

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

EL CONTROL DE LA SECRECIÓN ÁCIDA GÁSTRICA EN
EL RATÓN: CAMBIOS ASOCIADOS A LA GASTRITIS O A
LA FALTA DEL RECEPTOR DE TIPO 2 DE LA
SOMATOSTATINA.

LAURA PIQUERAS RUIZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 27 d' Octubre de 2003 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Esteban Morcillo Sánchez
- Dr. D. Miguel Ángel Plaza Carrión
- Dra. D^a. Isabel Guillén Salazar
- Dr. D. Esteban Saperas Franch
- Dra. D^a. Patrocinio Vergara Esteras

Va ser dirigida per:

Dr. D. Vicente Martínez Perea

Dra. D^a. Victoria Villagrana Sebastià

©Copyright: Servei de Publicacions
Laura Piqueras Ruiz

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5955-0

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

**Facultat de Farmàcia
Departament de Farmacologia**

**El Control de la Secreción Ácida
Gástrica en el Ratón: Cambios
Asociados a la Gastritis o a la
Falta del Receptor de Tipo 2 de la
Somatostatina**

Laura Piqueras Ruiz
Valencia, 2003

VNIVERSITAT Ò DE VALÈNCIA



Facultat de Farmàcia
Departament de Farmacologia

**El Control de la Secreción Ácida
Gástrica en el Ratón: Cambios
Asociados a la Gastritis o a la
Falta del Receptor de Tipo 2
de la Somatostatina**

Memoria presentada por
Laura Piqueras Ruiz
para optar al grado de
Doctora en Farmacia

Directores:
Dr. Vicente Martínez Perea
Dra. Victoria Villagrasa Sebastián

VICENTE MARTÍNEZ PEREA, Principal Scientist, Department of Integrative Pharmacology – Gastrointestinal Biology, AstraZeneca R&D, y VICTORIA VILLAGRASA SEBASTIÁN, Profesora del Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología de la Universidad Cardenal Herrera -CEU,

HACEN CONSTAR:

Que la memoria titulada "El control de la secreción ácida gástrica en el ratón: Cambios asociados a la gastritis o a la falta del receptor de tipo 2 de la somatostatina", presentada por LAURA PIQUERAS RUIZ para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada bajo su dirección y considerándola finalizada autorizan su presentación para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste firman la presente en Valencia a diez de Junio de dos mil tres.

Fdo. Vicente Martínez Perea

Fdo. Victoria Villagrasa Sebastián

A mi familia

A mis directores, Vicente Martínez Perea y Victoria Villagrasa Sebastián por su confianza y apoyo.

A Vicente, por su gran interés, dedicación y esfuerzo en este proyecto, sin cuya ayuda y perseverancia, hubiera sido difícil concluir. Por ser, sobre todo, un excelente maestro.

A M^a Jesús, por introducirme en el mundo de la investigación, por su continuo apoyo y por enseñarme a ser un poco más optimista y a valorar mi trabajo.

A Yvette Taché y Lixing Wang por sus consejos e inestimable ayuda en los estudios inmunohistoquímicos.

Al Dr. J. H. Schaeffer y a Merck (Merck Research Laboratorios) por la cesión de algunos de los compuestos empleados en estos estudios y por facilitar los animales SSTR2 -/-, sin los cuales este trabajo hubiese sido imposible. Al Dr. D.H Coy por ceder algunos de los péptidos empleados en este estudio. Al "Antibody-RIA Core" del "CURE: Digestive Diseases Center" (Universidad de California en Los Angeles) por los anticuerpos empleados. A Juanma y Jorge por su ayuda con la histología.

A Amparo, Elisa, Geles, M^a Pilar, Ángeles, Olga, Carles, Jorge, Enric, Pablo, Dani, Mila y Ana; por los buenos momentos vividos y compartidos durante estos años, pero sobre todo por ser tan buenos amigos. A Rafa por su ayuda con el ordenador.

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación personal a través de una Beca de Formación de Personal Docente e Investigador de la Fundación San Pablo-CEU y el apoyo de la Generalitat Valenciana (Conselleria de Cultura, Educació i Ciència) a través del proyecto *GV99-23-1-4*.

A todos ellos, muchas gracias, puesto que sin su ayuda este trabajo no hubiese sido posible.

Abreviaturas

AINE	Anti-inflamatorio no esteroideo
ANOVA	Análisis de la varianza
ARNm	ARN mensajero
CCK	Colecistoquinina
CCK1	Receptor de tipo 1 de la colecistoquinina (antes CCK _A)
CCK2	Receptor de tipo 2 de la colecistoquinina (antes CCK _B)
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
COX-2	Ciclo-oxigenasa de tipo 2
CRF	Factor liberador de corticotropina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNAc	DNA complementario
ECL	Enterocromafin (célula de tipo)
GH	Hormona del crecimiento
GIP	Polipéptido insulínico dependiente de glucosa
GLP	Polipéptido asociado al glucagón
GRP	Péptido liberador de gastrina
H2	Receptor de tipo 2 de la histamina
ip	Intraperitoneal
iv	Intravenoso
KLH	Hemocianina de lapa (Keyhole limpet hemocyanin)
M1	Receptor colinérgico muscarínico de tipo 1
M3	Receptor colinérgico muscarínico de tipo 3
PAC ₁	Receptor de PACAP
PACAP	Polipéptido activador de la adenilil ciclasa pituitaria
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
RT-PCR	Transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa
sc	Subcutáneo
SEM	Error estándar de la media
SSTR	Receptor de la somatostatina
TRH	Hormona liberadora de tirotrópina
TSH	Hormona estimulante del tiroides
VIP	Polipéptido intestinal vasoactivo
VPAC ₁ /VIP1	Receptor de VIP/PACAP de tipo 1
VPAC ₂ /VIP2	Receptor de VIP/PACAP de tipo 2

Índice	i
I - INTRODUCCIÓN	1
1 - La secreción ácida gástrica	3
1.1 - Mecanismos estimulantes de la secreción ácida gástrica	3
1.1.1 - Gastrina	3
1.1.2 - Histamina	4
1.1.3 - Acetilcolina	6
1.2 - Mecanismos inhibidores de la secreción ácida gástrica	6
1.2.1 - Somatostatina	6
1.2.2 - Bombesina	14
1.2.3 - Polipéptido activador de la adenilil ciclasa pituitaria (PACAP)	15
2 - Alteraciones en el control de la secreción ácida gástrica: Modelos genéticos e inflamación	16
2.1 - Modelos animales modificados genéticamente: Aplicación en estudios de secreción gástrica	16
2.2 - La función gástrica en estados inflamatorios	18
2.2.1 - Mediadores inflamatorios y función gástrica	20
II - OBJETIVOS	23
III - MATERIAL Y MÉTODOS	27
1 - Cambios en la Secreción Ácida y el Vaciamiento Gástrico Asociados a la Gastritis	29
1.1 - Animales	29
1.2 - Inducción de la gastritis	29
1.3 - Control de la ingesta y el peso corporal	29
1.4 - Histología gástrica	29
1.4.1 - Obtención y procesado de muestras	29
1.4.2 - Evaluación de las muestras y contaje de mastocitos	30
1.5 - Vaciamiento gástrico de una comida sólida nutritiva	30
1.6 - Secreción ácida gástrica	31
1.6.1 - Cirugía	31
1.6.2 - Valoración de la secreción ácida gástrica	31
1.6.3 - Protocolos experimentales	32
1.7 - Reactivos utilizados	32
2 - Secreción Ácida y Vaciamiento Gástrico en Ratones Carentes del Receptor de Tipo 2 de la Somatostatina	33

2.1 - Animales	33
2.1.1 - Inactivación del receptor SSTR2	33
2.1.2 - Mantenimiento de los animales	33
2.2 - Histología del estómago	33
2.3 - Inmunohistoquímica para gastrina y somatostatina	34
2.3.1 - Obtención y procesado de las muestras	34
2.3.2 - Protocolo de inmunohistoquímica	34
2.3.3 - Contajes celulares	35
2.4 - Vaciamiento gástrico de una comida sólida nutritiva	35
2.5 - Valoración del pH intragástrico	36
2.6 - Secreción ácida gástrica	36
2.6.1 - Cirugía y valoración de la secreción ácida gástrica	36
2.6.2 - Protocolos experimentales	36
2.7 - Reactivos utilizados	38
3 - Interacción entre Somatostatina y Bombesina o PACAP en el Control de la Secreción Ácida Gástrica	39
3.1 - Animales	39
3.2 - Secreción ácida gástrica	39
3.2.1 - Cirugía y valoración de la secreción ácida gástrica	39
3.2.2 - Protocolos experimentales	39
3.3 - Reactivos utilizados	42
4 - Análisis Estadístico	42
IV - RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
1 - Cambios en la Secreción Ácida y el Vaciamiento Gástrico Asociados a la Gastritis	45
1.1 - Antecedentes y objetivos	45
1.2 - Resultados	46
1.2.1 - Estudio histológico	46
1.2.2 - Cambios en la ingesta y en el peso corporal asociados al tratamiento con yodoacetamida	48
1.2.3 - Vaciamiento gástrico de una comida sólida nutritiva	50
1.2.4 - Secreción ácida gástrica basal	51
1.2.5 - Efecto de la pentagastrina y la histamina sobre la secreción ácida	52
1.2.6 - Efecto del cromoglicato sódico sobre la secreción ácida estimulada con pentagastrina o histamina	55

1.2.7 - Efecto de la indometacina sobre la secreción ácida estimulada con pentagastrina o histamina	57
1.3 - Discusión	59
2 - Secreción Ácida y Vaciamiento Gástrico en Ratones Carentes del Receptor de Tipo 2 de la Somatostatina	65
2.1 - Antecedentes y objetivos	65
2.2 - Resultados	66
2.2.1 - Histología del estómago	66
2.2.2 - Inmunohistoquímica para gastrina y somatostatina	68
2.2.3 - Vaciamiento gástrico de una comida sólida nutritiva en ratones SSTR2 +/+ y SSTR2 -/ -	71
2.2.4 - pH intragástrico en ratones SSTR2 +/+ y SSTR2 -/ -	72
2.2.5 - Secreción ácida gástrica basal y respuesta a secretagogos en ratones SSTR2 +/+ y SSTR2 -/ - anestesiados con uretano	72
2.2.6 - Efectos de la inmunoneutralización de la gastrina y la somatostatina sobre la secreción basal	75
2.2.7 - Efecto del bloqueo de los receptores H2 y del bloqueo colinérgico sobre la secreción basal en animales SSTR2 +/+ y SSTR2 -/ - y sobre la secreción estimulada en animales SSTR2 +/+	78
2.2.8 - Efectos de la somatostatina-14 sobre la secreción ácida gástrica estimulada por secretagogos en animales SSTR2 +/+ o la secreción basal en animales SSTR2 -/ -	80
2.2.9 - Efectos de los análogos de la somatostatina sobre la secreción ácida gástrica en ratones SSTR2 +/+ y SSTR2 -/ -	82
2.2.10 - Efecto del antagonista selectivo de los receptores SSTR2, PRL-2903, sobre la secreción basal y las acciones de la somatostatina	86
2.3 - Discusión	89
3 - Interacción entre Somatostatina y Bombesina o PACAP en el Control de la Secreción Ácida Gástrica en el Ratón	97
3.1 - Antecedentes y Objetivos	97
3.2 - Resultados	99
3.2.1 - Efectos de la bombesina sobre la secreción ácida gástrica basal y estimulada por secretagogos en ratones SSTR2 +/+ y sobre la secreción basal en ratones SSTR2 -/ -	99
3.2.2 - Efectos de la bombesina sobre la secreción ácida gástrica en ratones SSTR2 +/+ tratados con anticuerpo anti-somatostatina o con el antagonista de los receptores SSTR2, PRL-2903	102

3.2.3 - Efecto del PACAP-38 sobre la secreción ácida gástrica basal y estimulada por secretagogos en ratones SSTR2 +/+ y sobre la secreción basal en ratones SSTR2 -/-	104
3.2.4 - Efectos del PACAP-38 sobre la secreción ácida gástrica en ratones SSTR2 +/+ tratados con anticuerpo anti-somatostatina o con el antagonista de los receptores SSTR2, PRL-2903	107
3.3 - Discusión	109
V - DISCUSIÓN GENERAL	119
VI - CONCLUSIONES	125
VII - BIBLIOGRAFÍA	129
VIII - ANEXO	143

I – INTRODUCCIÓN

1- La Secreción Ácida Gástrica

En condiciones normales la secreción ácida gástrica está regulada por vías tanto centrales como periféricas, que engloban mecanismos nerviosos, neuroendocrinos, endocrinos, paracrinos e incluso autocrinos, dependientes de la síntesis y secreción de péptidos y otros factores químicos de regulación. El equilibrio entre estos sistemas resulta en los patrones normales de secreción gástrica que se observan en los animales o en la especie humana.

Cuantitativamente, los patrones normales de secreción ácida dependen del balance entre sistemas estimulantes (principalmente los sistemas gastrina-histamina y colinérgico) e inhibitorios (dependientes principalmente de la hormona somatostatina).

1.1 - Mecanismos estimulantes de la secreción ácida gástrica

1.1.1 - Gastrina

Desde su aislamiento y caracterización a partir de mucosa gástrica porcina son numerosos los estudios que demuestran el papel fundamental de la gastrina en la regulación de la secreción ácida gástrica. Se trata de la única hormona peptídica liberada en el estómago que estimula la secreción ácida gástrica.

