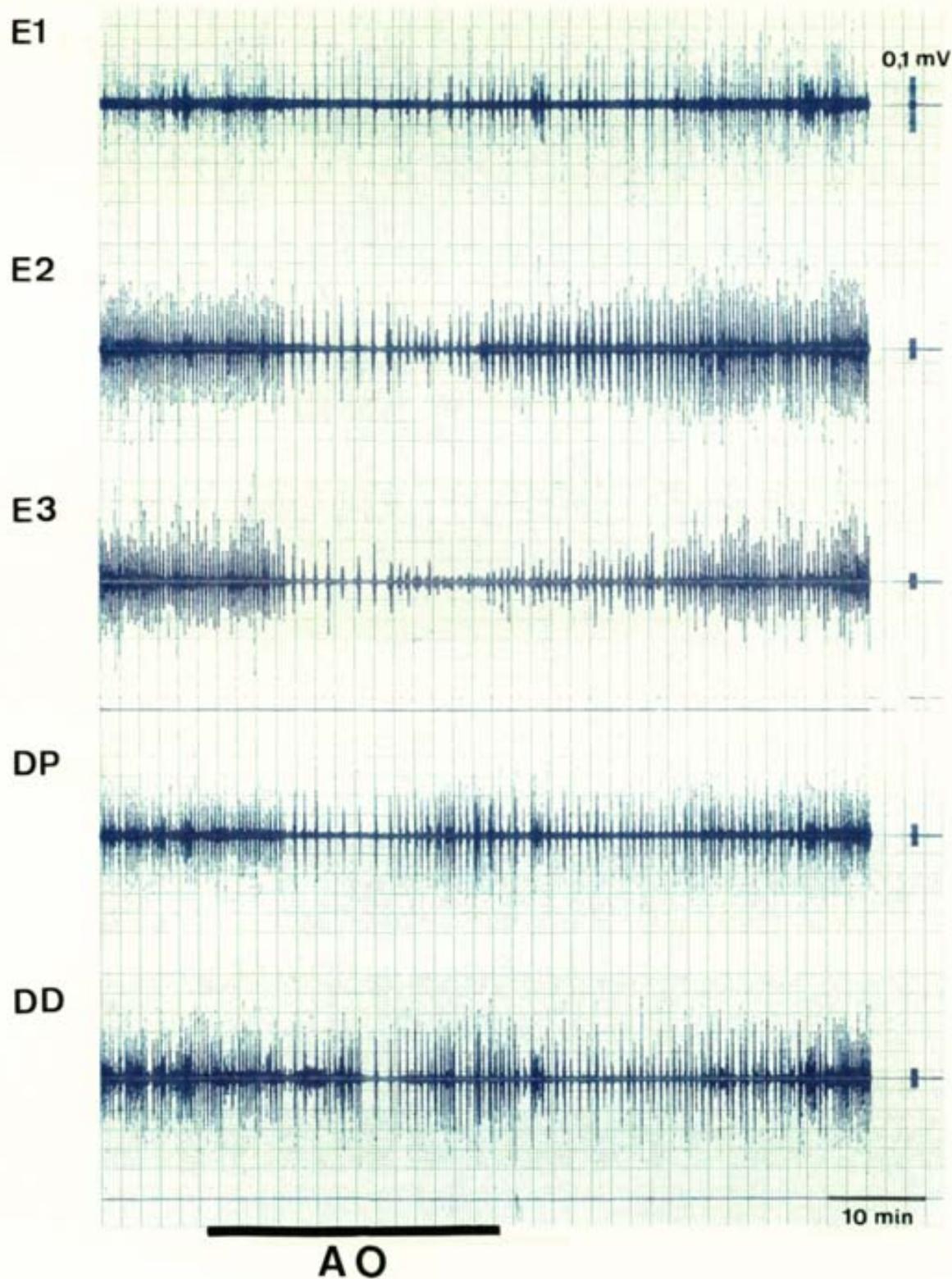


FIG. III.36 - Registro electromiográfico mostrando la acción de la infusión ileal de ácido oléico (AO) ($6,3 \times 10^{-3}$ moles/30 min) sobre la actividad eléctrica gastroduodenal. Respuestas semejantes se observaron en todos los animales.

E1, compartimiento glandular del estómago; E2 y E3, músculos cráneo-dorsal y caudo-dorsal de compartimiento muscular del estómago respectivamente; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal.

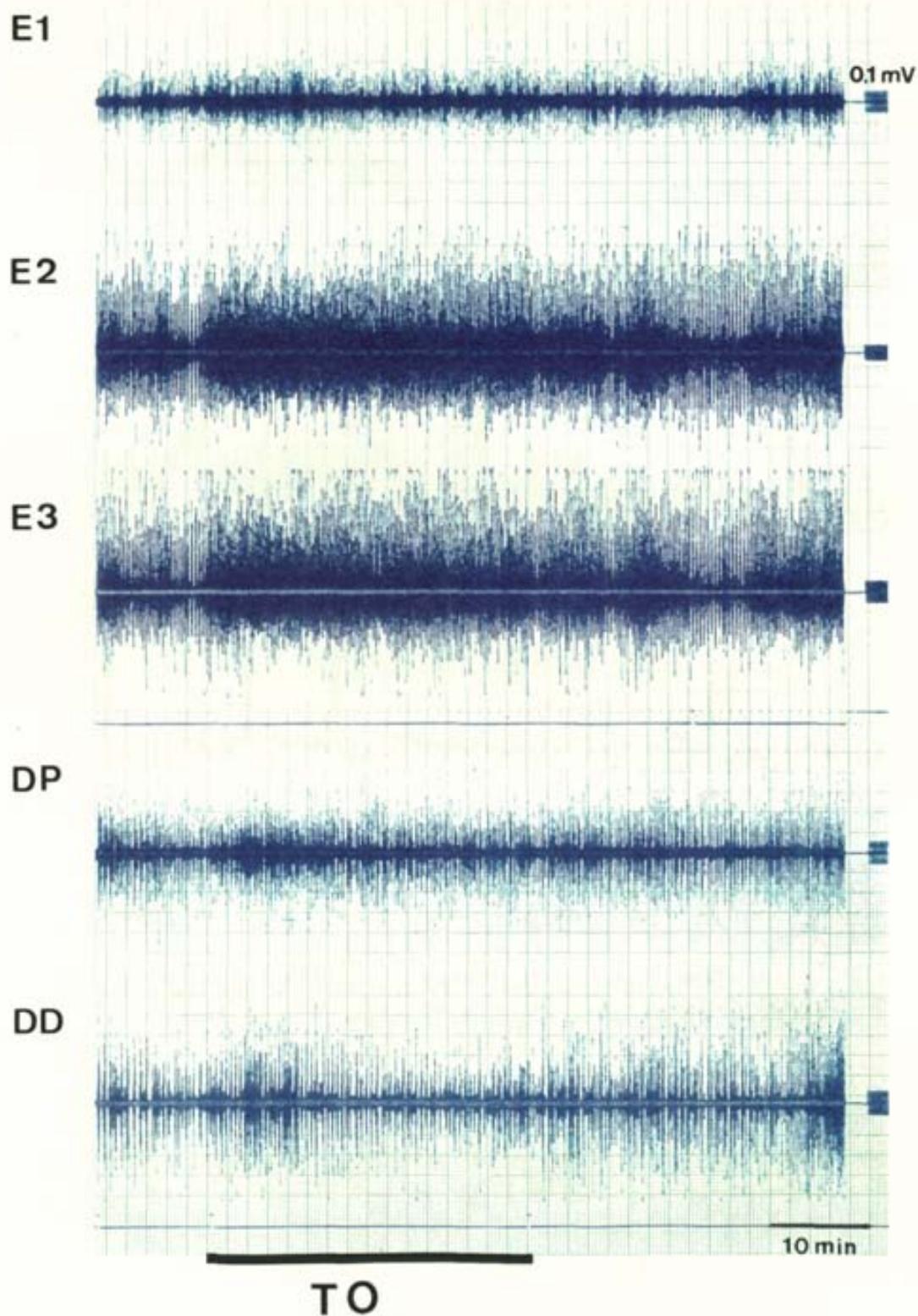


FIG. III.37 - Registro electromiográfico mostrando la acción de la infusión ileal de trioleína (TO) ($6,3 \times 10^{-3}$ moles/30 min) sobre la actividad eléctrica gastroduodenal. Respuestas semejantes se observaron en todos los animales.

E1, compartimiento glandular del estómago; E2 y E3, músculos cráneo-dorsal y caudo-dorsal de compartimiento muscular del estómago respectivamente; DP, duodeno proximal; DD, duodeno distal.