En el estómago, la gastrina se sintetiza en células G localizadas en las glándulas de la mucosa antral, asociadas a células D y células mucosas (Lloyd y Debas, 1994; Lloyd y Walsh, 1994; Hersey y Sachs, 1995). Las células G son células endocrinas de tipo abierto, con una membrana apical en contacto con el lumen gástrico. Su estimulación por factores luminales, principalmente péptidos, algunos aminoácidos y alcohol, induce la liberación de gastrina a la circulación sanguínea. Otros estímulos, tanto nerviosos (colinérgicos vagales y adrenérgicos) como endocrinos, afectan también la liberación de gastrina. A través de la circulación la gastrina llega a la región fúndica del estómago, donde actúa sobre sus células diana, las células de tipo enterocromafin (ECL). Por lo tanto, el mecanismo de acción de la gastrina es de tipo endocrino. Sobre las células ECL, la gastrina actúa a través de receptores específicos del tipo CCK2, estimulando la síntesis y liberación de histamina. La histamina liberada actúa localmente sobre las células parietales como el verdadero factor estimulante de la secreción ácida. Aunque este es el principal mecanismo de acción, receptores CCK2 se han identificado también en células parietales, así la gastrina puede actuar directamente sobre las mismas estimulando la secreción (Cabero *et al.*, 1991; Kopin *et al.*, 1992; Lindström *et al.*, 1999, 2001b, Figs. I.1.1 y I.1.2).

1.1.2 - Histamina

La histamina desempeña un papel esencial en la regulación de la secreción ácida gástrica, siendo el factor que media, en su mayor parte, las acciones estimulantes de la gastrina. En la mucosa gástrica, la histamina se encuentra almacenada en gránulos citoplasmáticos de células ECL y mastocitos fúndicos (Hakanson y Sundler, 1987). La importancia de los mastocitos como fuente de histamina en el estómago parece ser de tipo especie-específica. Los mastocitos predominan en la mucosa gástrica de humanos y perro, mientras que las células ECL predominan en el estómago de la rata y el conejo (Hakanson y Sundler, 1991). En el estómago del ratón, un 66% de la histamina se almacena en mastocitos y el 34% restante en células no mastocitarias (Yamatodani *et al.*, 1982). A pesar de esto, en condiciones normales la histamina es liberada principalmente de células ECL (Prinz *et al.*, 1999); únicamente en condiciones fisiopatológicas, como en estados inflamatorios, los mastocitos representarían una fuente importante de histamina (Nakajima *et al.*, 1997; Yu y Perdue, 2001).

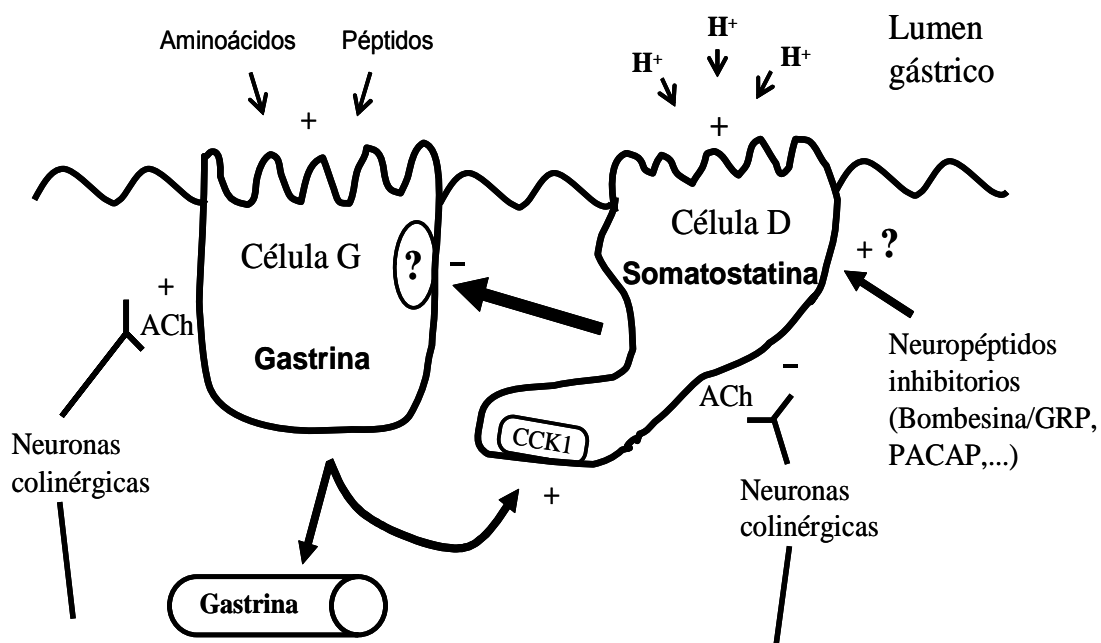


Figura I.1.1. Modelo ilustrativo de las principales vías implicadas en la regulación periférica de la secreción ácida en el antro gástrico. La acetilcolina y la presencia de, principalmente, aminoácidos y péptidos en el lumen gástrico estimulan las células G induciendo la liberación de gastrina y su paso a la circulación sanguínea. Descensos en el pH intragástrico y la propia gastrina estimulan la liberación somatostatina de células D. La somatostatina, por un mecanismo paracrino, inhibe la liberación de gastrina de células G a través de un receptor aún por determinar (Adaptado de Lloyd y Debas, 1994).

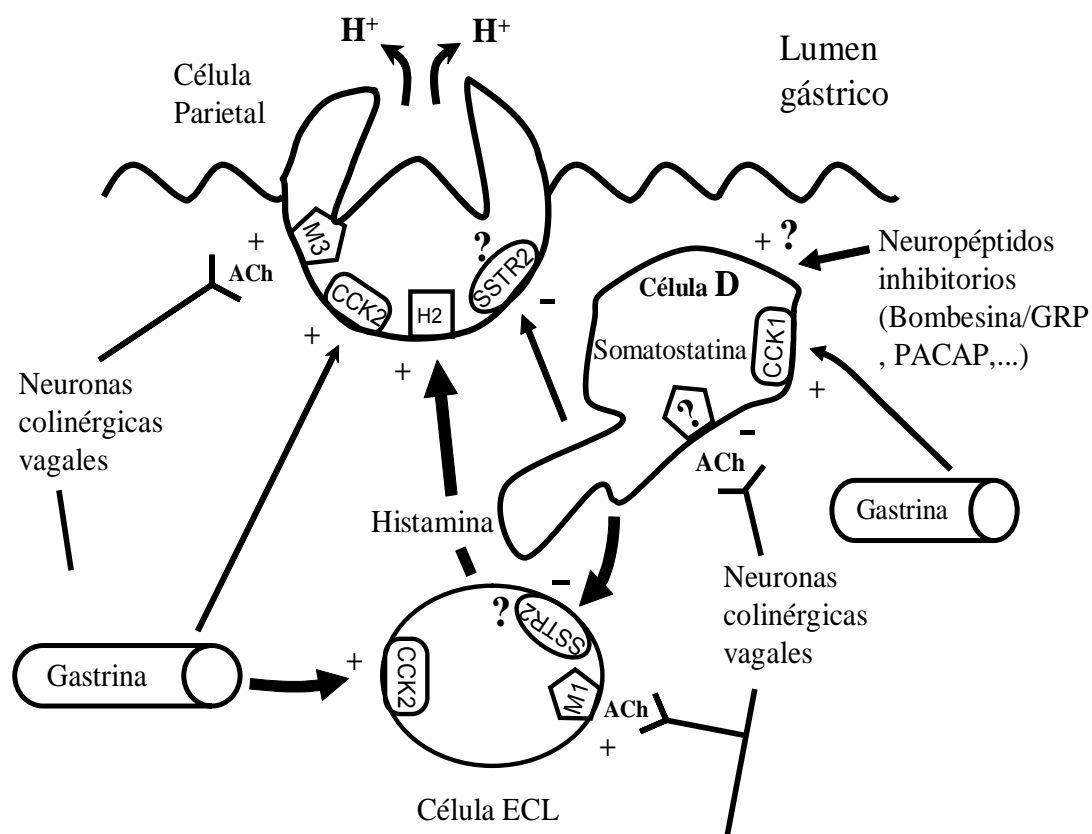


Figura I.1.2. Modelo ilustrativo de las principales vías implicadas en la regulación periférica de la secreción ácida en el fundus gástrico. La gastrina y la acetilcolina estimulan la secreción de ácido en el lumen gástrico a través de un efecto directo sobre la célula parietal e indirectamente liberando histamina de células ECL. La histamina estimula la secreción actuando sobre receptores H2 localizados en la célula parietal. La somatostatina inhibe la secreción ácida a través de un efecto directo sobre la célula parietal e indirectamente inhibiendo la liberación de histamina de células ECL, probablemente a través de receptores SSTR2 localizados en estas células. La secreción de somatostatina de la célula D depende del balance entre factores estimulantes (gastrina y, probablemente, diferentes neuropéptidos inhibitorios) y factores inhibitorios (descarga vagal) (Adaptado de Lloyd y Debas, 1994).

Estímulos tales como la gastrina y, en menor medida, la descarga colinérgica inducen la liberación de histamina de células ECL. La histamina, a través de un mecanismo paracrino, actúa sobre receptores de tipo H2 localizados en la célula parietal estimulando la secreción de ácido en el lumen gástrico. De la misma forma, numerosos neuropéptidos, actuando a través de receptores específicos localizados en las células ECL, pueden tanto estimular como inhibir la liberación de histamina de las mismas (Hersey y Sachs, 1995; Lindström *et al.*, 2001b; Zeng y Sachs, 2002; Fig. I.1.2).

1.1.3 - Acetilcolina

La acetilcolina es el neurotransmisor postganglionar del sistema nervioso parasimpático. En el estómago se localiza en neuronas de los plexos mientérico y submucoso y su liberación depende fundamentalmente de estímulos vagales (Lloyd y Debas, 1994; Hersey y Sachs, 1995). La descarga colinérgica en el estómago estimula la secreción ácida gástrica a través de, al menos, cuatro mecanismos: i) por acción directa sobre células G estimulando la liberación de gastrina; ii) por acción sobre células D inhibiendo la liberación de somatostatina (Shubert *et al.*, 1987); iii) por estimulación directa de células parietales (Wilkes *et al.*, 1991); y iv) a través de la liberación de histamina por estimulación directa de células ECL (Sandor *et al.*, 1996). Estas acciones dependen de múltiples receptores, en muchos casos aún por determinar. Con precisión sólo se sabe que la acción sobre células parietales está mediada por receptores M3 y la acción sobre células ECL, probablemente, por receptores M1 (Pfeiffer *et al.*, 1990; Wilkes *et al.*, 1991; Sandor *et al.*, 1996).

1.2 - Mecanismos inhibidores de la secreción ácida gástrica

Varios mediadores inhiben la secreción ácida gástrica, bien por un efecto directo sobre las células parietales o de manera indirecta controlando la síntesis y liberación de otros factores, como la gastrina, la somatostatina o las prostaglandinas (Hersey y Sachs, 1995). De todos ellos, el factor inhibidor de la secreción ácida gástrica más importante es la somatostatina.

1.2.1 - Somatostatina

Desde su descubrimiento en los años 70 en el sistema nervioso central, como el factor inhibidor que controla la liberación de la hormona del crecimiento a nivel hipofisario, la somatostatina se ha descrito en otros muchos sistemas fisiológicos. Presenta una alta heterogeneidad en su mecanismo de acción, actuando tanto como un neuropéptido, como una hormona en el sentido clásico o como un factor paracrino o autocrino. Esta heterogeneidad en cuanto al mecanismo de acción se asocia, en la mayoría de los casos, a acciones de tipo inhibitorio.

Biología de la somatostatina

Se han descrito dos formas moleculares de somatostatina: la somatostatina-14 y la somatostatina-28, con 14 y 28 residuos aminoacídicos respectivamente. Ambas formas derivan del procesado de un precursor común, la preprosomatostatina (Goodman *et al.*, 1983). Los efectos biológicos son, además, comunes, y no se han descrito acciones específicas para cada una de estas formas moleculares. La somatostatina se produce tanto en el sistema nervioso central como en la gran mayoría

de tejidos periféricos (islotos pancreáticos, estómago, nervios periféricos y neuronas entéricas, etc) (Patel, 1999). Su liberación está influida por un amplio rango de secretagogos, como iones, nutrientes, neuropéptidos, neurotransmisores, hormonas clásicas y citoquinas.

Receptores de somatostatina

Los efectos biológicos de la somatostatina están mediados a través de la interacción del péptido con 5 subtipos específicos de receptores, SSTR1/2/3/4/5, clonados y caracterizados farmacológicamente durante los últimos años (Reisine y Bell, 1995; Patel, 1999). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G. Además, en la rata y en el ratón, se han descrito dos variantes para el receptor de tipo 2, SSTR2a y b, que difieren en la longitud (39 vs 15 aminoácidos, respectivamente) y la composición del extremo carboxiterminal (Patel *et al.*, 1993; Schindler *et al.*, 1998; Cole y Schindler, 2000). El análisis secuencial del DNAc ha demostrado que el transcrito más pequeño (SSTR2b) está comprendido dentro de la forma larga del receptor (SSTR2a) (Patel *et al.*, 1993; Schindler *et al.*, 1998; Cole y Schindler, 2000).