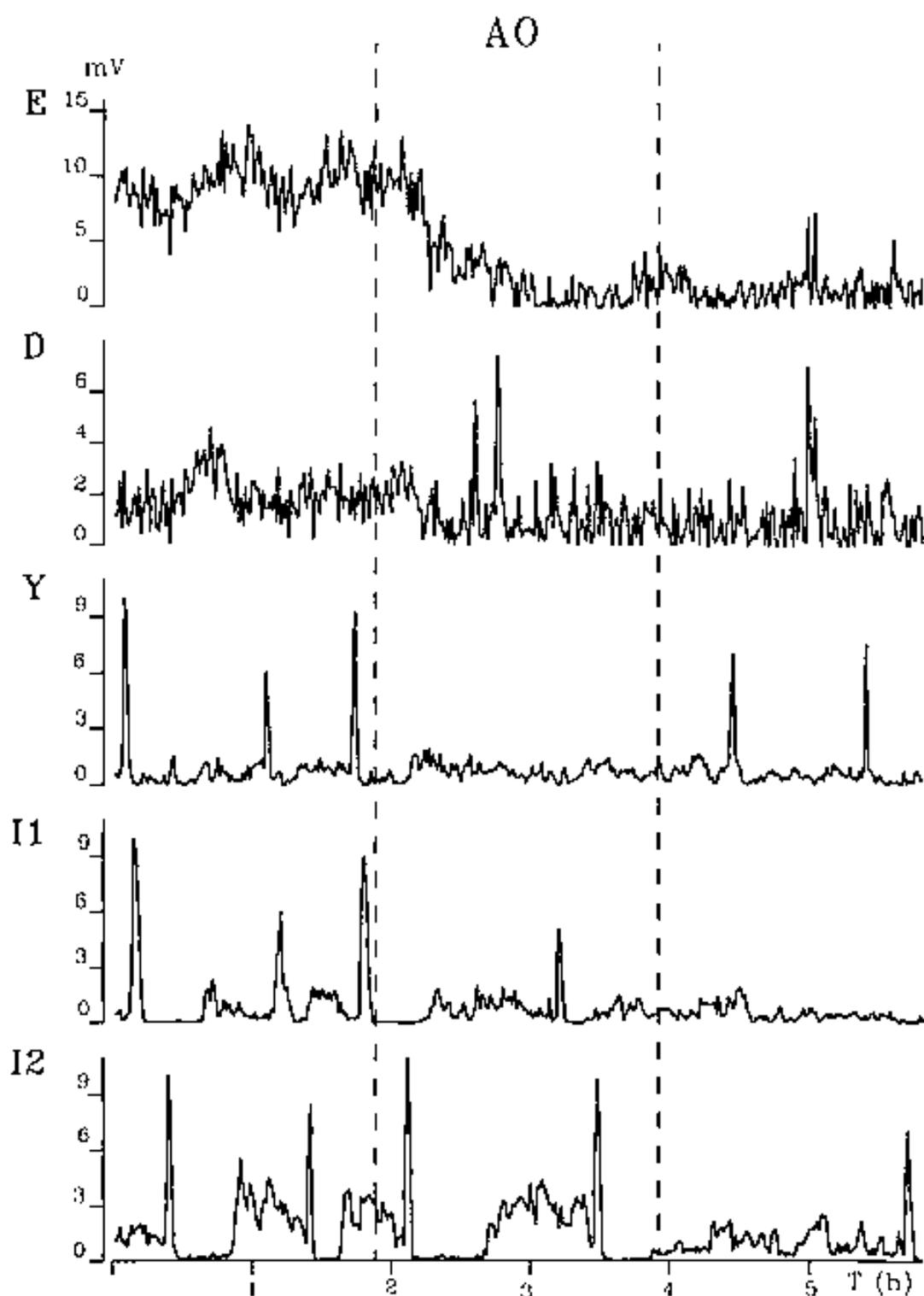


FIG. III.38 - Registro integrado de la actividad eléctrica gastrointestinal en un pollo en estado postprandial, mostrando el efecto de una infusión esofágica de ácido oléico (AO) ($6,3 \times 10^{-7}$ moles/30 min). Respuestas similares se observaron en todos los animales.

E, músculo cráneo-dorsal del compartimiento muscular del estómago; D, duodeno distal; Y, yeyuno; I1 e I2, íleon proximal y distal respectivamente.

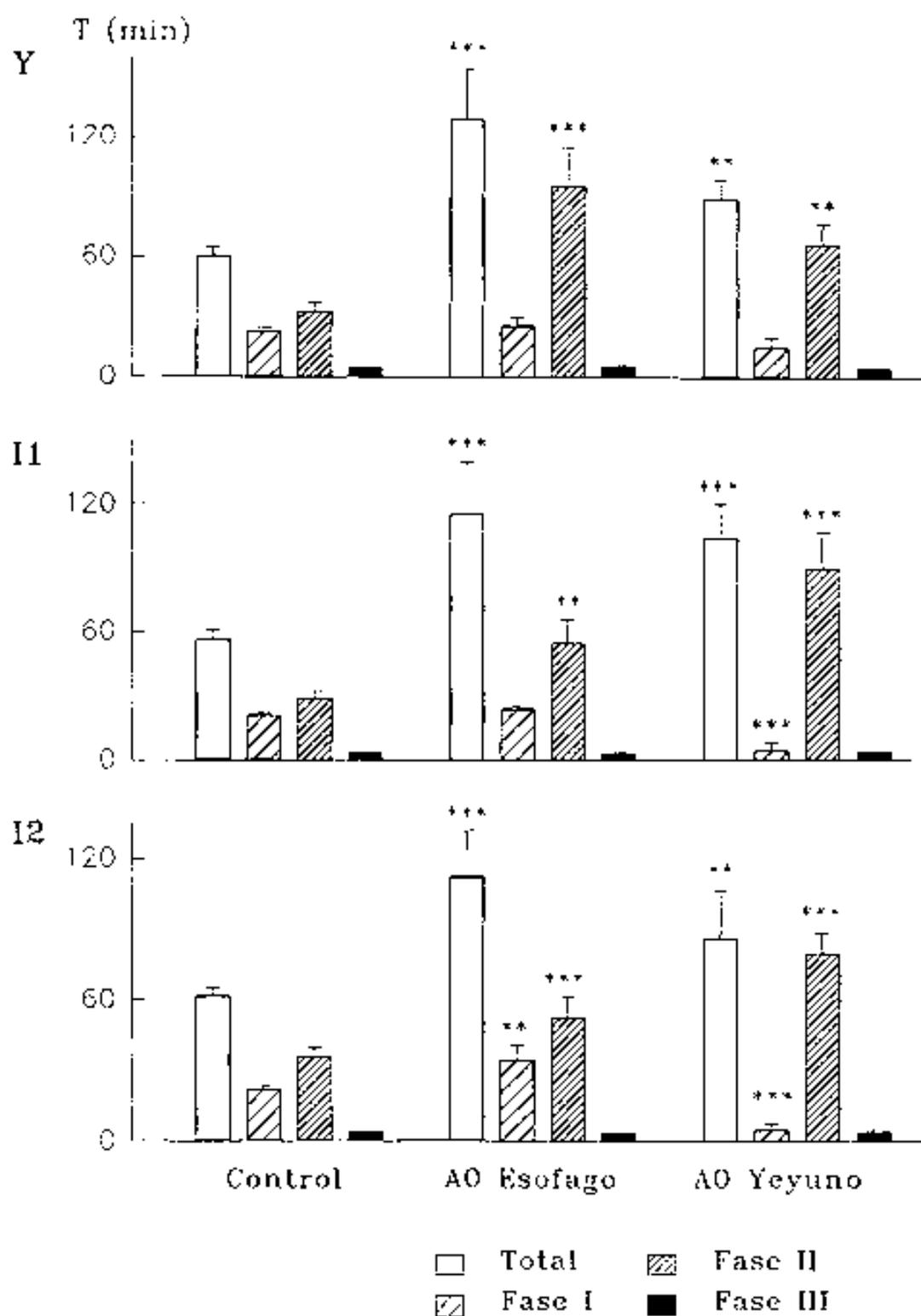


FIG. III.39 - Efecto de la perfusión esofágica e ilcal de ácido oléico (AO) sobre la duración total del MMC y de sus fases en las áreas del intestino delgado estudiadas: I, yeyuno; I1, ileon proximal; I2, ileon distal.
 *, **, ***: diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$, $0,01$ y $0,001$, de acuerdo con el test t de Student).

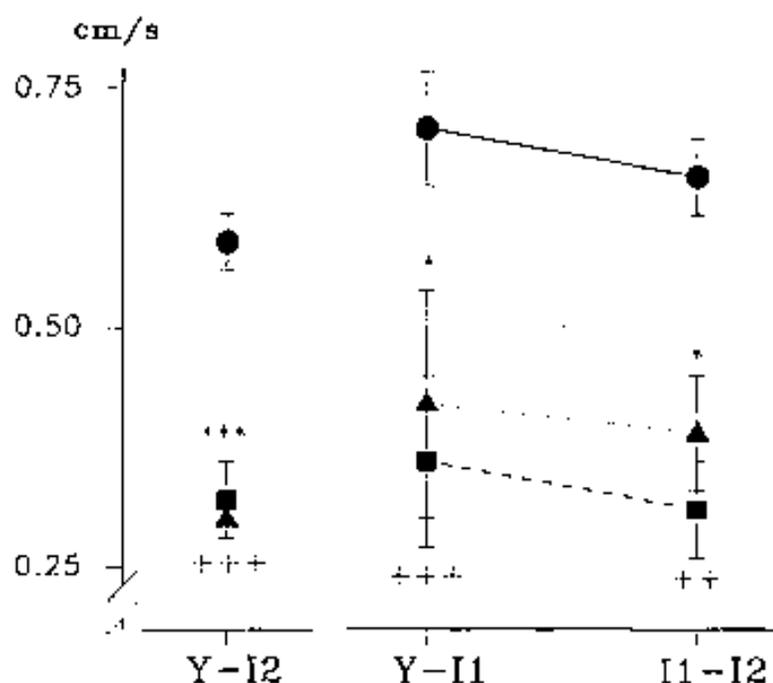


FIG. III.40 - Velocidad de propagación de la fase III del MMC durante el periodo control (—●—) y durante la perfusión esofágica (---■---) e ileal (····▲····) de ácido oléico.

Y-I2, velocidad global de propagación del yeyuno al ileon distal; Y-I1, velocidad parcial de propagación entre el yeyuno y el ileon proximal; I1-I2, velocidad de propagación entre el ileon proximal y el distal.

*, **, ***, diferencias significativas con el periodo control ($p < 0,5$, $0,01$ y $0,001$ de acuerdo con el test t de Student).

5.3.3 - Efectos del ácido oléico sobre la motilidad intestinal (MMCs).

Los efectos del AO sobre los MMCs fueron muy semejantes tanto cuando éste fue perfundido por vía esofágica como cuando se hizo por vía yeyunal. Los parámetros correspondientes al periodo control de esta parte son los mismos a los del experimento anterior (pág. 137). La presencia de catéteres implantados en el ileon no modificó la motilidad intestinal en esta área donde siguieron presentándose MMCs con iguales características a las

de aquellos animales sin catéter, por ello, los MMCs registrados en estos animales durante los periodos de control se han incluido con los de los animales sin catéteres para la caracterización del MMC en período postprandial.

La perfusión esofágica de AO produjo una elongación altamente significativa del MMC en todas las áreas del intestino delgado, así su duración media oscilaba entre los 100 y los 110 min ($p < 0,001$ para yeyuno e íleon proximal y distal) (Fig. III.38). La duración de la fase I del MMC estaba significativamente alargada sólo en el íleon distal ($p < 0,01$) mientras que la de la fase II fue significativamente mayor en todas las áreas intestinales ($p < 0,001$ para el yeyuno y el íleon distal y $p < 0,01$ para el íleon proximal). La duración de la fase III no cambió significativamente en ninguna de las áreas estudiadas (Fig. III.39). De forma similar la velocidad de propagación, tanto global como parcial, de la fase III se redujo de forma altamente significativa en todas las áreas intestinales ($p < 0,001$ para la velocidad global, $p < 0,02$ para la velocidad de migración entre el yeyuno y el íleon proximal y $p < 0,05$ para la velocidad entre el íleon proximal y el distal) (Fig. III.40).

La perfusión yeyunal del mismo producto a una dosis equimolar produjo también un alargamiento del MMC en todas las áreas del intestino ($p < 0,01$ para el yeyuno, $p < 0,001$ para el íleon proximal y $p < 0,01$ para el distal), oscilando su duración media entre los 80 y los 100 min (Fig. III.39 y III.41). En este caso, la fase I aparecía significativamente acortada tanto en el íleon proximal ($p < 0,001$) como en el distal ($p < 0,001$). La fase II, por el contrario, estaba significativamente alargada en todas las áreas intestinales ($p < 0,002$ para el yeyuno y $p < 0,001$ tanto para el íleon proximal como para el distal). En ningún caso se modificó la duración de la fase III (Fig. III.39). De forma similar la velocidad de migración se redujo también de forma significativa ($p < 0,001$ para la global, $p < 0,001$ para la velocidad entre el yeyuno y el íleon proximal y $p < 0,01$ para la propagación entre el íleon proximal y el distal) (Fig. III.40).

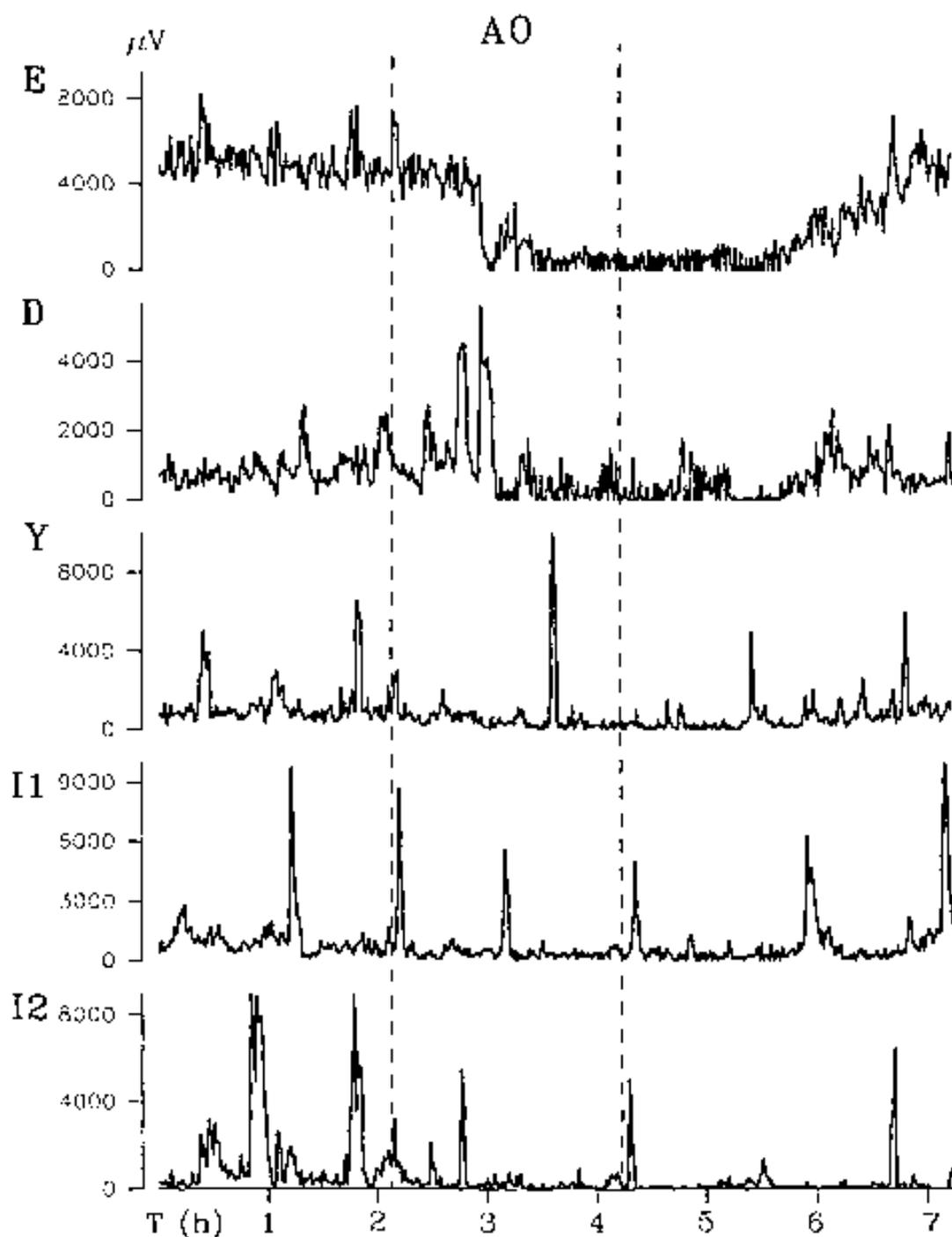


FIG. III.41 - Registro integrado de la actividad eléctrica gastrointestinal en un pollo en estado postprandial, mostrando el efecto de una infusión yeyunal de ácido oléico (OA) ($6,3 \times 10^{-3}$ moles/30 min). Respuestas similares se observaron en todos los animales.

E, músculo cráneo-dorsal del compartimiento muscular del estómago; D, duodeno distal; Y, yeyuno; I1 e I2, ileon proximal y distal respectivamente.

IV - DISCUSSION

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

Se han realizado numerosos estudios sobre la presencia de los péptidos de la familia gastrina-CCK en el tracto gastrointestinal de las aves, tanto mediante técnicas cromatográficas, como de radioinmunoensayo, inmunohistoquímica o "binding". La mayoría de estos estudios emplean para su identificación anticuerpos específicos para el extremo carboxiterminal común de todos los péptidos de esta familia. En estas condiciones, las células conteniendo péptidos de la familia gastrina-CCK se han encontrado distribuidas a lo largo de todo el tracto gastrointestinal.

Rawdon y Andrew (1981) estudiaron la distribución de los péptidos gastrina-CCK en el intestino de pollo empleando anticuerpos específicos para diferentes fragmentos de la molécula de CCK y demostraron la presencia de dos poblaciones diferentes de células conteniendo péptidos de este tipo en el píloro y en el íleon. En este trabajo se emplea un anticuerpo específico frente a la gastrina del pollo (L293) junto a un anticuerpo específico para la CCK y uno específico para el extremo carboxiterminal común de esta familia de péptidos (L48), este anticuerpo es el mismo empleado por Rawdon y Andrew (1981). El uso de estos anticuerpos junto a una absorción sistemática de los mismos con diferentes péptidos de este grupo (gastrina de pollo (cG), CCK-33 y CCK-8) ha permitido una clara identificación de dos poblaciones de células endocrinas conteniendo material de tipo gastrina-CCK. En el píloro, y de acuerdo con otros estudios, la inmunorreactividad (IMR) encontrada parece corresponder a la gastrina del pollo. Sin embargo, en el intestino, el hecho de que la incubación del anticuerpo A-CCK con cG no prevenga la presencia de IMR indica que el péptido presente en esta zona es más semejante a la CCK que a la cG. Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos por Rawdon y Andrew (1981).