Los 5 subtipos de receptores presentan una distribución muy heterogénea, en muchas ocasiones con solapamientos entre ellos, tanto en el sistema nervioso central como en tejidos periféricos. En los últimos años, numerosos estudios mediante análisis del ARNm, RT-PCR e hibridación *in situ* han descrito la expresión y distribución anatómica y celular de los diferentes subtipos de receptores en tejidos humanos y de roedores, así como en diferentes tumores y líneas celulares (Patel, 1999). En conjunto, estos estudios indican que, como ya se ha mencionado, los receptores de la somatostatina se distribuyen de manera difusa tanto a nivel del sistema nervioso central como en tejidos periféricos, con cierta superposición y con características especie-específicas.

Los primeros estudios sobre la distribución de los receptores en el tracto gastrointestinal se basaron en el análisis autoradiográfico utilizando un radioligando no selectivo para los receptores SSTR2/3/5, el octreótido (SMS 201-995). Estos estudios mostraron una elevada densidad de sitios de unión en la mucosa gástrica de la rata, así como en otras áreas del tracto gastrointestinal (Reubi, 1992). Estudios recientes, basados en ensayos de protección con ribonucleasas y RT-PCR, han demostrado la presencia en el estómago de los cinco subtipos de receptores para la somatostatina, con un predominio del receptor SSTR2 en células ECL (Bruno *et al.*, 1993; Prinz *et al.*, 1994; Raulf *et al.*, 1994). De forma similar, estudios mediante hibridación *in situ* han demostrado la presencia de ARNm para el receptor SSTR2 en la mucosa y submucosa gástricas, así como en el plexo mientérico y en la capa muscular externa (Krepmpels *et al.*, 1997). Técnicas similares, combinadas con estudios inmunohistoquímicos, han mostrado la presencia en el tracto gastrointestinal de las dos isoformas del receptor SSTR2 (a y b) (Sternini *et al.*, 1997; Schindler *et al.*, 1999). El receptor SSTR2a se

expresa abundantemente en el sistema nervioso entérico, principalmente en neuronas de los plexos submucoso y mientérico y en fibras que inervan el músculo, la mucosa y la vasculatura. Este receptor se encuentra también en células no neuronales, mayoritariamente en células intersticiales de Cajal en el intestino y en algunas células ECL del estómago. La mayoría de las fibras nerviosas que expresan el receptor SSTR2a se disponen en la proximidad de células D de la mucosa gástrica (Sternini *et al.*, 1997). Esta distribución sugiere que los receptores del tipo SSTR2a mediarían los efectos nerviosos y paracrinos de la somatostatina en el tracto gastrointestinal. Por otro lado, el receptor de tipo SSTR2b se localiza principalmente en células parietales y también se expresa abundantemente en células ECL de la mucosa gástrica (Sternini *et al.*, 1997; Schindler *et al.*, 1999). Resumiendo, estas observaciones morfológicas indican que la somatostatina modula la secreción ácida gástrica a través de la activación de los receptores del tipo 2. La diferente distribución de los receptores SSTR2a y SSTR2b en células ECL y parietales de la mucosa gástrica sugiere que la somatostatina inhibe la secreción ácida gástrica a través de múltiples mecanismos.

Estudios realizados *in vitro* en células parietales caninas sugieren la presencia en las mismas de, al menos, dos subtipos de receptores de somatostatina (Patel, 1999). Los receptores de somatostatina están acoplados a proteínas G inhibitorias, sin embargo, la somatostatina inhibe la célula parietal tanto por mecanismos dependientes como independientes de proteínas G (Park *et al.*, 1987), sugiriendo que además de los receptores SSTR2a/b existe al menos otro subtipo de receptor, todavía por determinar, localizado en la célula parietal. Además, estudios *in vitro* en células D fúndicas caninas sugieren que la somatostatina, podría actuar a través de un mecanismo autocrino, autoregulando su propia secreción a través de receptores específicos localizados en células D (Park *et al.*, 1989). Sin embargo, este receptor no se ha caracterizado todavía y estudios inmunohistoquímicos indican la ausencia de receptores SSTR2a/b en células D gástricas y pancreáticas. Por último, aunque se ha demostrado que la somatostatina actúa sobre células G regulando la síntesis y liberación de gastrina (Chiba y Yamada, 1994; Zeng *et al.*, 1996a) no se han detectado receptores para la hormona en dichas células.

La somatostatina (tanto en su forma de 28 como de 14 aminoácidos) tiene una afinidad similar por los cinco subtipos de receptores, por lo tanto la caracterización funcional de los mismos depende de la síntesis de agonistas y antagonistas selectivos para cada tipo de receptor. Uno de los primeros agonistas empleados es el análogo estable de la somatostatina, SMS 201-995; sin embargo este análogo tiene afinidad por los receptores SSTR2, 3 y 5, por lo que es poco útil para caracterizar funcionalmente estos receptores. Con posterioridad, se han sintetizado y caracterizado diferentes análogos de la hormona con selectividad relativa por los receptores SSTR2, 3 y 5, lo que permite diferenciar con mayor fiabilidad el papel relativo de cada uno de ellos (Martínez, 2002). Con fecha más reciente se han sintetizado agonistas selectivos de tipo no peptídico para los 5 subtipos de receptores (Rohrer *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998; Martínez, 2002). Estos compuestos pueden ser de utilidad para caracterizar

funcionalmente todos los receptores. Además, durante los últimos años, se han sintetizado análogos de la somatostatina con actividad de tipo antagonista, especialmente sobre el receptor de tipo 2 (Rossowski *et al.*, 1998; Martínez, 2002). Los estudios funcionales realizados hasta el momento con estos compuestos sugieren un papel prominente del receptor de tipo 2 mediando los efectos biológicos de la somatostatina a múltiples niveles. Para algunos de los receptores, como el SSTR1, el empleo de agonistas selectivos no ha revelado aún ninguna actividad biológica *in vivo*. De cualquier forma, en la mayoría de los casos hay importantes discrepancias entre los estudios morfológicos (distribución y presencia de receptores) y los estudios funcionales, especialmente *in vivo*. El solapamiento en la expresión y distribución celular de los 5 subreceptores sugiere que, en muchos casos, estos podrían actuar conjuntamente y no como entidades separadas, de forma que sólo podrían determinarse efectos biológicos cuando varios receptores son estimulados conjuntamente, como sucede con el ligando endógeno de los mismos, la somatostatina.

Acciones biológicas de la somatostatina y receptores implicados

En el sistema nervioso central la somatostatina actúa como un neurotransmisor mediando efectos sobre funciones cognitivas, locomotoras, sensoriales y autonómicas (Patel *et al.*, 1999). Sin embargo, a este nivel, su acción primaria es de tipo neuroendocrino, participando en el control, como factor inhibidor, de la liberación hipofisaria de hormona de crecimiento (GH) y hormona estimulante del tiroides (TSH) (Hall *et al.*, 1978). A nivel central, actúa también inhibiendo la liberación de dopamina, noradrenalina, hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y factor liberador de corticotropina (CRF). De forma general, posee actividad antinociceptiva (Hasler *et al.*, 1993) e inhibe la proliferación celular y el crecimiento tisular (Beglinger y Drewe, 1999), de ahí su uso clínico en tratamientos antitumorales.

En el tracto gastrointestinal la somatostatina ejerce también un amplio espectro de acciones, en su mayoría de tipo inhibitorio:

i) Control de la secreción ácida gástrica.

La inhibición de la secreción ácida gástrica es probablemente la acción más característica de la somatostatina a nivel gastrointestinal. La somatostatina es un inhibidor potente de la secreción ácida gástrica y probablemente el principal regulador inhibitorio durante las fases cefálica, gástrica e intestinal de la secreción (Lloyd y Walsh 1994). Estudios *in vivo*, en humanos y en perros, muestran que la somatostatina inhibe la secreción ácida gástrica a dosis que simulan los niveles plasmáticos observados en estados postprandiales, sugiriendo, por lo tanto, que se trata de una acción fisiológica y no de un efecto farmacológico (Seal *et al.*, 1982; Chiba y Yamada, 1994).

En el estómago, la somatostatina es sintetizada y liberada por células D de la mucosa gástrica. Estas células se distribuyen tanto en la mucosa antral como en la fúndica, y muestran una morfología característica, con extensiones citoplasmáticas, que las aproxima a las células diana: células G en el antro y células ECL y parietales en el fundus (Kusumoto *et al.*, 1979; Larsson *et al.*, 1979). Estas dos poblaciones de células D responden a distintos estímulos. Las células D antrales están abiertas a la luz gástrica y responden a cambios en la acidez del lumen gástrico. Por esta vía, descensos en el pH intragástrico estimularían la liberación de somatostatina (Shubert *et al.*, 1988) la cual actuaría sobre células G vecinas inhibiendo la síntesis y liberación de gastrina, lo que finalmente produciría una inhibición de la secreción ácida (Fig. I.1.1). Por el contrario, las células D del fundus gástrico son de tipo cerrado y carecen de contacto con la luz gástrica. Estas células responden a diferentes estímulos locales, como gastrina, acetilcolina y otros neuropéptidos (Zeng *et al.*, 1996a). Su estimulación resulta también en la liberación de somatostatina, la cual actúa directamente sobre las células ECL inhibiendo la liberación de histamina y sobre las células parietales inhibiendo la actividad de las mismas (Fig. I.1.2). La morfología y distribución de las células D con respecto a sus células diana apoyan la hipótesis de que, en el estómago, la somatostatina actúa mediante un mecanismo de tipo paracrino más que endocrino, actuando sobre las células diana por difusión local a través del espacio intersticial.

Tanto en los periodos interdigestivos como en los postprandiales, la liberación local de somatostatina actuaría evitando estados de hipersecreción, mediante un triple mecanismo: i) acción sobre las células ECL inhibiendo la liberación de histamina; ii) acción sobre las células G antrales inhibiendo la liberación de gastrina; y iii) inhibición directa de las células parietales (Maklouf y Schubert, 1990; Shubert y Maklouf, 1992; Vuyyuru *et al.*, 1995). La acción combinada de estos tres efectos resultaría, en condiciones fisiológicas, en el patrón normal de secreción ácida.

En general, la síntesis de somatostatina y gastrina antral están recíprocamente reguladas por el contenido del lumen gástrico. Como ya se ha comentado anteriormente, la presencia de aminoácidos y péptidos en el lumen gástrico estimula la liberación de gastrina, la cual actúa sobre células ECL y células parietales estimulando la secreción ácida. Además, la gastrina, a través de receptores del tipo CCK1 localizados en células D (Roche *et al.*, 1991), estimula la liberación de somatostatina, lo que origina un mecanismo de retroalimentación negativa que tiende a inhibir la secreción, evitando una respuesta hipersecretora asociada a los aumentos en los niveles de gastrina. A la vez, el descenso en el pH luminal, estimula la liberación de somatostatina antral, la cual actúa de manera paracrina inhibiendo la liberación de gastrina de células G (Shubert *et al.*, 1988; Fig. I.1.1). Diversos estudios *in vitro* han observado que la inmunoneutralización de la somatostatina endógena se asocia a un incremento en los niveles de gastrina y en la secreción ácida gástrica sugiriendo que la somatostatina ejerce un efecto inhibitorio tónico

sobre la misma (Holst *et al.*, 1992), aunque *in vivo* este mecanismo no está totalmente demostrado (Martínez *et al.*, 1995).

Aunque la interacción entre la gastrina y la somatostatina es el principal componente del control de la secreción ácida gástrica, la secreción de la somatostatina depende también de la acción de otros péptidos reguladores gastrointestinales y del eje sistema nervioso central-tracto gastrointestinal, sobre todo a través de la inervación extrínseca vagal. Estos sistemas regulan tanto la liberación de somatostatina antral como fúndica (Lloyd y Debas, 1994).

Hasta la fecha, los diferentes estudios realizados *in vitro* e *in vivo* sugieren que el receptor SSTR2 está directamente implicado en la regulación de la secreción ácida gástrica. Los primeros estudios realizados *in vivo* con el análogo de la somatostatina, SMS 201-995 (agonista SSTR2/3/5), mostraron una actividad inhibitoria similar o incluso mayor que la de la propia somatostatina (Karnes *et al.*, 1989; Gyr y Meier, 1993). Estudios posteriores en ratas conscientes han demostrado que diferentes análogos de la somatostatina con actividad preferente sobre los receptores SSTR2 inhiben la secreción ácida estimulada por pentagastrina con una potencia similar a la del péptido endógeno (Rossowski *et al.*, 1994; Coy y Rossowski, 1995). Observaciones similares se han realizado también en perros conscientes y en ratas y ratones anestesiados, así como empleando diferentes secretagogos (Lloyd *et al.*, 1995, 1997; Aurang *et al.*, 1997; Fung y Greenberg, 1997; Martínez *et al.*, 1998).

Aproximaciones similares, tanto *in vivo* como *in vitro*, se han empleado para caracterizar los mecanismos a través de los cuales la somatostatina inhibe la secreción ácida gástrica. El empleo de análogos con preferencia por los receptores SSTR2, 3 y 5 parece indicar que la somatostatina inhibe la secreción de gastrina e histamina, en rata y perro, a través de receptores SSTR2 localizados en células G y células ECL, respectivamente (Zaki *et al.*, 1996; Aurang *et al.*, 1997; Lloyd *et al.*, 1997). Hallazgos *in vitro* utilizando cultivos primarios enriquecidos en células G antrales caninas y células ECL fúndicas de rata corroboran las observaciones *in vivo* (Prinz *et al.*, 1994). Además, estudios mediante PCR han demostrado un nivel de expresión de los receptores SSTR2 superior al de otros subtipos en células ECL de rata (Prinz *et al.*, 1994). En conjunto, estas observaciones morfológicas y funcionales parecen indicar que la somatostatina inhibe la secreción ácida gástrica a través de la inhibición de la liberación de gastrina y de histamina y que estas acciones dependen de la estimulación de receptores SSTR2 localizados en células G y células ECL; sin embargo, hasta el momento, no se ha determinado la presencia de receptores para somatostatina en células G.