Es importante destacar la dificultad encontrada para identificar de una forma fidedigna los diferentes péptidos, a pesar de emplear anticuerpos específicos tanto para la cG como para la CCK. Esta dificultad puede deberse

a las importantes similitudes estructurales que hay entre la CCK y la gastrina. De acuerdo con Larsson y Rehfeld (1977), según razones evolutivas, si existen dos péptidos diferenciados de la familia gastrina-CCK en el tracto gastrointestinal de las aves la semejanza estructural entre ellos debería ser mayor a la observada en los mamíferos, y al mismo tiempo ambos péptidos deberían ser más semejantes a la CCK que a la gastrina de los mamíferos. El anticuerpo L293, específico para la cG, está obtenido a partir de la forma no sulfatada de la cG-10; este polipéptido comparte con la CCK el pentapéptido final de la molécula y la Tyr en posición 7. Con este alto grado de semejanza estructural parece razonable que exista cierta reactividad cruzada con la CCK. Así, los resultados muestran que la IMR pilórica debida al anticuerpo L293 desaparece totalmente cuanto se preabsorbe con CCK-8 o con CCK-33; este anticuerpo reacciona, además, con células de la mucosa intestinal, en el yeyuno y en el íleon, en las que los resultados indican la presencia de una molécula tipo CCK.

De forma similar, el anticuerpo L48, específico para el extremo carboxiterminal común de la gastrina y la CCK, no tiñe las células antrales, mientras que si lo hace en el duodeno e intestino delgado. El mismo anticuerpo ha sido empleado con éxito por diferentes autores para la determinación tanto de gastrina como de CCK en el tracto gastrointestinal de algunas especies de mamíferos (Dockray *et al.*, 1980, Hutchinson *et al.*, 1981; Calam *et al.*, 1982). Rawdon y Andrew (1981) emplearon este mismo anticuerpo, L48, para estudiar la distribución de estos péptidos en pollos inmediatamente tras la eclosión, obteniendo una intensa IMR en la zona antral.

La molécula producida por las células endocrinas antrales ha sido recientemente aislada, purificada y secuenciada. Como ya hemos visto, este péptido es estructuralmente una CCK pero funcionalmente una gastrina y por ello se ha denominado cG (Dimaline *et al.*, 1986; Dimaline y Lee, 1990). Según Dimaline y Lee (1990) la actividad biológica de tipo gastrina de este péptido se debe a que en la molécula, y debido a interacciones estéricas entre los aminoácidos del extremo carboxi-terminal, se producen cambios conformacionales que le confieren una actividad biológica similar a la de la gastrina de los mamíferos a pesar de su secuencia aminoacídica tipo CCK. Estos cambios en la conformación molecular, afectando al núcleo común a

todos los péptidos de la familia gastrina-CCK, pueden ser los responsables del pobre reconocimiento de la cG por el anticuerpo L48. Esta hipótesis sugiere igualmente que, cambios ontogénicos en el procesamiento del péptido y modificaciones en su núcleo activo produciendo cambios de microheterogeneidad molecular (Rehfeld, 1980 y 1981) pueden ser los responsables de las diferencias entre los resultados de Rawdon y Andrew (1981) y los nuestros empleando el anticuerpo L48, ya que la única diferencia entre el protocolo de su estudio y el nuestro es la edad de los animales empleados (pollitos tras la eclosión vs pollos de 6 a 8 semanas).

Los resultados obtenidos muestran la presencia en el intestino de un péptido que parece ser más semejante a la CCK que a la cG. Este péptido es reconocido eficazmente por los anticuerpos L48 y L293, esto demuestra, como ya es patente en la cG, una alta conservación a lo largo de la escala filogenética del núcleo activo de estos péptidos. Las células intestinales son, también, teñidas eficazmente por el anticuerpo A-CCK, lo que sugiere que la región 1-28 de esta molécula tipo CCK presenta similitudes con la misma región de la CCK de los mamíferos. Es interesante observar que la absorción del A-CCK con cG no modifica la IMR, lo que indica, como puede observarse comparando la secuencia aminoacídica de la CCK de los mamíferos y de la cG, que la región 1-28 de ambas moléculas es muy diferente.

En algunos estudios previos se ha descrito la presencia de gastrina-CCK en el compartimiento muscular del estómago (Polak *et al.*, 1974; Shulkes *et al.*, 1983). Frente a estos trabajos, los resultados de este estudio no muestran ninguna célula endocrina reactiva en esta área. Parece lógico pensar que dadas las características histológicas del compartimiento muscular, que esta recubierto en su superficie interna por una capa semicornea, en esta zona no haya células endocrinas ya que no pueden entrar en contacto con los estímulos químicos de la dieta. Por lo tanto, parece razonable que en las aves, las células endocrinas productoras de gastrina se concentren en el píloro como zona de transición entre el estómago y el duodeno. Shulkes *et al.* (1983), que describen la presencia de factores gastrina-CCK en el compartimiento muscular, interpretan su hallazgo como un error metodológico al no separar, en sus experimentos, el píloro del compartimiento muscular, y considerar el conjunto únicamente como estómago. De forma similar, la IMR detectada en el compartimiento glandular fue también nula, resultado que está de acuerdo

con los obtenidos previamente por Polak *et al.* (1974) y Martínez *et al.* (1991b).

Los estudios realizados hasta el momento han puesto de manifiesto la presencia de factores semejantes a la CCK-8 en el intestino y en el sistema nervioso central de las aves (especialmente en pollo y pavo) (Dockray, 1979). Recientemente, se ha aislado y secuenciado la CCK del cerebro de pollo, la forma aislada corresponde a la CCK-8 y tiene la misma secuencia que en los mamíferos (Fan *et al.*, 1987). Este hallazgo confirma la conservación filogenética del núcleo activo del grupo de péptidos gastrina-CCK y sugiere que la CCK-8 es la forma molecular mayoritaria en el sistema nervioso central de las aves. En el intestino del pollo, por el contrario, el empleo del anticuerpo A-CCK pone de manifiesto la presencia de formas moleculares mayores al octapéptido. Estos hallazgos están de acuerdo con la distribución molecular de la CCK descrita en los mamíferos. Las formas moleculares largas (CCK-33/39 y mayores) predominan a nivel intestinal mientras que las formas cortas (CCK-8 principalmente) predominan a nivel central (Dockray, 1979b; Ryder *et al.*, 1981; Maton *et al.*, 1984; Bacarese-Hamilton *et al.*, 1984a y b y 1985; Beinfeld, 1985; Jansen y Lamers, 1986; Eberlein, 1988; Turkelson y Solomon, 1990). Jansen y Lamers (1986) estudiaron la proporción relativa de formas largas y cortas de CCK presentes en el cerebro de diferentes especies, entre ellas el pollo, encontrando que mientras que en los mamíferos las formas largas tienen una presencia relativamente importante en las especies no mamíferas la presencia de formas largas es despreciable. Este resultado fue confirmado posteriormente por Fan *et al.* (1987) y sugiere que la distribución molecular, y el procesamiento de las moléculas precursoras de la CCK, puede ser similar en las aves y en los mamíferos, presentándose un predominio de formas moleculares largas (mayores a la CCK-8) en el tracto digestivo.

Según la bibliografía, sólo se ha realizado un estudio en el cual se hayan cuantificado las células con IMR de tipo gastrina-CCK en el tracto digestivo de las aves. En el mismo, se cuantificó el número de células inmunorreactivas en el tracto digestivo de la codorniz, empleando un anticuerpo con IMR cruzada para gastrina y CCK (Yamada *et al.*, 1979). Al igual que en este trabajo nosotros hemos encontrado la mayor densidad de células inmunorreactivas a nivel antral (más de 100 células por campo). Fuera de esta zona la densidad de células inmunorreactivas era muy baja, oscilando entre

0 y 7 células por campo de observación; en el intestino la mayor densidad se encontraba rodeando el divertículo de la vesícula vitelina (aproximadamente 10 cm pre- y 10 cm post-) área en la cual se encontraban entre 3 y 7 células por campo. La alta concentración de células endocrinas reactivas en el píloro del pollo contrasta con la descrita para las células G en el antro pilórico de algunas especies de mamíferos, que es mucho menor (Solcia *et al.*, 1967); y puede deberse a diferencias anatómicas entre esta área en ambos grupos zoológicos. Mientras que en los mamíferos esta área es una zona muy extensa, en el pollo es un área muy poco aparente, aproximadamente 0,5 cm².

El hecho de que la mayor concentración de células endocrinas con IMR tipo CCK se localice a nivel del yeyuno distal y del íleon proximal puede estar relacionado con las funciones reguladoras postuladas para la CCK. Como ya hemos visto, en los mamíferos, la CCK actúa retrasando el vaciamiento gástrico y por lo tanto regulando y modificando el contenido intestinal (Dockray, 1989). En el pollo, que se caracteriza por tener un intestino corto en relación a su tamaño corporal y por lo tanto un tiempo corto de tránsito gastrointestinal, la presencia de CCK en el íleon puede ser un mecanismo importante de regulación del vaciamiento gástrico. La llegada de nutrientes a esta región podría indicar una sobrecarga del duodeno y del intestino proximal en sus procesos de digestión y absorción y por lo tanto una pérdida de nutrientes para el animal. Estos nutrientes, al llegar a esta zona del yeyuno-íleon, rica en células endocrinas productoras de CCK, producirían una importante liberación de esta hormona. La liberación de CCK en estas circunstancias regularía el vaciamiento gástrico y retrasaría la llegada de nuevo alimento al intestino, favoreciendo la correcta digestión y la absorción de los nutrientes ya presentes en el mismo. Sólo existe un estudio en el cual se correlacione la presencia de nutrientes (diferentes aminoácidos) en el tracto digestivo del pollo con la presencia de IMR gastrina-CCK a nivel plasmático (Yang *et al.*, 1989b). Este estudio, sin embargo, no clarifica el mecanismo por el cual los aminoácidos actúan estimulando la liberación de estos péptidos. El anticuerpo usado por Yang *et al.* (1989b) para la determinación de los niveles plasmáticos de CCK, según se desprende de la descripción realizada por los autores, es específico para el extremo carboxiterminal común de la gastrina-CCK y por lo tanto con una reactividad cruzada total entre ambos péptidos, sin especificarse la afinidad del mismo por la cG. En estas condiciones hay

que presuponer que se están valorando conjuntamente ambos péptidos. A esta objeción, hay que añadir además que en los mamíferos los aminoácidos son más potentes estimulando la liberación de gastrina que de CCK (Dockray y Gregory, 1989), si este mecanismo es igual en el pollo, Yang *et al.* (1989b) estarían valorando realmente la liberación conjunta de gastrina y de CCK. Desafortunadamente, y dado el desconocimiento de las características de la CCK en el intestino de las aves, no se han realizado más estudios sobre su liberación a partir de la presencia de nutrientes en el lumen intestinal.

Podemos concluir que, de acuerdo con los resultados de la inmunohistoquímica, en el tracto digestivo del pollo se encuentran presentes dos péptidos diferentes de la familia gastrina-CCK, uno confinado al píloro y que correspondería al péptido caracterizado como cG y el otro distribuido por duodeno, yeyuno e íleon proximal y medio, con una mayor densidad celular en el yeyuno distal y el íleon proximal, y que corresponde a un péptido más similar a la CCK de los mamíferos que la cG.

Los estudios morfológicos sobre la distribución y presencia de la CCK en el tracto gastrointestinal del pollo se han intentado completar determinando además los niveles plasmáticos de CCK tanto en ayunas como en estado postprandial. Para ello se usaron técnicas de RIA, empleando anticuerpos específicos para la CCK (RO15 y RO16). Estos anticuerpos, están obtenidos frente a la CCK-10 de los mamíferos y no presentaba reactividad cruzada con la gastrina (Turkelson *et al.*, 1986). Para ello, muestras de plasma fueron sometidas a un proceso de extracción y concentración de la CCK y a continuación se realizó un RIA específico para este péptido, siguiendo en todos los pasos un protocolo ampliamente usado para muestras procedentes de mamíferos (Turkelson *et al.*, 1986; Turkelson y Solomon, 1990). Los esfuerzos realizados para determinar CCK fueron infructuosos, encontrándose unos niveles muy variables, incluso para la misma muestra dentro del mismo ensayo. Estos resultados sugerían que la naturaleza molecular de la CCK presente en las muestras de pollo era muy diferente a la de los mamíferos y que por lo tanto era necesario un estudio profundo sobre las características de la CCK en el pollo antes de poder someter muestras de esta especie a un ensayo accesible y específico para la determinación de esta hormona. Estos estudios pasaban por una caracterización molecular de la CCK tanto a nivel tisular como a nivel sanguíneo y un estudio sobre las diferentes técnicas de

procesado de las muestras (extracción y concentración de la hormona). La envergadura de este trabajo superaba los objetivos de este proyecto y por lo tanto se desestimó su realización en aquel momento. Así, en la actualidad no se conoce la naturaleza molecular de la CCK en el intestino del pollo, ni sus niveles tisulares y plasmáticos, ni existe una técnica fiable para su cuantificación. Este hecho dificulta el estudio de las funciones reguladoras de la CCK de las aves, de los receptores implicados en sus efectos y de los factores que pueden actuar estimulando su liberación endógena.

2- EFECTOS DE LA cG Y LA CCK SOBRE LA MOTILIDAD Y LA COORDINACION GASTRODUODENAL

En este estudio, tanto la CCK-8 como la CCK-4 y la cG produjeron una disrupción de la coordinación gastroduodenal (GD). Esta disrupción se caracterizaba por una inhibición de la actividad eléctrica gástrica coincidente con una respuesta excitatoria (en el caso de la CCK-8) o inhibitoria (en el caso de la CCK-4 y de la cG) a nivel duodenal.

En los mamíferos, los efectos gástricos de la CCK *in vivo* son dobles: 1) reducción de la presión intragástrica mediada por una relajación del fundus (Bertaccini *et al.*, 1973; Liddle *et al.*, 1986b; Raybould *et al.*, 1987; Blackshaw y Grundy, 1991; Raybould, 1991) y 2) aumento de la frecuencia y de la amplitud de las contracciones del antro y del píloro (Castresana *et al.*, 1978; Desvigne *et al.*, 1980; Kuwahara *et al.*, 1986; Allescher *et al.*, 1989; Fargeas *et al.*, 1989). A nivel duodenal, también en los mamíferos, la CCK tiene acciones estimulantes, aumentando la amplitud de las contracciones y reduciendo el lumen duodenal (Keinke *et al.*, 1987; Allescher *et al.*, 1989; Blackshaw y Grundy, 1991). Estas acciones suponen un retraso en el vaciamiento gástrico tanto de sólidos como de líquidos; y por lo tanto un retraso en el tiempo de tránsito gastrointestinal (Debas *et al.*, 1975; Yamagishi y Debas, 1978; Mongel y Koegel, 1984; Liddle *et al.*, 1986b; Keinke *et al.*, 1987). Los resultados obtenidos muestran que la CCK-8 induce en el área GD del pollo efectos similares a los descritos para los mamíferos. En el pollo, tal y como hemos descrito anteriormente, el píloro es un área menos definida que en los mamíferos, diferenciable morfológicamente y con una importante función secretora pero probablemente, y debido a su mínimo desarrollo, poco importante en cuanto a su actividad motora. Estas diferencias contribuyen a que, en el pollo, el vaciamiento gástrico, tanto de líquidos como de sólidos, dependa fundamentalmente de la actividad motora del compartimiento muscular del estómago (Vergara *et al.*, 1989). La respuesta inhibitoria, debida a la infusión de CCK-8, observada a nivel gástrico, tanto en el compartimiento glandular como en el muscular, puede producir un retraso en el vaciamiento gástrico, similar al descrito en los mamíferos. Este efecto

de retardo puede verse incrementado también por la hiperactividad duodenal observada a las dosis más altas de CCK-8 y por la presencia de contracciones duodenales antiperistálticas a dosis bajas.

Durante la perfusión de CCK-8 la motilidad duodenal presentó cambios tanto cualitativos como cuantitativos. Tanto el duodeno proximal como el distal presentaron hiperactividades simultáneas en respuesta a la infusión de CCK. El incremento en la actividad eléctrica duodenal fue dosis dependiente en el duodeno proximal, mientras que en el distal la respuesta fue de tipo "todo o nada". La dosis más baja de CCK-8, que no produjo cambios significativos en la actividad eléctrica total generada en el duodeno, se acompañó de un incremento significativo en el número de contracciones antiperistálticas propagadas desde el duodeno distal al proximal. Ambos cambios en la motilidad duodenal pueden participar, tal y como hemos dicho anteriormente, en el retardo del vaciamiento gástrico inducido por la CCK. Las hiperactividades duodenales producirían un incremento sostenido de la presión intraduodenal, al igual que se ha descrito en los mamíferos (Keinke *et al.*, 1987; Allescher *et al.*, 1989), y por lo tanto impedirían el tránsito del contenido luminal a la vez que, y coincidiendo con el descenso en la actividad del compartimiento muscular gástrico, favorecerían el reflujo de cierto contenido duodenal hacia el estómago. De forma similar la dosis más baja de CCK, a pesar de no modificar la actividad gástrica, aumentaría el tiempo de tránsito gastrointestinal al favorecer el reflujo del contenido luminal hacia el estómago mediante el aumento en la frecuencia de las contracciones duodenales antiperistálticas. La presencia de contracciones duodenales antiperistálticas, conocidas como reflujos duodeno-gástricos ha sido descrita de forma fisiológica en el pollo (Dziuk y Duke, 1974). Su función sería la de favorecer el paso de sales biliares y enzimas desde el intestino hacia el estómago para acelerar y optimizar el proceso digestivo como mecanismo adaptativo en una especie que, comparativamente respecto al tamaño corporal, tiene un intestino corto. El único trabajo realizado hasta el momento sobre el papel de la CCK en la actividad motora del tracto digestivo de las aves describe también la presencia de ondas antiperistálticas aisladas coincidentes con inhibiciones gástricas, este tipo de actividad es equiparado con reflujos duodeno-gástricos (Savory *et al.*, 1981).