Por otro lado, estudios realizados en estómago aislado de rata, empleando análogos de la somatostatina con especificidad relativa por diferentes subtipos de receptores, muestran que la somatostatina inhibe directamente la actividad de las células parietales a través de un mecanismo que parece depender, también, de

receptores SSTR2 (Wyatt *et al.*, 1996). Sin embargo, la importancia funcional *in vivo* de este mecanismo no se ha determinado.

Finalmente, la importancia del receptor de tipo 2 en el control de la secreción ácida se ha puesto de manifiesto empleando antagonistas selectivos así como animales modificados genéticamente en los cuales se ha eliminado el gen que codifica para el mismo. Estudios funcionales muestran que el antagonista selectivo de los receptores SSTR2, PRL-2903, inhibe la respuesta antisecretora inducida por la infusión de somatostatina en ratas conscientes (Rossowski *et al.*, 1998) y que produce un incremento transitorio en la secreción ácida y los niveles plasmáticos de gastrina en ratas anestesiadas con uretano (Kawakubo *et al.*, 1999). El único estudio existente empleando ratones transgénicos carentes del receptor SSTR2 muestra que estos animales, cuando se anestesian con uretano, tienen una secreción ácida basal aumentada, aunque los niveles plasmáticos de gastrina son normales (Martínez *et al.*, 1998); lo que sugiere una falta de acción inhibitoria de la somatostatina endógena y, por lo tanto, que el mecanismo de acción de la hormona depende de este receptor.

ii) Modulación de la motilidad gastrointestinal.

Numerosas evidencias sugieren que la somatostatina es un regulador fisiológico de la motilidad gástrica e intestinal, tanto en estado postprandiales como durante los periodos interdigestivos. Los efectos de la somatostatina sobre la motilidad gástrica son variables. Estudios realizados mediante RT-PCR han demostrado que los cinco subtipos de receptores se expresan en células de músculo liso de estómago (Corleto *et al.*, 1999) lo que sugiere su implicación en el control motor. Estudios funcionales realizados en la especie humana han demostrado que tanto la somatostatina como el SMS 201-995, administrados periféricamente, tienen efectos tanto estimulantes como inhibitorios sobre el vaciamiento gástrico (Johansson *et al.*, 1978; Fuess *et al.*, 1987; Von der Ohe *et al.*, 1995; Okamoto *et al.*, 1997). En un estudio se ha observado que el compuesto SMS 201-995 inhibe el vaciamiento gástrico en la rata (Smedh *et al.*, 1999).

A nivel intestinal, los efectos descritos son básicamente de tipo inhibitorio y se asocian a una inhibición de la liberación de acetilcolina o a la modulación de las acciones de la acetilcolina liberada por otros péptidos (Yau *et al.*, 1983; Teitelbaum *et al.*, 1984). Estudios recientes *in vitro* han demostrado que, en la rata y el ratón, la somatostatina alarga el complejo mioeléctrico motor migratorio (Abdu *et al.*, 2002) y modula las respuestas musculares ascendente y descendente durante el reflejo peristáltico (Grider, 2003). Estudios con el antagonista selectivo de los receptores SSTR2, Cyanamid154806, sugieren que, en la rata, el efecto de la somatostatina sobre los complejos motores migratorios se debe a estos receptores (Abdu *et al.*, 2002). Sin embargo, en ratones transgénicos carentes del receptor SSTR2 se siguen observando efectos asociados a la somatostatina exógena lo que sugiere que en

esta especie otros receptores, además del tipo 2, participan en la modulación de la motilidad intestinal (Abdu *et al.*, 2002).

iii) Regulación de las funciones pancreáticas endocrina y exocrina.

El páncreas contiene abundante somatostatina, tanto en células endocrinas (células δ) como en células nerviosas (Luft *et al.*, 1974) y ésta participa tanto en el control de la actividad endocrina como exocrina del mismo. La somatostatina, procedente de células endocrinas y actuando a través de mecanismos de tipo paracrino, regula la función endocrina pancreática participando en los mecanismos de retroalimentación que median la regulación de la liberación de insulina y glucagón en los islotes de Langerhans. A nivel exocrino, la somatostatina, actuando preferentemente como un neuropéptido, inhibe la secreción tanto enzimática como de bicarbonato (Heintges *et al.*, 1994). Estudios inmunohistoquímicos demuestran una expresión variable de los 5 tipos de receptores en el páncreas (Raulf *et al.*, 1994); con un predominio de los receptores SSTR1 y 5 en células β y de receptores SSTR2 en células acinares. Estudios funcionales implican a los receptores SSTR2 en el control de la actividad exocrina y a receptores SSTR5 y SSTR2 en el control de la secreción de insulina (Mitra *et al.*, 1999; Strowski *et al.*, 2000).

iv) Regulación de las actividades secretoras y de absorción del intestino delgado.

En el intestino delgado, la somatostatina, inhibe la secreción de agua y electrolitos y la absorción de nutrientes (Dharmasathaphorn *et al.*, 1980; Marki, 1981). Los receptores que median estos efectos no se han caracterizado.

v) Regulación del flujo sanguíneo.

La somatostatina reduce el flujo sanguíneo esplácnico (Harris, 1994). Los receptores implicados en estas acciones no se han caracterizado.

Como ya se ha mencionado, la somatostatina se considera el principal inhibidor fisiológico de la secreción ácida gástrica. Sin embargo, un gran número de neuropéptidos (como el VIP, el CGRP, la CCK, la amilina, la bombesina o el PACAP) inhiben la secreción ácida con potencias comparables, o incluso superiores, a la de la somatostatina (Shubert *et al.*, 1991a, b; Taché *et al.*, 1991; Lloyd *et al.*, 1992; Mungan *et al.*, 1992; Martínez *et al.*, 1995). El mecanismo de acción de la mayoría de estos mediadores no se conoce con exactitud. Algunos estudios sugieren que, al menos en ocasiones, la somatostatina podría actuar como el mediador de las respuestas inhibitorias observadas. En este trabajo, nos centraremos en dos neuropéptidos cuyas acciones sobre la secreción ácida gástrica no se han caracterizado *in vivo* en el ratón y que, además, tienen mecanismos de acción controvertidos, en los cuales se han sugerido acciones tanto dependientes como independientes de la somatostatina: la

bombesina y el polipéptido activador de la adenilil ciclasa pituitaria (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide, PACAP, según la nomenclatura anglosajona).

1.2.2 - Bombesina

La bombesina, su homólogo en los mamíferos, el péptido liberador de gastrina (Gastrin Releasing Peptide según la terminología anglosajona, GRP), y péptidos relacionados son un grupo de neuropéptidos con un alto grado de homología estructural y funcional a lo largo de la escala filogenética. Durante los últimos años, numerosos estudios han demostrado que la bombesina/GRP participa de forma importante en el control de la función gástrica, actuando tanto a nivel central como periférico (Martínez y Taché, 2000).

Estudios inmunohistoquímicos han revelado la presencia de bombesina/GRP en abundantes fibras nerviosas en el antro y fundus gástrico de diversas especies (Dockray *et al.*, 1979; Ekblad *et al.*, 1985), sugiriendo un papel fundamental de la bombesina en la regulación de la función gástrica. El mecanismo por el cual la bombesina modula periféricamente la secreción ácida gástrica no se conoce con exactitud, ya que se ha visto que las respuestas son variables dependiendo de la dosis, de la modalidad de administración así como de la especie considerada. Así, estudios *in vivo* muestran que la administración periférica de bombesina, estimula la secreción ácida gástrica en el perro, el gato y la especie humana (Helman y Hirschowitz, 1987; Bado *et al.*, 1989; Kovacs *et al.*, 1995; Hildebrand *et al.*, 2001). Resultados obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro* sugieren que estas acciones de la bombesina podrían deberse a la liberación de gastrina por estimulación directa de células G (Sugano *et al.*, 1987; Kovacs *et al.*, 1995; Squires *et al.*, 1999). Sin embargo, los efectos secretores son variables ya que tanto en el perro como en la especie humana, a dosis elevadas, la bombesina inhibe la secreción ácida (Herman y Hirschowitz, 1987; Walsh *et al.*, 1988). De forma similar, en la rata, las respuestas secretoras asociadas a la administración periférica de bombesina/GRP son predominantemente de tipo inhibitorio (Bertaccini *et al.*, 1973; Rossowski *et al.*, 1989; Martínez *et al.*, 1995). Diversos estudios realizados *in vitro*, en estómago aislado de rata y ratón, han demostrado que la bombesina estimula la liberación de la somatostatina (Sandvik *et al.*, 1989; Shubert *et al.*, 1991b) la cual inhibiría la liberación de histamina de células ECL, lo que resultaría finalmente en una inhibición de la secreción ácida (Sandvik *et al.*, 1997). Apoyando esta hipótesis, estudios autoradiográficos han detectado la presencia de receptores para bombesina/GRP en células D (Nakamura *et al.*, 1988). Además, empleando técnicas inmunohistoquímicas y de radioinmunoensayo, se ha demostrado que la bombesina estimula la liberación de somatostatina en cultivos primarios de células fúndicas de rata a través de receptores específicos (Schaffer *et al.*, 1997). Sin embargo, estudios en la rata basados en la inmunoneutralización *in vivo* de la somatostatina muestran que la acción antsecretora de la bombesina no depende de este péptido (Martínez *et al.*, 1995), sugiriendo la existencia de otro u otros mecanismos de acción.

En su conjunto, estas observaciones sugieren que las diferencias observadas en las respuestas secretoras a la bombesina pueden deberse a un balance entre las acciones estimulantes asociadas a la liberación de gastrina y las inhibitorias asociadas a la liberación de somatostatina (Sandvik *et al.*, 1989). A estas acciones hay que añadir la posibilidad de un efecto inhibitorio directo de la bombesina sobre células parietales, tal y como sugieren varios estudios *in vitro* (Sandvik *et al.*, 1989; Shubert *et al.*, 1991a, b).

1.2.3 - Polipéptido activador de la adenilil ciclasa pituitaria (PACAP)

El PACAP forma parte de la familia de neuropéptidos secretina-polipéptido intestinal vasoactivo (VIP). Su nombre proviene de la primera actividad biológica descrita para el mismo, la capacidad de estimular la actividad adenilil ciclasa en cultivos celulares de pituitaria de rata (Miyata *et al.*, 1989). Se trata de un péptido altamente conservado a lo largo de la escala filogenética y con un 68% de homología con el VIP (Kimura *et al.*, 1990; Ogi *et al.*, 1990). Hasta la fecha, se han descrito tres subtipos de receptores para el PACAP: VPAC₁, VPAC₂ y PAC₁. Estos receptores están acoplados a proteínas G y se diferencian en su estructura, afinidad por diferentes ligandos y distribución tisular (Harmar y Lutz., 1994). VPAC₁ y VPAC₂ (también denominados VIP1 y VIP2) tienen una afinidad similar por el PACAP y el VIP y se expresan abundantemente a lo largo de todo el tracto gastrointestinal (Zimmerman *et al.*, 1989; Miampamba *et al.*, 2002). El receptor PAC₁ se expresa predominantemente en el sistema nervioso central (Vaudry *et al.*, 2000), glándula adrenal (Watanabe *et al.*, 1992), células ECL (Zeng *et al.*, 1996; Läubler *et al.*, 1999) y sistema nervioso entérico (Miampamba *et al.*, 2002) y en algunos tumores pancreáticos de roedores (Buscail *et al.*, 1990). Este receptor tiene una afinidad superior por el PACAP que por otros ligandos, considerándose un receptor específico para este péptido.

Estudios inmunohistoquímicos muestran que el PACAP se localiza a lo largo de todo el tracto gastrointestinal y en algunos casos se ha demostrado su co-localización con otros neuropéptidos, tales como GRP, VIP o el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). En el estómago, se han identificado fibras con inmunoreactividad de tipo PACAP en las capas musculares circular y longitudinal y en los plexos mientérico y submucoso; con una mayor densidad en el esfínter pilórico (Koves *et al.*, 1993; Hannibal *et al.*, 1998; Miampamba *et al.*, 2002). Estas observaciones sugieren un papel importante de PACAP modulando la función motora y secretora gástrica.

Asimismo, diferentes estudios funcionales sugieren que el PACAP desempeña un papel fisiológico en la regulación central y periférica de la secreción ácida gástrica. En la rata, la administración intracerebroventricular de PACAP estimula la secreción ácida gástrica a través de un mecanismo vagal (Ozawa *et al.*, 1997). Sin embargo, los efectos periféricos del PACAP sobre la secreción ácida no se conocen con exactitud, ya que los estudios realizados son escasos y en ocasiones contradictorios.

Los primeros estudios *in vivo*, en ratas conscientes, muestran que el PACAP inhibe de forma dosis dependiente la secreción ácida gástrica estimulada por diferentes secretagogos, sugiriendo un posible efecto a nivel de la célula parietal (Mungan *et al.*, 1992, 1995). Asimismo, estudios realizados *in vitro*, en estómago aislado de rata, sugieren que el PACAP inhibe la secreción ácida a través de un mecanismo dependiente de somatostatina, secretina y prostaglandina E₂ (PGE₂) (Li *et al.*, 2000). Estudios recientes *in vitro* han demostrado que el PACAP y el VIP estimulan con una eficacia similar la liberación de somatostatina en cultivos de células D fúndicas de rata, sugiriendo una acción directa del PACAP sobre las mismas a través del receptor común PACAP/VIP, VPAC (Zeng *et al.*, 1996,1999), aunque la forma exacta del receptor (1 o 2) no se ha determinado. Por otro lado, estudios *in vitro*, han demostrado que el PACAP también estimula la liberación de histamina de células ECL aisladas de rata (Zeng *et al.*, 1999; Lindström *et al.*, 2001a). De acuerdo con esta observación, estudios moleculares mediante análisis por Western Blot y RT-PCR han descrito la presencia del receptor PAC1 en células ECL (Zeng *et al.*, 1998). Estas observaciones han llevado a algunos autores a sugerir que el PACAP estimularía indirectamente la secreción ácida actuando a través de estos receptores y liberando histamina (Zeng *et al.*, 1999; Pisegna *et al.*, 2000). Sin embargo, en los estudios realizados *in vivo* sólo se han observado respuestas estimulantes en condiciones experimentales en las que los efectos de la somatostatina endógena se bloquearon mediante inmunoneutralización con anticuerpos específicos (Zeng *et al.*, 1999). En conjunto, estas observaciones sugieren que los efectos del PACAP sobre la secreción ácida gástrica pueden depender de un balance entre las acciones estimulantes de la histamina liberada de células ECL y las acciones inhibitorias de la somatostatina liberada de células D.

2 - Alteraciones en el Control de la Secreción Ácida Gástrica: Modelos Genéticos e Inflamación

2.1 - Modelos animales modificados genéticamente: Aplicación en estudios de secreción gástrica

Uno de los avances más importantes en investigación biomédica en los últimos años ha sido el desarrollo de técnicas de manipulación genética, lo que ha permitido generar animales en los que se han alterado, eliminado o inactivado selectivamente uno o varios genes. Estos animales se han convertido en una herramienta muy útil para el estudio de la función de determinadas moléculas así como de mecanismos de regulación, incluidas las vías implicadas en el control de la secreción ácida gástrica (Samuelson y Hinkle, 2003). La disponibilidad de ratones con manipulaciones genéticas

que afectan a los principales mecanismos de control de la secreción ácida esta permitiendo en la actualidad la caracterización detallada de los mismos.

Las vías implicadas en los mecanismos estimulantes de la secreción han sido objeto de manipulación genética a todos sus niveles. Se han generado ratones tanto carentes ("knockout") en gastrina así como en el receptor CCK2, a través del cual ésta ejerce sus acciones (Langhans *et al.*, 1997; Friis-Hansen *et al.*, 1998). En ambos casos, los ratones presentan una secreción basal reducida y una respuesta alterada a secretagogos (gastrina, histamina y betanecol), lo que sugiere que la gastrina es un factor esencial para el mantenimiento de la secreción ácida y/o para el desarrollo del sistema secretor de ácido en el estómago.

De forma similar, se han generado ratones deficientes en el receptor H2 de la histamina (Kobayashi *et al.*, 2000). Estos animales muestran unos valores de secreción basal y una respuesta secretora al carbacol normales. Sin embargo, presentan una hipergastrinemia permanente con ausencia de respuesta secretora a esta hormona, confirmando que la principal vía de acción de la gastrina depende de la liberación de histamina y la activación de receptores H2.

Recientemente, se han generado ratones carentes del receptor colinérgico M3 (Aihara *et al.*, 2002). Estos animales presentan un pH intragástrico elevado, sugiriendo una alteración en la secreción ácida basal. Sin embargo, en este modelo se ha observado que las respuestas secretoras a gastrina, histamina e incluso acetilcolina, son normales. Se observa, además, hipergastrinemia, lo que sugiere la existencia de mecanismos de retroalimentación que compensan la carencia del receptor M3 en la célula parietal a través de un incremento en los niveles de gastrina.

En todos los modelos expuestos anteriormente se ha demostrado, además, que los cambios funcionales en la secreción ácida asociados a la manipulación genética se asocian a cambios histológicos en la mucosa gástrica; sobre todo a variaciones en la abundancia relativa y características de las células secretoras y/o endocrinas de la misma. Por ejemplo, en los ratones carentes de gastrina, los estudios histoquímicos muestran que todos los tipos celulares propios de la mucosa gástrica están presentes, sin embargo se observa una reducción significativa en el número de células parietales y de células ECL (Friis-Hansen *et al.*, 1998), lo que concuerda con el estado de hiposecreción que presentan estos animales. De forma similar, se ha observado un descenso en el número de células ECL en ratones carentes del receptor CCK2 (Langhans *et al.*, 1997). Por el contrario, la eliminación del receptor H2 de la histamina produce una hipertrofia de la mucosa gástrica con un aumento en el número de células parietales y ECL (Kobayashi *et al.*, 2000), probablemente como mecanismo compensatorio a la falta de producción de ácido en respuesta a la histamina endógena.

Sin embargo, apenas existen modelos genéticos con alteraciones en las vías inhibitorias de la secreción ácida gástrica. En los últimos años se ha generado un modelo de ratón "knockout" para el receptor de tipo 2 de la somatostatina (Zheng *et al.*, 1997). Este mutante, aunque originalmente creado para el estudio de alteraciones en la

secreción de hormona del crecimiento, es totalmente normal en cuanto a su desarrollo y puede ser una herramienta muy útil para el estudio de los mecanismos neuroendocrinos inhibitorios que regulan la secreción ácida gástrica. Los ratones carentes de este receptor presenta un pH intragástrico y unos niveles de gastrina similares a los de los animales de tipo salvaje (Martínez *et al.*, 1998). Sin embargo, cuando se anestesian con uretano presentan una elevada secreción basal, que parece deberse por completo a una acción asociada a la gastrina endógena, a pesar de ser normogastrinémicos (Martínez *et al.*, 1998). Otras alteraciones en los mecanismos de control de la secreción ácida así como su correlación con cambios histológicos en la mucosa gástrica no han sido caracterizados en este modelo animal.

2.2 - La función gástrica en estados inflamatorios

La inflamación gástrica, gastritis, es una alteración frecuente en estados fisiopatológicos que cursan con alteraciones en la secreción, motilidad y/o sensibilidad gástrica. Las causas de la gastritis son múltiples y probablemente es consecuencia de una serie de desequilibrios entre los factores que tienden a agredir la mucosa y la capacidad de esta para defenderse de la agresión. La colonización del estómago por *Helicobacter pylori* es una de las causas más frecuentes de gastritis en humanos. Por ello, en la bibliografía se encuentran numerosos estudios que caracterizan las alteraciones fisiopatológicas asociadas a este patógeno. En la especie humana, la infección con *H. pylori* induce una inflamación de la mucosa gástrica que genera alteraciones fisiopatológicas que afectan tanto a la morfología como a la actividad funcional de la misma (Fox *et al.*, 1998). Por ello, frecuentemente, la gastritis debida a *H. pylori* se asocia a alteraciones en la secreción ácida gástrica. Algunos estudios han observado que la infección crónica por *H. pylori* puede ocasionar una atrofia de la mucosa gástrica asociada a un estado de hipoclorhidria o, por el contrario, desencadenar una gastritis no atrófica caracterizada por un aumento en la secreción ácida (El-Omar *et al.*, 1993, 1995). Estas alteraciones secretoras pueden ser un mecanismo de respuesta a la infección o a la inflamación en general, y no asociarse exclusivamente a la presencia de *H. Pylori*, ya que se han observado alteraciones similares en diferentes modelos animales de gastritis, tanto de origen bacteriano como no bacteriano (Dubois *et al.*, 1991; Dial *et al.*, 2000; Takashima *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001; Zavros *et al.*, 2002a, b, c).

Varios estudios en modelos animales han caracterizado los cambios funcionales de la mucosa gástrica asociados a la gastritis de origen infeccioso en modelos animales. Los estudios más recientes sugieren que durante el proceso inflamatorio se liberan localmente un gran número de mediadores inflamatorios, los cuales tenderían a maximizar la capacidad secretora del estómago con el fin de evitar el sobrecrecimiento bacteriano. El aumento de la secreción gástrica sería el resultado de una estimulación

combinada de las células G (desencadenando una hipergastrinemia) y de células parietales y una inhibición de las células D, con la consiguiente disminución en los niveles de somatostatina (Zavros *et al.*, 2002a, b, c). Sin embargo, esta hipótesis contrasta con resultados previos, ya que una infección prolongada (24 semanas) por *H. pylori* en el ratón indujo una gastritis severa acompañada de una disminución en la secreción ácida gástrica (Dial *et al.*, 2000). Este estado de hipoclorhidria se ha relacionado con un aumento en los niveles de PGs, derivado de la expresión de la enzima ciclo-oxigenasa de tipo 2 (COX-2) (Dial *et al.*, 2000).

Por otro lado, en la especie humana, un gran número de casos de gastritis tienen lugar en ausencia de una infección aparente por *H. pylori*, e incluso sin alteraciones orgánicas evidentes en la pared gástrica. Sin embargo, los cambios funcionales asociados a la gastritis de origen no infeccioso han sido poco estudiados. En varios estudios se han empleado anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) para inducir respuestas inflamatorias gástricas, basándose en su potencial gastrolesivo (Glavin y Szabo, 1992; Wagner *et al.*, 1995; Vane y Botting, 1998). Existen otro tipo de irritantes leves que no ocasionan lesiones orgánicas evidentes pero pueden inducir una inflamación de la mucosa gástrica. Recientemente se ha utilizado el bloqueante de los grupos sulfidrilo, yodoacetamida, para el desarrollo de una gastritis leve subcrónica en la rata (Barnett *et al.*, 2000; Bielefeldt *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2002). La yodoacetamida es un agente que actúa acetilando los grupos sulfidrilo de moléculas orgánicas (glutacion y algunos aminoácidos) que tiene un importante papel en el mantenimiento de la integridad de la mucosa gastrointestinal (Romano *et al.*, 1992), generando un estado de inflamación leve sin ocasionar lesiones orgánicas evidentes. En estos estudios se ha visto que ratas tratadas con yodoacetamida (adicionada al agua de bebida) desarrollan un cuadro de gastritis leve, caracterizado por la presencia de un infiltrado inflamatorio difuso en la mucosa y submucosa gástrica, con ausencia de erosiones o ulceraciones (Barnett *et al.*, 2000; Bielefeldt *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2002). Sin embargo, a pesar de que los animales no desarrollan lesiones orgánicas evidentes, presentan cambios importantes en las funciones secretoras y sensoriales gástricas. En ratas tratadas durante 5 días con yodoacetamida se observó que la respuesta secretora a la pentagastrina estaba aumentada con respecto a los controles (Barnett *et al.*, 2000) y un tratamiento similar indujo respuestas hiperalgésicas asociadas a la distensión gástrica (Bielefeldt *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2002).

Por otro lado, los estados de gastritis cursan también con alteraciones variables en la motilidad gástrica. La gastritis no se asocia con un patrón consistente de alteraciones motoras y, tanto en animales como en la especie humana, se han descrito la estimulación, la inhibición o la ausencia de cambios en los patrones de vaciamiento gástrico. En humanos infectados con *H. pylori* no se ha observado una correlación entre el vaciamiento gástrico y la presencia de gastritis, y se ha descrito tanto la ausencia de variaciones en la tasa normal de vaciamiento gástrico como la presencia de aumentos o disminuciones de la misma (Chang *et al.*, 1996; Manes y Marfertheiner, 1999; Koskenpato *et al.*, 2000; Chiloiro *et al.*, 2001). De forma similar, diferentes estudios en

modelos animales de gastritis de origen bacteriano no han logrado tampoco demostrar un patrón consistente de cambios en el vaciamiento gástrico (Dubois *et al.*, 1991; Duval-Araujo *et al.*, 2000). Sin embargo, la relación entre vaciamiento gástrico y gastritis inducida por irritantes químicos no ha sido estudiada.

2.2.1 - Mediadores inflamatorios y función gástrica

Múltiples mecanismos y tipos celulares se han implicado en la génesis y mantenimiento de las respuestas inflamatorias. Los cuadros de gastritis se han asociado frecuentemente a alteraciones en los niveles de PGs, como es el caso del mecanismo de acción de los AINEs, y a la presencia de infiltrados inflamatorios a nivel de la mucosa y submucosa que liberarían mediadores celulares responsables de los cambios funcionales observados durante la inflamación.

Modelos animales de gastritis han implicado variaciones en la síntesis de PGs como uno de los mecanismos responsables de los cambios funcionales, y eventualmente de las lesiones orgánicas de la mucosa, que pueden observarse durante la inflamación. Tanto en gastritis de origen infeccioso, en animales o en la especie humana (Fu *et al.*, 1999; Dial *et al.*, 2000), como no infeccioso, en ratas (Barnett *et al.*, 2000), se han descrito aumentos en los niveles de PGs, derivados de la expresión de la COX-2. Las prostaglandinas inhiben la secreción ácida gástrica (Levine *et al.*, 1984; Cohen, 1987) y tienen un papel determinante en muchos de los mecanismos de defensa de la mucosa, ya que participan activamente en la secreción de moco y bicarbonato, en la regulación del flujo sanguíneo gástrico y en los procesos de restitución y regeneración celular (Flemstrom, 1986; Cryer, 2001). En su conjunto, estas observaciones sugieren que las PGs pueden ser uno de los mediadores potencialmente implicados en los cambios funcionales asociados a la inflamación gástrica.