Cualitativamente, la hiperactividad duodenal inducida por la CCK es de

tipo no migratorio, según se observa cuando se implantan electrodos para el registro de la actividad motora en áreas más distales del intestino. Las contracciones duodenales durante este período se caracterizaban por tener una amplitud y un intervalo entre espigas similar al observado durante un ciclo GC fisiológico. Sin embargo, las espigas de actividad se presentaban de una forma continua sin ninguna interrupción durante el tiempo de infusión del péptido. La presencia de esta actividad continua explicaría el que la actividad eléctrica total en el duodeno esté significativamente incrementada durante el tiempo de infusión de la CCK. Igualmente, este tipo de actividad hace difícil establecer si las contracciones observadas tienen carácter peristáltico o antiperistáltico y de hecho eran semejantes a contracciones de tipo estacionario presentes a lo largo de todo el duodeno, de acuerdo con la acción previamente descrita por Keinke *et al.* (1987).

Estos resultados indican que, al igual que se ha demostrado en los mamíferos, la CCK en las aves actuaría regulando el vaciamiento gástrico y por lo tanto las características del contenido intestinal a fin de favorecer los procesos de digestión y absorción de los nutrientes.

La perfusión de CCK-4 y de cG indujo también una inhibición gástrica de carácter dosis dependiente, con una eficacia similar a la CCK-8 aunque las acciones de este último péptido fueron de mayor duración a las observadas para la CCK-4 o la cG. Estos resultados sugerirían la existencia de un único sitio de acción a nivel gástrico para estos péptidos. Este único sitio de acción estaría de acuerdo con la existencia de un solo receptor para los mismos, que sería incapaz de distinguir entre uno y otro péptido (CCK o gastrina). Esta acción común de la gastrina y de la CCK sobre la actividad del estómago, como es el descenso de la presión intragástrica, ha sido descrita también en los mamíferos (Valenzuela y Grossman, 1975; Raybould *et al.*, 1987). El hecho de que la CCK-4 muestre las mismas acciones que la CCK-8 o la cG indicaría además que la zona de reconocimiento receptor-efector requiere, al menos, de la presencia de esta zona de la molécula para que la interacción sea eficaz. Las diferentes duraciones de las acciones, para dosis equimolares, en una u otra molécula podrían depender de la mayor o menor eficacia de la interacción entre el receptor y zonas de la molécula peptídica fuera del tetrapéptido carboxiterminal. Esta interacción podría producirse, al menos en parte, en la zona comprendida entre los residuos 4 y 8 del extremo

carboxiterminal de la CCK. La CCK-8 y la cG únicamente comparten un residuo en esta zona (una Tyr, en posición 7 en ambas moléculas) , además, las interacciones estéricas que se producen entre los aminoácidos de esta zona de la cG (Dimaline y Lee, 1990) pueden acentuar las diferencias entre ambas moléculas. Estas variaciones estructurales podrían explicar el que las acciones inhibitorias de la CCK sean más prolongadas que las debidas a la cG.

Las acciones duodenales de la cG y de la CCK-4 fueron similares y contrarias a las obtenidas durante la perfusión de CCK-8, observándose una inhibición dosis dependiente de la actividad eléctrica total generada en esta área. Estos resultados sugieren la existencia, para estos péptidos, de dos sitios de acción diferentes a nivel duodenal y probablemente de dos tipos de receptores diferentes que actuando a través de diferentes vías, podrían producir respuestas tanto excitatorias como inhibitorias. Acciones similares, de tipo dual, debidas a los péptidos de la familia gastrina-CCK han sido descritas en la rata, especie en la cual la CCK puede producir tanto respuestas excitatorias como inhibitorias a nivel duodenal, aunque el umbral para las respuestas inhibitorias era superior que para las excitatorias (Giuliani *et al.*, 1990); lo que podría implicar una acción sobre dos receptores diferentes con diferentes afinidades por la CCK.

Tanto el antagonista específico para los receptores CCK-A L364,718 como el específico para los receptores CCK-B L365,260 se han mostrado altamente efectivos para antagonizar, en los mamíferos, muchas de las acciones en las cuales está implicada la CCK. En este trabajo, ambos antagonistas fueron incapaces de antagonizar los cambios en la actividad motora GD debidos a una infusión de CCK-8. Estos resultados muestran que hay diferencias entre los receptores para la CCK de las aves y sus homólogos en los mamíferos. De acuerdo con estos resultados, Campbell *et al.* (1991) han demostrado que el antagonista CCK-A L364,718 es ineficaz bloqueando los efectos estimulantes de la de la CCK sobre la secreción pancreática en pavo anestesiado. Estos mismos autores consiguieron antagonizar estas acciones estimulantes empleando un nuevo antagonista de la CCK de estructura polipeptídica (un BOC-derivado). Estos resultados, confirmarían la existencia de receptores específicos para CCK en el tracto gastrointestinal de las aves y, en concordancia con los obtenidos en este trabajo, ponen de manifiesto sus diferencias estructurales con sus homólogos en los mamíferos.

Otra cuestión importante respecto a las acciones de los péptidos gastrina-CCK es la sulfatación del residuo de Tyr (en posición 7 en la CCK y en la cG, pero en posición 6 en la gastrina). En los mamíferos sólo las formas sulfatadas de la CCK reproducen el espectro completo de acciones de la CCK (Huang *et al.*, 1989a), mientras que la sulfatación del residuo de Tyr en la gastrina es menos importante y este péptido muestra la misma actividad tanto en su forma sulfatada como en la no sulfatada (Dockray, 1977). En las aves, la sulfatación de la CCK parece ser menos importante que en los mamíferos, ya que experimentos similares a los descritos, no incluidos en este trabajo, muestran que las acciones motoras GD de la CCK-8 no sulfatada son iguales a las debidas a la CCK-8 sulfatada.

En el pollo, la actividad motora GD es muy constante y muestra un alto grado de coordinación, dando lugar a un ciclo de contracciones que se conoce como ciclo GD (Dziuk y Duke, 1974; Duke, 1982; Jiménez, 1991). Estas características hacen que el pollo sea un buen modelo experimental para el estudio de la coordinación GD, ya que en los mamíferos la coordinación GD es un fenómeno poco claro, que sólo es totalmente evidente durante los períodos interdigestivos (Malagelada y Azpiroz, 1989). A pesar de esta constancia, y como ya hemos visto, diferentes condiciones pueden alterar la coordinación GD en las aves. Una de estas condiciones, probablemente la más trascendente para los estudios realizados en este trabajo, es el estado nutricional del animal. El pollo puede ser considerado como un animal que está ingiriendo comida de forma más o menos continua a lo largo de los períodos de luz, con lo cual su estómago siempre tiene cierto contenido y es éste el responsable de la constancia y coordinación del ciclo GD. Cuando el animal está en período de ayunas se observan alteraciones en el ciclo de base GD y además se reduce de forma importante la frecuencia del mismo (Roche, 1973). En estos animales es difícil obtener registros electromiográficos estándares y constantes de la actividad GD, habiendo una gran variabilidad de unos animales a otros; además, en estas condiciones es difícil observar cambios en la coordinación GD. Por esta razón los animales empleados en esta experiencia estaban en estado postprandial, teniendo la comida a libre acceso durante todo el tiempo de registro.

En estas condiciones, y debido a que la dieta recibida por los animales no era acalórica, no puede descartarse la liberación endógena de CCK, de cG

o de otras hormonas que puedan interactuar con ellas en sus acciones. Los resultados obtenidos muestran una clara correlación entre las dosis de péptido perfundidas y los cambios observados en la motilidad. Por lo tanto hay que asumir que la CCK y la cG liberadas endógenamente están produciendo "per se" un efecto que debe ser aditivo con la hormona que estamos administrando exógenamente. Las dosis empleadas en este estudio, especialmente las más altas, están probablemente en un rango farmacológico o suprafisiológico. De acuerdo con Keinke *et al.* (1987) el vaciamiento gástrico está regulado, en condiciones fisiológicas, no sólo por una hormona sino por la cooperación de varias junto a otros mecanismos reguladores. Hay que esperar, que en estas condiciones, dosis fisiológicas exógenas de una hormona produzcan cambios mínimos, difíciles de detectar, sobre sus sistemas diana. El uso de dosis suprafisiológicas de CCK o de cG permite diferenciar mejor cambios producidos en las variables implicadas en el control del vaciamiento gástrico y de la coordinación GD.

3 - MECANISMO DE ACCION DE LA CCK SOBRE LA MOTILIDAD GASTRODUODENAL

Como hemos visto, la infusión de CCK-8 produce una disrupción de la coordinación gastroduodenal consistente en una inhibición de la actividad gástrica, tanto del compartimiento glandular como del muscular, coincidiendo con una hiperactividad duodenal simultánea en el duodeno proximal y en el distal.