Como se ha expuesto anteriormente, la histamina tiene un papel fundamental en la regulación de la secreción ácida gástrica, además es, probablemente, uno de los principales mediadores de las respuestas inflamatorias. En el estómago, estudios inmunocitoquímicos han demostrado que la histamina se almacena principalmente en células ECL y mastocitos (Hakanson y Sundler, 1987). Aunque el papel de los mastocitos en la regulación de la secreción ácida gástrica no se conoce con exactitud, evidencias morfológicas y funcionales sugieren una posible implicación de estas células en el control de la misma. Estudios bioquímicos han demostrado que, en el estómago del ratón, aproximadamente un 66% de la histamina se almacena en células mastocitarias y un 34% en células no mastocitarias (Yamatodani *et al.*, 1982). A pesar de ello, la histamina de origen mastocitario parece ser de poca importancia en el control de la secreción ácida en condiciones fisiológicas. Sin embargo, durante procesos inflamatorios, la activación de los mastocitos con la consiguiente liberación de mediadores inflamatorios, incluyendo la histamina, podría contribuir de manera importante a las alteraciones secretoras observadas durante los mismos (Nakajima *et al.*, 1997; Yu y Perdue, 2001). Estas observaciones, sin embargo, contrastan con

resultados obtenidos en ratones deficientes en mastocitos en los cuales la secreción ácida gástrica basal y la respuesta secretora a pentagastrina se encuentran reducidas (Stechschulte *et al.*, 1990). De acuerdo con estas observaciones, se ha visto que los mastocitos residentes en el tracto gastrointestinal están implicados en la fisiopatología de varias alteraciones digestivas, tales como la úlcera péptica o la enfermedad inflamatoria intestinal (Bechi *et al.*, 1993; Charalabos *et al.*, 1993; Whittle, 1993; Söderholm *et al.*, 2002). Igualmente, se ha observado un aumento en el número de mastocitos en la pared gástrica en cuadros de gastritis asociada a *H. pylori* o a tratamientos con AINEs (Nakajima *et al.*, 1997). Por último, estudios realizados en ratas han demostrado que el tratamiento con estabilizadores de la membrana de los mastocitos previene el daño gástrico inducido por etanol (Kalia, 2000). En su conjunto, estas observaciones sugieren que los mastocitos, en particular los mediadores liberados durante su activación, pueden participar de forma importante en las alteraciones funcionales asociadas a estados inflamatorios en el tracto gastrointestinal, incluyendo las alteraciones funcionales gástricas asociadas a los cuadros de gastritis.

II – OBJETIVOS

A partir de los antecedentes expuestos, el objetivo general de este trabajo ha sido la caracterización, *in vivo*, de algunos mecanismos de regulación de la función gástrica en el ratón, con especial énfasis en el control de la secreción ácida.

En primer lugar, se pretende caracterizar los cambios morfológicos y funcionales, a nivel gástrico, asociados a una gastritis subcrónica inducida por el irritante químico yodoacetamida. Para ello, se valorarán los cambios histológicos de la pared gástrica, así como los cambios en el peso corporal y en la ingesta asociados a la administración subcrónica de yodoacetamida. Además, se pretende caracterizar los cambios funcionales, alteraciones en la motilidad y en la secreción ácida gástrica, asociados al proceso inflamatorio y profundizar en los mecanismos implicados en los mismos, en particular, la posible implicación de las prostaglandinas y del componente celular asociado a la respuesta inflamatoria, en concreto de los mastocitos.

Por otro lado, se pretende caracterizar, *in vivo*, la implicación relativa de los diferentes subtipos de receptores de somatostatina (SSTR1-5), en la regulación de la secreción ácida y del vaciamiento gástrico en el ratón. Para ello, se empleará una combinación de técnicas basadas en la inmunoneutralización *in vivo* de péptidos reguladores gastrointestinales (gastrina y somatostatina) y la manipulación farmacológica de los receptores de somatostatina. Estas técnicas se emplearán para caracterizar la secreción ácida gástrica tanto en animales normales como en animales manipulados genéticamente en los cuales se ha eliminado el gen que codifica para el receptor de tipo 2 de la somatostatina (SSTR2). En estos animales, además de los cambios funcionales asociados a la falta de los receptores SSTR2 se pretende también caracterizar los cambios en la morfología de la mucosa gástrica asociados a la falta de dicho receptor y cómo esto puede afectar a las poblaciones celulares de la mucosa con inmunoreactividad de tipo gastrina (células G) y de tipo somatostatina (células D).

Por último, se pretende profundizar en el mecanismo de acción de los neuropéptidos bombesina y PACAP modulando la secreción ácida gástrica en el ratón, *in vivo*. En primer lugar se caracterizarán las acciones que estos neuropéptidos tienen sobre la secreción ácida gástrica. A continuación, se estudiará el mecanismo de acción de los mismos; en particular, la posible implicación de la somatostatina. Para ello, se empleará, de forma similar a lo expuesto anteriormente, una combinación de técnicas basadas en interferir la actividad biológica de la somatostatina endógena por técnicas de inmunoneutralización o por manipulación de sus receptores, bien por tratamiento farmacológico o bien por manipulación genética, empleando animales carentes del receptor SSTR2.

III – MATERIAL Y MÉTODOS

1 - Cambios en la Secreción Ácida y el Vaciamiento Gástrico Asociados a la Gastritis

1.1 - Animales

En este estudio se utilizaron ratones macho adultos Swiss albino CD-1 (20-25 g, 6-8 semanas de edad; Harlan Ibérica, S.A.; Barcelona). Los animales se mantuvieron con agua (modificada según los protocolos expuestos en el punto 1.2) y comida (Harlan Ibérica S.A.) *ad libitum*, bajo condiciones controladas de temperatura (22 ± 1 °C), humedad (40-45 %) y fotoperiodo (con luz de 7:30 h a 19:30 h). Los animales se ayunaron, con agua *ad libitum*, entre 18-20 horas antes del inicio de los experimentos, si no se indica de otra forma.

Todos los procedimientos siguieron las recomendaciones de la Sociedad Americana de Fisiología (American Physiological Society) para el uso de animales en experimentación, así como la legislación local.

1.2 - Inducción de la gastritis

La inflamación gástrica se indujo con el bloqueante de los grupos sulfidrilo, yodoacetamida, a partir de un modelo descrito previamente en la rata (Barnett *et al.*, 2000; Bielefeldt *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2002). Durante un periodo de 6 días los animales fueron tratados con una solución al 0.1% de yodoacetamida, en una solución de sacarosa al 2% en agua. Durante el periodo de tratamiento, el agua de bebida se sustituyó por la solución de yodoacetamida, con acceso *ad libitum*; además los animales recibieron una administración intragástrica diaria (0.1 ml) de la misma solución. En los animales control, el agua de bebida y el tratamiento diario por vía intragástrica se sustituyó por una solución al 2% de sacarosa. Los experimentos se realizaron el séptimo día tras el comienzo del tratamiento.

1.3 - Control de la ingesta y el peso corporal

En un grupo de animales se determinaron diariamente los cambios en el peso corporal y en la ingesta de comida y bebida durante el periodo de tratamiento con yodoacetamida. Para ello, los animales se mantuvieron en jaulas individuales con agua (modificada adecuadamente) y comida *ad libitum*. Las determinaciones se realizaron entre las 12:00 y las 14:00 h.

1.4 - Histología gástrica

1.4.1- Obtención y procesado de las muestras

Tras un periodo de ayuno de 18-20 h, los animales se eutanasiaron por dislocación cervical seguida de toracotomía. A continuación, se abrió el abdomen por la

línea media, se localizaron el cardias y el píloro y se procedió a la disección del estómago. Seguidamente, éste se lavó con solución salina fisiológica, con el fin de eliminar cualquier contenido sólido, y se fijó por inmersión en una solución tamponada de formaldehído al 4%, conservándose en la misma solución hasta el momento de su procesado.

En el momento del procesado, áreas correspondientes al fundus y al antro se incluyeron en parafina con un procesador automático de tejidos (Inclusor MYR HMP110), para su sección mediante microtomo (3 µm de espesor, MICROM HM310). Para cada una de las muestras se obtuvieron múltiples secciones, que se tiñeron, siguiendo procedimientos estándar de histología, con hematoxilina-eosina o con azul de toluidina, para la identificación de mastocitos.

1.4.2- Evaluación de las muestras y contaje de mastocitos

La evaluación histopatológica se realizó mediante microscopía óptica (Nikon Eclipse E6000) y las fotografías microscópicas se obtuvieron con un cámara digital (Nikon DXM1200). En las muestras teñidas con azul de toluidina, se evaluó el número de mastocitos tanto en la mucosa como en la submucosa. Para ello, se contó el número de células en 10 campos de microscopio consecutivos para cada sección, repitiéndose el procedimiento en múltiples secciones para cada muestra. En todos los casos, la evaluación de las muestras se realizó mediante un procedimiento ciego.

1.5 - Vaciamiento gástrico de una comida sólida nutritiva

La tasa de vaciamiento gástrico de una comida sólida nutritiva se determinó siguiendo, con modificaciones menores, una técnica previamente descrita (Barrachina *et al.*, 1997a, b). Tras un periodo de ayuno de 18-20 h en jaulas individuales, los animales tuvieron libre acceso, durante 1 h, a una comida sólida nutritiva, consistente en una cantidad conocida de su dieta estándar. Tras este periodo de tiempo, se retiró el agua de bebida y la comida y los animales se mantuvieron en sus correspondientes jaulas durante 2 h más, tiempo al cual se determinó la tasa de vaciamiento gástrico. Para ello, los animales se eutanasiaron mediante dislocación cervical seguida de toracotomía. A continuación se abrió la cavidad abdominal por la línea media, se pinzaron el cardias y el píloro y se extrajo el estómago, se pesó y luego se lavó con agua destilada con el fin de eliminar el contenido gástrico. A continuación, se secó y se peso de nuevo la pared gástrica. La cantidad total de comida presente en el estómago se calculó como la diferencia entre el peso total del estómago con el contenido y el peso de su pared. La ingesta de comida durante la hora de acceso al alimento se calculó como la diferencia entre el peso del alimento suministrado inicialmente y el peso del alimento retirado.

La tasa de vaciamiento gástrico se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$VG(\%) = 100 \times \left(1 - \frac{CG(g)}{I(g)} \right)$$

Donde *VG* representa el porcentaje de vaciamiento gástrico en 2 h, *CG* el contenido gástrico e *I* la ingesta.

Todos los experimentos se realizaron entre las 9:00 y las 13.00 h para evitar posibles variaciones circadianas.

1.6 - Secreción ácida gástrica

1.6.1 - Cirugía

Los animales fueron anestesiados con uretano (25% en suero fisiológico; 1.25 g/kg, ip). En primer lugar, para asegurar una adecuada ventilación, se procedió a realizar una traqueotomía. A continuación, se ligó el esófago a nivel cervical con un hilo de sutura. Posteriormente, se realizó una laparotomía media y, tras su localización, se ligó el píloro. Luego, se realizó una pequeña incisión en la zona no glandular del estómago, se lavó el lumen gástrico con suero fisiológico (~37 °C), y se introdujo una doble cánula que se fijó a la pared gástrica con hilo de sutura.

Los animales se colocaron sobre una manta calefactora para mantener su temperatura corporal constante a lo largo de todo el experimento (~37 °C). A continuación, se canularon las venas ilíacas con una aguja (30G) insertada en un tubo de polietileno E-10 (Baxter, Irvine, California, USA), para la administración de tratamientos por vía intravenosa. Durante todo el experimento se perfundió, mediante una bomba de infusión, suero fisiológico a una velocidad constante de 0.1 ml/h (Harvard apparatus, Holliston, Massachusetts). La perfusión de suero fisiológico se sustituyó por los tratamientos adecuados según los diferentes protocolos experimentales.

A lo largo de todo el experimento el lumen gástrico se perfundió con suero fisiológico (~37 °C, pH=7.0) a una velocidad constante de 0.3 ml/min. Para ello, una de las vías de la doble cánula gástrica se conectó a una bomba peristáltica (Minipuls 3, Wilson, Middleton, USA) que aseguraba el flujo continuo de suero fisiológico. El efluente gástrico se recogió por la segunda vía de la cánula durante todo el experimento. Esta velocidad de perfusión se ha visto que asegura una buena recuperación de la secreción gástrica, sin producir distensión por acumulación en el interior del estómago, lo que alteraría las respuestas secretoras (Torkian *et al.*, 1998).

1.6.2 - Valoración de la secreción ácida gástrica

La secreción ácida gástrica se determinó por titulación a pH 7.0 de las muestras de perfundido gástrico con NaOH 0.001 N. Para ello se empleó un titulador automático

(TIM 800, Radiometer Copenhagen, Dinamarca) programado a un punto final de titulación de 7.0.

En el proceso de titulación, 1 mol de la base empleada (NaOH) contiene 1 mol de iones OH⁻, que en solución neutralizaría un mol de H⁺. Por lo tanto, los equivalentes de NaOH empleados para elevar el pH de una muestra hasta un valor de 7.0 son iguales a los equivalentes de H⁺ presentes en la misma.

1.6.3 - Protocolos experimentales

Tras un periodo de estabilización de 30-60 min, se procedió a la determinación de la secreción ácida gástrica basal durante al menos 30 min. A continuación se aplicaron los diferentes tratamientos. En todos los casos, la secreción se valoró a lo largo de todo el periodo experimental a intervalos de 10 min.

En una primera serie de experimentos, los animales recibieron una administración intraperitoneal de indometacina (5 mg/kg) o vehículo (bicarbonato sódico al 1%, 0.1 ml) o una perfusión intragástrica de compuesto 48/80, un degranulador de mastocitos. En este último caso, el compuesto 48/80 se adicionó a la solución de perfusión intragástrica (3 µg/ml, pH 7.0) durante un periodo de 2 h (dosis total de 108 µg por ratón); el grupo control fue perfundido con la solución salina habitual. La secreción ácida se monitorizó durante las dos horas siguientes.

En un segundo bloque de experimentos, tras un periodo basal de 30 min, se perfundió por vía intravenosa pentagastrina (16 µg/kg/h) o histamina (1 o 3 mg/kg/h), durante un periodo de 2 h. En experimentos paralelos, 30 min antes de iniciar la perfusión de los secretagogos los animales fueron tratados con indometacina (5 mg/kg, ip), con el estabilizador de mastocitos, cromoglicato sódico (cromolyn, 20 mg/kg, 0.1 ml, iv) o con el vehículo apropiado (bicarbonato sódico al 1% o suero fisiológico, respectivamente; 0.1 ml, ip o iv). Un grupo de animales fue tratado con el antagonista de los receptores H₂, cimetidina (10 mg/kg, iv), o su vehículo (suero fisiológico, 0.1 ml, iv) 10 min antes de iniciar la infusión de pentagastrina (16 µg/kg/h, iv, durante 2 h).

1.7 - Reactivos utilizados

La yodoacetamida (ICH₂CONH₂; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) se disolvió en una solución de sacarosa (Sigma Chem. Co.) al 2% en agua. La histamina, la cimetidina, el compuesto 48/80 y el cromolyn (todos de Sigma Chem. Co.) se disolvieron en suero fisiológico estéril (NaCl 0.9%). La indometacina (Sigma Chem. Co.) se disolvió en bicarbonato sódico al 1% en agua destilada. La pentagastrina (Pentavlon, Ayersdt Laboratories, New York, USA) se diluyó en suero fisiológico estéril hasta la concentración deseada.

2 - Secreción Ácida y Vaciamiento Gástrico en Ratones Carentes del Receptor de Tipo 2 de la Somatostatina

2.1 - Animales

Para estos estudios, se emplearon ratones macho adultos (20-30 g, 3-6 meses de edad) pertenecientes a la estirpe híbrida 129Sv/C57BL6, tanto de tipo salvaje (SSTR2 +/+) como carentes del receptor de tipo 2 de la somatostatina (SSTR2 -/-).

Los animales empleados proceden de diferentes camadas obtenidas de una colonia mantenida mediante cruces endogámicos de animales originales de tipo salvaje (SSTR2 +/+) o mutante (SSTR2 -/-). Los animales originales, testados genéticamente como homocigóticos, fueron facilitados por Merck Research Laboratories (Rahway, New Jersey, USA).

2.1.1 - Inactivación del receptor SSTR2

Los animales SSTR2 -/- se generaron por inactivación del gen del receptor SSTR2 mediante técnicas de recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Durante este proceso se eliminó selectivamente el gen que codifica para el receptor SSTR2a por delección del fragmento XbaI de 1.2 kilobases, que contiene el DNAC correspondiente al mismo, y en su lugar se insertó el marcador PGKneo (Zheng *et al.*, 1997). Posteriormente, se demostró la completa inactivación del gen SSTR2 determinando los niveles de RNAm en el cerebro mediante técnicas de Northern blot e hibridación *in situ*. Por último, el ratón original carente del receptor tipo 2 de la somatostatina (SSTR2 -/-) se genotipó como homocigótico mediante análisis por Southern blot (Zheng *et al.*, 1997). Los animales así obtenidos se han mantenido como una colonia endogámica a partir de la F1, asegurando así el mantenimiento de las características genéticas de los mismos.

2.1.2 - Mantenimiento de los animales

Los animales se mantuvieron con agua y comida (Harlan Ibérica S.A.) *ad libitum*, bajo condiciones controladas de temperatura (22 ± 1 °C), humedad (40-45%) y fotoperiodo (con luz de 7:30 a 19:30 h). Los animales se ayunaron, con agua *ad libitum*, entre 18-20 horas antes del inicio de los experimentos, si no se indica de otra forma.

Todos los procedimientos siguieron las recomendaciones de la Sociedad Americana de Fisiología (American Physiological Society) para el uso de animales en experimentación, así como la legislación local.

2.2 - Histología del estómago

Para la obtención y preparación de muestras para histología se siguió el mismo procedimiento al descrito en el apartado 1.4. Sin embargo, en este estudio sólo se

realizó una tinción de hematoxilina-eosina. En este caso, además de una inspección visual microscópica se realizó un análisis morfométrico de las secciones histológicas, en el cual se determinó el grosor de la mucosa, submucosa y capa muscular de múltiples secciones de antro y cuerpo gástrico. El análisis morfométrico se realizó sobre imágenes digitales empleando el programa informático de análisis de imágenes ImageJ (NIH Image, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

2.3 - Inmunohistoquímica para gastrina y somatostatina

2.3.1 - Obtención y procesado de las muestras

Ratones, tanto SSTR2 *+/+* como SSTR2 *-/-*, ayunados por 18-20 h o mantenidos *ad libitum*, se eutanasiaron por dislocación cervical seguida de toracotomía. A continuación, se abrió el abdomen por la línea media, se localizaron el cardias y el píloro y se procedió a la disección del estómago. Seguidamente, éste se lavó con solución salina fisiológica, con el fin de eliminar cualquier contenido sólido, y se fijó por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% en tampón de fosfato (0.1 M, pH 7.4). Las muestras se fijaron en esta solución durante 6-7 h a una temperatura de 4 °C, a continuación se pasaron a una solución crioprotectora de sacarosa al 10% en tampón de fosfato (0.1 M, pH 7.4) y se mantuvieron en la misma durante 12-15 h (4 °C), finalmente las muestras se lavaron en tampón de fosfato (0.1 M, pH 7.4) y se mantuvieron en este medio hasta el momento de su congelación. Para la congelación, segmentos gástricos correspondientes al fundus y al antro se cubrieron completamente con un sustrato de congelación (Sakura Tissue-Teck OCT; IMEB Inc., Chicago, Illinois, USA), se sumergieron en 2-metilbutano enfriado en un medio de hielo seco y a continuación se montaron para su sección en criostato (Microm 500 OH, Carl Zeiss). Para cada muestra se obtuvieron múltiples secciones (12 µm de grosor), que se montaron directamente sobre portaobjetos; las secciones así obtenidas se conservaron a -20 °C hasta el momento de su procesado.

2.3.2 - Protocolo de inmunohistoquímica

Secciones de antro y fundus gástrico, obtenidas como se ha descrito anteriormente, se procesaron siguiendo un protocolo estándar de inmunohistoquímica. Brevemente, se siguieron los siguientes pasos:

- 1- Lavado con tampón de fosfato (0.01 M, pH 7.4; 3 veces, 15 min cada lavado). Este proceso se repitió antes de cada uno de los pasos siguientes.
- 2- Incubación (1 h, temperatura ambiente) con una solución bloqueante (para reducir la inmunoreactividad inespecífica) de suero normal caprino (10% en 0.01 M PBS).

3- Incubación con el anticuerpo primario en un medio de Triton X-100 al 0.3% en tampón de fosfato (4 °C, 48 h).

Se emplearon dos anticuerpos primarios diferentes:

- Anti-gastrina obtenido en conejo (CURE n° 05109.1D, dilución 1:500; CURE: Digestive Diseases Research Center).
- Anti-somatostatina obtenido en ratón (CURE S.6, dilución 1:500; CURE: Digestive Diseases Research Center)

4- Incubación con el anticuerpo secundario (2 h, temperatura ambiente). Como anticuerpo secundario se empleó IgG de cabra anti-ratón o anti-conejo conjugada con rodamina (dilución 1:100; Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, Pensilvania, USA).

5- Finalizado el proceso de incubación, las muestras se cubrieron con una solución de glicerol:tampón de fosfato (9:1). Y se conservaron a 4 °C hasta el momento de su evaluación.

La especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, y por lo tanto de la inmunoreactividad observada, se determinó incubando algunas secciones con anticuerpo primario al cual se había añadido previamente un exceso de antígeno (gastrina-17 o somatostatina-14, según corresponda).

2.3.3 - Contajes celulares

Una vez teñidas, las muestras se observaron y cuantificaron (contajes celulares) con un microscopio de fluorescencia (Nikon Optiphot). Imágenes digitales se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioskop 2) equipado con un sistema de adquisición de imágenes (AxioVision, Carl Zeiss). El número de células con inmunoreactividad de tipo gastrina o somatostatina se valoró en secciones tanto de fundus como de antro gástrico. Para ello se determinó el número de células inmunoreactivas por campo de microscopio (X40) en 5 campos consecutivos, cubriendo todo el espesor de la mucosa, de tres secciones diferentes para cada una de las áreas y cada uno de los animales (contaje celular en un total de 15 campos de microscopio por área gástrica y animal). Los contajes celulares se realizaron siguiendo un procedimiento ciego.

2.4 - Vaciamiento gástrico de una comida sólida nutritiva

El vaciamiento gástrico de una comida sólida nutritiva se valoró siguiendo el procedimiento expuesto en el punto 1.5. En este caso, sin embargo, la tasa de vaciamiento gástrico se determinó 1, 2 y 4 h después de la retirada de la comida.

2.5 - Valoración del pH intragástrico

Para determinar el pH intragástrico, los animales, tras un periodo de ayuno de 18-20 h, fueron eutanasiados por dislocación cervical seguida de toracotomía. A continuación, se realizó una laparotomía media, se diseccionó el estómago, se abrió a lo largo de la curvatura mayor y se lavó el lumen con 3 ml de solución salina fisiológica a pH 7.0. El líquido de lavado se recogió y se centrifugó (3000 rpm, 10 min, 4 °C) para eliminar cualquier tipo de residuo. El pH y el contenido de ácido, mediante titulación a pH 7.0 (ver apartado 1.6.2 para detalles sobre el proceso de titulación), se determinaron en el sobrenadante.

El pH intragástrico, tanto en animales de tipo salvaje como en SSTR2 *-/-*, se valoró en diferentes condiciones experimentales:

- 1- Animales anestesiados con uretano. Los animales se anestesiaron con uretano (1.25 g/kg, ip) durante 1 h. A continuación, el pH intragástrico se determinó como se ha explicado anteriormente.
- 2- Animales conscientes. En este caso se emplearon tanto animales ayunados por 18-20 h como animales a los que tras el ayuno se les permitió el acceso libre a una comida sólida nutritiva normal durante 1 h. En este último caso, el pH intragástrico se determinó 1 h tras finalizar la exposición al alimento.

2.6 - Secreción ácida gástrica

2.6.1 - Cirugía y valoración de la secreción ácida gástrica

Los procedimientos quirúrgicos y de valoración de la secreción ácida gástrica en estos experimentos son iguales a los descritos en los apartados 1.6.1 y 1.6.2.

2.6.2 - Protocolos experimentales

Independientemente del protocolo experimental seguido, en todos los casos la secreción ácida se valoró a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento.

Secreción ácida gástrica basal. Tras un periodo de estabilización de 30-60 min la secreción basal se valoró durante un periodo de 2 h.

Efecto de la inmunoneutralización in vivo de la gastrina y la somatostatina sobre la secreción basal. Tras un periodo basal de 30 min, se administró por vía intravenosa el anticuerpo monoclonal anti-somatostatina CURE S.6 (150 µg/ratón, 0.1 ml), el anticuerpo monoclonal anti-gastrina CURE nº 05109.1D (150 µg/ratón, 0.1 ml) o el anticuerpo control anti-KLH (keyhole limpet hemocyanin, 150 µg/ratón, 0.1 ml). La secreción ácida gástrica se determinó durante un periodo de 2 h tras los diferentes tratamientos.

En un grupo de animales SSTR2 +/+, a los 30 min de la administración del anticuerpo anti-somatostatina (150 µg/kg, iv) se inició una infusión iv de 1 h de somatostatina-14 (20 µg/kg/h) o de vehículo (suero fisiológico, 0.1 ml/h).

Efecto del bloqueo de los receptores H2 con cimetidina y del bloqueo colinérgico con atropina sobre la secreción ácida. En una serie de experimentos, tras un periodo control de 1 h los animales recibieron cimetidina (30 mg/kg, 0.1 ml, iv), atropina (2 mg/kg, 0.1 ml, sc) o el vehículo apropiado (suero fisiológico, 0.1 ml, iv o sc) y la secreción se valoró durante las 2 h siguientes. En un grupo de animales SSTR2 +/+, tras el periodo basal de 30 min la secreción ácida se estimuló con pentagastrina (16 µg/kg/h, iv), a los 30 min del inicio de la infusión se administró atropina (2 mg/kg, 0.1 ml, sc) o vehículo (suero fisiológico, 0.1 ml, sc) y la secreción ácida se valoró durante las 2 h siguientes.