En los mamíferos, los retardos del vaciamiento gástrico debidos a los lípidos o a las soluciones ácidas se ha demostrado que están mediados, al menos en parte, por vías opioides (Fioramonti *et al.*, 1988; Akkermans *et al.*, 1989). En las aves, se ha demostrado que los opioides están involucrados en la génesis de hiperactividades duodenales e intestinales, equiparables a fases III del MMC, coincidentes con inhibiciones de la actividad gástrica. La administración exógena de met-enkefalina o sus análogos induce inhibición gástrica junto a una hiperactividad intestinal de carácter migratorio, iniciada a nivel duodenal. Estos efectos se deben a la acción combinada de este neurotransmisor sobre receptores opioides de tipo μ , δ y k (Jiménez, 1991; Jiménez *et al.*, 1992a y 1993b). El empleo de agonistas específicos μ -opioides reproduce las inhibiciones gástricas y las hiperactividades intestinales de tipo migratorio. Sin embargo, cuando se administra un agonista específico δ -opioide se observa una inhibición gástrica coincidente con una hiperactividad duodenal que no migra al resto del intestino (Jiménez *et al.*, 1993b). Estos resultados pueden sugerir una participación del sistema opioide endógeno en el mecanismo de acción de la CCK. La relación entre opioides endógenos y CCK se ha puesto de manifiesto también en algunas especies de mamíferos. Así en el cobayo, *in vitro*, la met-enkefalina se ha visto que actúa antagonizando las acciones excitatorias intestinales del análogo de la CCK ceruleina (Yau *et al.*, 1983).

Esta hipótesis fue testada mediante el empleo de antagonistas específicos para los receptores de tipo μ (naloxona) y de tipo δ (naltrindol). Ni la administración conjunta ni por separado de ambos antagonistas provocó

cambios significativos en las respuestas gastroduodenales debidas a la infusión de CCK-8. Estos resultados indican que el mecanismo de acción de la CCK no implica la participación de vías opioides ni en sus acciones gástricas ni en las duodenales.

Diferentes estudios sobre la liberación de acetilcolina en el plexo mientérico y en el músculo longitudinal intestinal indican que la CCK, así como otras hormonas relacionadas, estimula la liberación de este neurotransmisor para producir las acciones excitatorias intestinales (Kuwahara *et al.*, 1986; Yau *et al.*, 1983; Allescher *et al.*, 1989). En el mismo sentido diferentes estudios *in vivo* han demostrado que el bloqueo del sistema colinérgico con atropina produce una inhibición parcial de las respuestas excitatorias mediadas por la CCK en antro (Kuwahara *et al.*, 1986), piloro (Allescher *et al.*, 1989) y duodeno (Giuliani *et al.*, 1990). Sin embargo, el bloqueo de la transmisión nerviosa con tetrodotoxina no es capaz de inhibir completamente las acciones de la CCK en ninguna de estas áreas (Allescher *et al.*, 1989; Sheurer *et al.*, 1983b), lo que indica un efecto directo de la CCK sobre células musculares. De hecho, se ha demostrado un efecto excitatorio directo de la CCK sobre células musculares antrales aisladas (Morgan *et al.*, 1978, Grider y Makhlof, 1987) así como la presencia de receptores específicos para CCK en las mismas (Grider y Makhlof, 1987).

En este trabajo, el bloqueo del sistema colinérgico con atropina (Atr) produjo una abolición completa del ciclo gastroduodenal. La actividad eléctrica gástrica permaneció inhibida hasta 30-45 min tras la administración de la Atr, mientras que la actividad duodenal se redujo sólo parcialmente. En estas condiciones la CCK no fue capaz de producir ningún tipo de respuesta excitatoria a nivel gástrico mientras que la hiperactividad duodenal no se modificó significativamente. La acción de la Atr sobre la actividad gástrica es similar a la descrita por Roche (1973), este autor administra Atr por vía *i.m.* (0,1 mg/kg) y obtiene una inhibición progresiva de la actividad del compartimiento muscular del estómago coincidente con la aparición de hiperactividades en el duodeno distal. En este caso la Atr (0,1 mg/kg) se administró por vía *i.v.* y el efecto inhibitorio gástrico fue evidente inmediatamente y sólo de forma aislada aparecieron fases de hiperactividad en el duodeno antes de iniciarse la perfusión de CCK. El hecho de que la respuesta duodenal a la CCK no se vea alterada indica que no hay

participación colinérgica en los efectos excitatorios duodenales debidos a la CCK. En el mismo sentido, experiencias *in vitro*, en íleon longitudinal de pollo, han demostrado que la Atr no modifica las respuestas excitatorias debidas a la CCK en esta área intestinal (Martín *et al.*, 1992).

La implicación del sistema adrenérgico en las acciones de la CCK se valoró mediante el bloqueo de los receptores α - y β -adrenérgicos con fentolamina y propranolol respectivamente. El bloqueo adrenérgico no modificó por sí mismo la actividad motora del área gastroduodenal y tampoco modificó significativamente las acciones, inhibitorias gástricas o excitatorias duodenales, debidas a la infusión de CCK. De acuerdo con este resultado, el bloqueo de la transmisión adrenérgica con guanetidina tampoco modifica las acciones de la CCK en el área gastroduodenal del hurón (Blackshaw y Grundy, 1991).

Los resultados obtenidos a partir del bloqueo de los sistema adrenérgico y colinérgico muestran que las respuestas excitatorias duodenales inducidas por la CCK no están mediadas ni por vías colinérgicas ni adrenérgicas. Lo que sugiere la implicación de un neurotransmisor excitatorio no-adrenérgico y no-colinérgico (NANC) o bien un efecto directo de la CCK sobre las células musculares. Experiencias *in vitro* en íleon longitudinal de pollo han demostrado la implicación de la sustancia P y de la serotonina en las respuestas excitatorias de la CCK en esta área intestinal, así como cierto efecto directo sobre células (Martín *et al.*, 1992). Esto puede sugerir que los mismos mecanismos estén implicados en las acciones excitatorias de la CCK en otras zonas del intestino, como el duodeno.

En los mamíferos, se ha demostrado que tanto la inervación esplácnica como la vagal participan en las acciones gástricas de la CCK y que las vías involucradas en estas acciones son hexametonio resistentes y sensitivas respectivamente (Raybould *et al.*, 1987). El bloqueo de la transmisión ganglionar con hexametonio produjo una reducción de la frecuencia de todas las áreas gástricas estudiadas así como de la actividad duodenal. El hexametonio bloqueó parcialmente la respuesta a la CCK en el compartimiento glandular y en el músculo cráneo-dorsal del compartimiento muscular del estómago. Estos resultados sugieren que el hexametonio podría actuar bloqueando la estimulación de vías inhibitorias inducida por la CCK en estos

órganos, pero no en el músculo caudo-dorsal del compartimiento muscular. El incremento en la respuesta duodenal a la CCK observada tras la administración del hexametonio podría sugerir la presencia de vías nerviosas de tipo inhibitorio, sensibles al hexametonio, en el duodeno.

Numerosos autores han descrito la participación de las vías vagales en las respuestas gástricas mediadas por CCK en los mamíferos (Raybould *et al.*, 1987; Dockray, 1989; Forster *et al.*, 1990 y 1991; Blackshaw y Grundy, 1991; Raybould, 1991). Algunos de estos autores hipotetizan que la CCK podría actuar directamente sobre receptores específicos localizados en las terminaciones vagales de la pared gástrica. Esta interacción desencadenaría un reflejo vago-vagal que produciría relajación del músculo liso y por lo tanto un descenso de la presión intragástrica que sería, al menos en parte, responsable del retardo en el vaciamiento gástrico que se observa tras la administración exógena de CCK o tras su liberación endógena (Dockray 1989 y 1991). En este estudio, el papel de la inervación vagal en las respuestas gastroduodenales de la CCK se estudió en animales en los cuales se había realizado una vagotomía bilateral.

La vagotomía produjo un descenso en la frecuencia del ciclo gastroduodenal así como una pérdida en la coordinación del mismo, que afectó principalmente al compartimiento glandular del estómago. Estas alteraciones del ciclo gastroduodenal son semejantes a las ya descritas anteriormente en el pavo (Chaplin y Duke, 1988) y en el pollo (Roche y Decerprit, 1977). La vagotomía transformó la respuesta inhibitoria gástrica de la CCK en excitatoria, pero no modificó la hiperactividad duodenal. En los mamíferos, la administración de CCK en animales vagotomizados produce incrementos de la presión intragástrica (Raybould *et al.*, 1987; Raybould y Taché, 1988;), sin cambios en las respuestas duodenales (Blackshaw y Grundy, 1991). Estas acciones se explican a partir de un doble efecto (inhibitorio y excitatorio) de la CCK a nivel gástrico. El efecto excitatorio sería directo sobre células musculares mientras que el inhibitorio estaría mediado por un reflejo vago-vagal, de forma que éste último enmascararía las acciones excitatorias que sólo serían evidentes cuando se elimina esta acción vagal. Las diferencias entre las respuestas gástricas a la CCK tras la vagotomía y tras el tratamiento con hexametonio sugieren que, en el pollo, algunos de los efectos vagales son hexametonio resistentes.

En la rata, se ha sugerido que el mediador NANC VIP es el mediador que regula el reflejo de acomodación gástrica al alimento. De esta forma, el neurotransmisor final inhibitorio mediando los efectos relajantes gástricos de la CCK sería el VIP, liberado a nivel de las terminaciones vagales de la pared gástrica (Dockray, 1991; Forster *et al.*, 1991). Sin embargo, muchas de las acciones en las que, *in vivo*, se implica al VIP no pueden ser reproducidas *in vitro* (Daniel *et al.*, 1983; Gonda *et al.*, 1988); lo que implicaría la existencia de otro mediador NANC involucrado en los mismos procesos que el VIP. Recientemente, el óxido nítrico (NO) ha sido propuesto como un neurotransmisor putativo inhibitorio NANC en el tracto gastrointestinal. Estudios *in vivo* han demostrado que el NO está implicado en las acciones inhibitorias mediadas por el vago en el píloro del perro (Allescher *et al.*, 1992) y en el reflejo de acomodación gástrica en el cobayo (Desai *et al.*, 1991). De forma similar, se ha demostrado *in vitro* que la estimulación de terminaciones nerviosas NANC del fundus gástrico de la rata induce la liberación de NO (Boeckxstaens *et al.*, 1990). Estos antecedentes permiten suponer una implicación del NO en las acciones inhibitorias gástricas de la CCK.

La implicación del NO en los efectos de la CCK se estudió mediante el empleo de un inhibidor de la síntesis endógena de NO, el metil ester de la N⁶-L-Arginina (L-NAME). El L-NAME produjo una inhibición significativa de la actividad gástrica y transformó la acción inhibitoria de la CCK a este nivel en una respuesta excitatoria. Este resultado sugiere que la acción inhibitoria estimulada por la CCK está mediada principalmente por NO o un compuesto relacionado. Esta acción no fue significativa a nivel del músculo caudo-dorsal del compartimiento muscular gástrico, lo que puede sugerir que otro neurotransmisor inhibitorio, probablemente VIP, podría estar mediando, al menos en parte, estas acciones de la CCK. Esta hipótesis está en concordancia con resultados obtenidos *in vitro*, que demuestran la presencia tanto de NO como de VIP mediando respuestas de relajación en el fundus de rata (Boeckxstaens *et al.*, 1990). Las diferencias observadas entre los efectos de la CCK en animales vagotomizados en presencia y en ausencia de L-NAME sugieren la existencia de dos vías diferentes regulando la liberación de NO, una estaría mediada por los nervios vagos mientras que la otra sería de origen intrínseco. La presencia de estos dos sistemas productores de NO, extrínseco e intrínseco, ha sido postulada también en el estómago del perro (Allescher *et al.*, 1992).

Las similitudes observadas entre las respuestas gástricas a la CCK en animales vagotomizados, tratados con hexametonio o tratados con L-NAME ponen de manifiesto la importante participación de vías nerviosas eferentes de tipo inhibitorio, al menos en parte vagales, en las acciones de la CCK. Cuando esta acción inhibitoria se bloquea de alguna forma entonces se ponen de manifiesto acciones excitatorias, probablemente debidas al efecto directo de la CCK sobre las células musculares del estómago. Este efecto es muy similar al descrito en aquellas especies en las que la CCK tiene acciones excitatorias a nivel gástrico (Raybould *et al.*, 1987; Raybould y Taché, 1988).

En el duodeno, el bloqueo de la producción de NO por L-NAME cambió el patrón de motilidad coordinado con la actividad gástrica, apareciendo fases de hiperactividad alternadas con fases de quiescencia. Las hiperactividades eran semejantes a fases III del MMC originadas a nivel duodenal, y migraban a alta velocidad desde el duodeno proximal al distal. La administración de CCK, tanto en los animales no vagotomizados como en los vagotomizados, durante la infusión de L-NAME incrementó de forma significativa la hiperactividad duodenal inducida por la hormona. Este hecho podría indicar la presencia de un sistema inhibitorio de secreción tónica, mediado por NO, en el duodeno. Así cuando esta acción inhibitoria de tipo tónico se bloquea los efectos excitatorios de la CCK se harían mucho más evidentes. La existencia de este sistema puede explicar además los cambios en la motilidad duodenal observados durante el período de infusión del L-NAME; la eliminación del mismo supondría un incremento de la actividad global del duodeno, que en la práctica es lo que se puede observar. La liberación tónica de NO ha sido descrita también en el intestino del perro (Allescher *et al.*, 1992). La actividad duodenal durante la perfusión de L-NAME, alternancia de fases de quiescencia con hiperactividades migrando del duodeno proximal al distal, es similar a la observada cuando un MMC se origina en el duodeno y ello sugiere que la secreción tónica de NO podría participar en la regulación de la motilidad intestinal, concretamente en la regulación de los MMCs. De acuerdo con esta hipótesis, (Maczka *et al.*, 1992) han demostrado que el NO está implicado en la regulación de la motilidad intestinal en el perro *in vivo*, de forma que el bloqueo de su liberación produce un acortamiento de los MMCs en período de ayunas y genera fases III del MMC durante el período postprandial.

Recientemente, se ha descrito que los alquil ésteres de la L-arginina (L-

Arg), como es el caso del L-NAME, podrían tener cierta acción antagonista sobre los receptores de tipo muscarínico (Cheek *et al.*, 1992). Así, algunas de las acciones achacas al L-NAME, y por lo tanto al NO endógeno, podrían deberse en parte a esta acción antagonista muscarínica y no a la acción de un mediador inhibitorio endógeno derivado de la L-Arg. En este estudio se observa cierta semejanza entre las acciones gastroduodenales del L-NAME y de la Atr, que podría, al menos en parte, explicarse por esta acción muscarínica del L-NAME. Ambas sustancias producen inhibición de la actividad gástrica, que en el caso de la Atr es una abolición total de la misma. Las acciones duodenales son mucho más evidentes para el L-NAME que para la Atr, tal y como hemos descrito la Atr sólo en casos aislados indujo hiperactividades duodenales. A pesar de estas semejanzas los efectos de la infusión de CCK en ambas condiciones fueron netamente diferentes, especialmente a nivel gástrico. El hecho de que la CCK en presencia de L-NAME produjese una respuesta excitatoria en el estómago, pero no en presencia de Atr sugiere una acción específica del sistema mediado por NO en la respuesta inhibitoria gástrica debida a la CCK. De los resultados obtenidos no se puede, sin embargo, descartar una posible acción del L-NAME sobre receptores muscarínicos. La importancia de esta actividad muscarínica sólo podría valorarse mediante el empleo de otros derivados no alquil ésteres de la L-Arg. Estudios posteriores (datos no incluidos en este trabajo, pendientes de publicación) sobre la implicación del NO en la regulación de la motilidad intestinal empleando inhibidores de tipo no alquil ésteres de la síntesis endógena de NO (como la N^G-nitro-L-arginina y la N^G-monometil-L-arginina) han mostrado unas acciones básicamente iguales que el L-NAME sobre la motilidad gastroduodenal. Estos resultados demuestran que las acciones del L-NAME se deben a una acción específica sobre el sistema endógeno de producción de NO y que por lo tanto las implicaciones descritas entre NO y CCK no se deben a una acción inespecífica sobre receptores muscarínicos.

Los efectos del nitroprusiato sódico (NaNP), una molécula donadora de NO, sobre la motilidad gastroduodenal corroboran la existencia de una liberación endógena de NO como mediador inhibitorio en el tracto digestivo del pollo. Las hiperactividades duodenales observadas en ocasiones tras los efectos inhibitorios debidos a las dosis más altas de NaNP se han observado también en preparaciones de músculo liso, en las cuales la estimulación de

vías NANC se caracteriza por una acción bifásica consistente en una inhibición seguida de una respuesta excitatoria post-excitación. De la misma forma, se ha demostrado que el NO reproduce *in vitro* tanto las acciones inhibitorias como el rebote excitatorio posterior y que las dosis necesarias para poner de manifiesto las acciones excitatorias son superiores a las necesarias para mostrar respuestas inhibitorias (Ward *et al.*, 1992). Por lo tanto, el NaNP, como donador de NO, reproduce *in vivo* las acciones observadas *in vitro* para los neurotransmisores inhibitorios NANC. Las hiperactividades post-inhibición inducidas por el NaNP apoyan la hipótesis, ya expuesta, de la implicación de los cambios en la secreción de NO en la génesis y modulación de los MMCs.

Los resultados obtenidos muestran que las acciones gástricas de la CCK en el pollo están mediadas principalmente a través de vías vagales y que el NO, probablemente tanto vagal como liberado intrínsecamente, está involucrado directamente en las mismas. A nivel duodenal, la acción de la CCK parece estar mediada por vías excitatorias NANC y no mediadas por opioides, aunque, a partir de los resultados obtenidos, no puede excluirse cierto efecto directo sobre las células musculares. Igualmente se aportan buenas evidencias para suponer la liberación tónica de NO a nivel intestinal y aceptar que este mediador está implicado en la regulación de la motilidad intestinal en el pollo.