Efecto de la somatostatina y sus análogos sobre la secreción ácida. En una serie de experimentos se estudiaron los efectos sobre la secreción ácida de la somatostatina-14 y de varios análogos de la misma, con afinidad selectiva por los diferentes subtipos de receptores de somatostatina (Tabla II.2.1). En animales SSTR2 +/+, debido a la baja tasa de secreción basal, las acciones de la somatostatina-14 y sus análogos se determinaron sobre la secreción estimulada con pentagastrina (16 µg/kg/h, iv).

De forma general se siguieron dos protocolos experimentales diferentes:

- 1- Perfusión intravenosa. En animales SSTR2 +/+, a los 30 min del comienzo de la infusión de gastrina se inició una infusión iv de 1 h de somatostatina-14 (20 µg/kg/h) o de sus análogos: SMS 201-995 (20 µg/kg/h), L-797-591 (20, 100 o 200 µg/kg/h), DC 32-87 (20 µg/kg/h), BIM-23056 (20, 100 o 200 µg/kg/h), L-803-087 (20, 100 o 200 µg/kg/h) o BIM-23052 (20, 100 o 200 µg/kg/h). En animales SSTR2 -/- se siguieron los mismos protocolos, pero los tratamientos se iniciaron tras un periodo basal de 60 min. La tabla II.2.1 muestra la especificidad relativa de cada uno de los compuestos por los diferentes tipos de receptores de somatostatina.
- 2- Curva dosis-respuesta acumulada. En animales SSTR2 +/+, a los 30 min de iniciar la infusión de gastrina se administró vehículo como un bolus iv (0.1 ml) y 30 min más tarde se administró somatostatina-14 o sus análogos, SMS 201-995 o DC 32-87, en dosis acumuladas crecientes de 1, 5, 10, 15 y 20 µg/kg (0.1 ml); con un intervalo de 30 min entre dosis. En animales SSTR2 -/- se siguió el mismo protocolo experimental, pero los tratamientos se iniciaron tras un periodo basal de 60 min.

En un grupo de animales SSTR2 +/+ se estudiaron también los efectos de la somatostatina cuando la secreción se estimuló con histamina. Tras el periodo basal, se

inició una infusión iv de histamina (5 mg/kg/h) y a los 30 min se inició la infusión de somatostatina (20 µg/kg/h) durante un periodo de una hora.

Efecto del antagonista selectivo de los receptores SSTR2, PRL-2903, sobre la secreción ácida basal. Tras 30 minutos de periodo basal, en un grupo de animales SSTR2 +/+ se administró el compuesto PRL-2903 (1.5 mg/kg, 0.1 ml) en forma de bolus iv, y la secreción se monitorizó durante las 2 h siguientes. En otro grupo de animales SSTR2 +/+ se administró PRL-2903 (1.5 mg/kg, 0.1 ml) en forma de bolus iv, seguido de una infusión continua (1.5 mg/kg, 0.1 ml/h) durante un periodo de 2 h. En animales SSTR2 -/-, tras un periodo basal de 30 min se administró PRL-2903 (1.5 mg/kg) seguido de una infusión continua (1.5 mg/kg/h, durante 2h). Los grupos control siguieron los mismo protocolos de administración pero únicamente recibieron suero fisiológico.

Finalmente, en un grupo de animales SSTR2 +/+, se administró PRL-2903 en forma de bolus seguido de una infusión continua (1.5 mg/kg + 1.5 mg/kg/h, durante 2 h) y a los 10 min, se inició a su vez una infusión iv de somatostatina-14 (20 µg/kg/h) o de vehículo (suero fisiológico, 0.1 ml/h) durante 1 h.

2.7 - Reactivos utilizados

La histamina, la cimetidina y la atropina (metilbromuro de atropina, Sigma Chem. Co.) se disolvieron en suero fisiológico estéril. La pentagastrina y el compuesto SMS 201-995 (acetato de octreótido, Sandostatin[®], Novartis, Suiza) se diluyeron hasta la concentración deseada en suero fisiológico estéril. La somatostatina-14 (Peptides International Inc., Louisville, Kentucky, USA) se diluyó en agua destilada estéril a una concentración de 1 µg/µl y se conservó en alícuotas (-80 °C) hasta su uso. Las diluciones posteriores se realizaron en suero fisiológico estéril.

Los compuestos no peptídicos L-797-591 y L-803-087 (Meck Research Laboratories) se disolvieron en dimetilsulfoxido (DMSO) a una concentración de 1 µg/µl, diluciones posteriores se realizaron en suero fisiológico. Los compuestos peptídicos DC 32-87, BIM-23056 y BIM-23052 (D. H. Coy, Tulane University, New Orleans, USA) se disolvieron en ácido acético al 0.01% a una concentración de 1 µg/µl, diluciones posteriores se realizaron en suero fisiológico. El compuesto PRL-2903 (D. H. Coy) se disolvió en suero fisiológico. La tabla II.2.1 muestra la estructura y la afinidad relativa de estos compuestos por los diferentes subtipos de receptores de somatostatina.

Para la inmunoneutralización *in vivo* de la somatostatina y la gastrina, así como para su detección por técnicas de inmunohistoquímica, se emplearon anticuerpos monoclonales purificados anti-somatostatina (CURE S.6; CURE: Digestive Diseases Research Center, UCLA, Los Angeles, California, USA) y anti-gastrina (CURE n° 05109.1; CURE: Digestive Diseases Research Center). Este anticuerpo antigastrina tiene una alta afinidad y especificidad para formas de la gastrina con 10 o más aminoácidos, incluyendo el extremo carboxiterminal biológicamente activo. Péptidos del tipo de la CCK o con un extremo carboxiterminal alterado no son reconocidos (Ohning

et al., 1994, 1996, 1998). Como control en los experimentos de inmunoneutralización *in vivo* se empleó un anticuerpo monoclonal purificado anti-KLH (keyhole limpet hemocyanin; CURE: Digestive Diseases Research Center). La producción, purificación y caracterización de estos anticuerpos ha sido previamente descrita en detalle (Kovacs *et al.*, 1989; Wong *et al.*, 1990; Ohning *et al.*, 1994, 1996, 1998; Martínez *et al.*, 2002).

Otros reactivos generales se obtuvieron de Sigma Chem. Co. (grado analítico), si no se ha especificado de otra forma en el texto.

3 - Interacción entre Somatostatina y Bombesina o PACAP en el Control de la Secreción Ácida Gástrica.

3.1 - Animales

Para estos estudios se emplearon ratones de tipo salvaje (SSTR2 +/+) y carentes de receptores SSTR2 (SSTR2 -/-). Las características de los mismos y su mantenimiento es igual al descrito en el apartado 2.1.

3.2 - Secreción ácida gástrica

3.2.1 - Cirugía y valoración de la secreción ácida gástrica

Los procedimientos seguidos para estudiar la secreción ácida gástrica en estos experimentos son iguales a los descritos en los apartados 1.6.1 y 1.6.2.

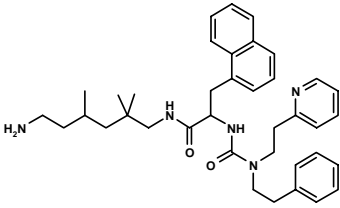
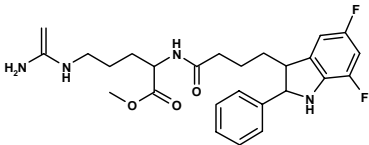
3.2.2 - Protocolos experimentales

Al igual que en los experimentos anteriores, irrespectivamente del protocolo seguido, la secreción ácida se valoró a intervalos de 10 min a lo largo de todo el periodo experimental.

Efectos de la bombesina sobre la secreción ácida gástrica en ratones SSTR2 +/+. En ratones SSTR2 +/+ anestesiados con uretano los efectos de la bombesina sobre la secreción ácida se estudiaron en dos condiciones experimentales diferentes:

- 1- Secreción ácida basal: Tras 30 min de periodo basal, bombesina (10, 15, 20 o 40 µg/kg) o vehículo (suero fisiológico, 0.1 ml/h) se infundieron iv durante 1 h.
- 2- Secreción ácida estimulada por secretagogos: Después de un periodo basal de 30 min la secreción ácida gástrica se estimuló con pentagastrina (16 µg/kg/h, iv), histamina (5 mg/kg/h, iv) o betanecol (0.6 mg/kg/h, iv). 30 min más tarde se inició una infusión de bombesina (10, 15, 20 o 40 µg/kg/h, iv) o vehículo (suero fisiológico, 0.1 ml/h), durante 1 h.

Tabla II.2.1 - Estructura y afinidad relativa de la somatostatina y sus análogos por los diferentes subtipos de receptores.

Compuesto	Estructura	Afinidad relativa ^a	Actividad biológica
Somatostatina-14	Ala-Gly-c[Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Ser-Cys]-OH	SSTR1~SSTR2~SSTR3~SSTR4~SSTR5	Agonista (ligando endógeno)
SMS 201-995	D-Phe-c[Cys-Phe-d-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-ol	SSTR2~SSTR3~SSTR5 >>SSTR1~SSTR4	Agonista
DC 32-87	D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys]-Nal-NH ₂	SSTR2 >SSTR5>>SSTR3~SSTR1~SSTR4	Agonista
BIM-23056	D-Phe-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH ₂	SSTR3 >>SSTR5>SSTR2~SSTR4~SSTR1	Agonista
BIM-23052	D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH ₂	SSTR5 >SSTR3>SSTR1~SSTR2~SSTR4	Agonista
PRL-2903	Fpa-c[D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Tle-Cys]-Nal-NH ₂	SSTR2 >>SSTR3>SSTR5~SSTR1~SSTR4	Antagonista
L-797-591		SSTR1 >SSTR4>>SSTR2>>SSTR3>SSTR5	Agonista
L-803-087		SSTR4 >SSTR1>>SSTR3>SSTR5>SSTR2	Agonista

^aBasado en estudios de unión a receptores humanos (Bruns *et al.*, 1996; Siehler *et al.*, 1998; Hannon *et al.*, 2002). En negrita se indica el subtipo de receptor sobre el cual cada una de las moléculas tiene actividad preferente.

Abu: ácido aminobutanoico; Fpa: 4-fluorofenilalanina; Pal: 3-piridilalanina; Tle: terleucina; Nal: 3-(2-naftil)alanina.

Implicación de la somatostatina en los efectos de la bombesina sobre la secreción ácida. Para determinar la posible implicación de la somatostatina en los efectos de la bombesina sobre la secreción ácida gástrica se trabajó en tres situaciones experimentales diferentes en las cuales se interfirió la acción de la somatostatina endógena:

- 1- Bloqueo farmacológico de los receptores SSTR2 con el antagonista selectivo PRL-2903: En animales SSTR2 +/+, tras un periodo basal de 30 min se administró PRL-2903 en forma de bolus seguido de una infusión continua (1.5 mg/kg + 1.5 mg/kg/h, durante 2h). A los 10 min del inicio de la infusión se inició a su vez una infusión de bombesina (20 µg/kg/h) o de vehículo (suero fisiológico, 0.1 ml/h) durante 1 h.
- 2- Inmunoneutralización *in vivo* de la somatostatina: En animales SSTR2 +/+, tras un periodo basal de 30 min se administró el anticuerpo monoclonal antisomatostatina CURE S.6 (150 µg/ratón, 0.1ml, iv) y a los 30 min se inició una infusión de bombesina (20 µg/kg/h) o de vehículo (0.1 ml/h) durante 1 h.
- 3- Infusión de bombesina en ratones SSTR2 -/-: En animales SSTR2 -/-, debido a la elevada secreción basal, los efectos de la bombesina sobre la secreción ácida se caracterizaron en condiciones basales. Tras un periodo basal de 30 min se inició una infusión iv de bombesina (10, 15, 20 o 40 µg/kg/h) o vehículo (0.1 ml/h) durante 1 h.

Efectos del PACAP-38 sobre la secreción ácida gástrica en ratones SSTR2 +/+. Los efectos del PACAP sobre la secreción ácida gástrica se caracterizaron en las mismas situaciones experimentales descritas anteriormente para la bombesina, aunque los protocolos experimentales seguidos no fueron exactamente los mismos.

- 1- Secreción ácida basal: Tras 30 min de periodo basal, se administró vehículo (suero fisiológico, 0.1 ml) en forma de infusión intravenosa continua; a la hora se inició la infusión intravenosa de PACAP-38 en dosis acumuladas crecientes (3, 7, 22, 45, 135 o 270 µg/kg/h, 0.1 ml, durante 1 h para cada dosis) .
- 2- Secreción ácida estimulada por secretagogos: Después de un periodo basal de 30 min la secreción ácida gástrica se estimuló con pentagastrina (16 µg/kg/h, iv), histamina (5 mg/kg/h, iv) o betanecol (0.6 mg/kg/h, iv). A los 30 min se inició una infusión de PACAP-38 (45, 135 o 270 µg/kg/h, iv) o vehículo (suero fisiológico, 0.1 ml/h), durante 1 h.

Implicación de la somatostatina en los efectos del PACAP sobre la secreción ácida. La posible implicación de la somatostatina en los efectos del PACAP-38 sobre la secreción

ácida se estudió en las mismas situaciones experimentales expuestas anteriormente para caracterizar la relación entre bombesina y somatostatina:

- 1- Bloqueo farmacológico de los receptores SSTR2 con el antagonista selectivo PRL-2903: En animales SSTR2 +/+, tras un periodo basal de 30 min se administró PRL-2903 en forma de bolus seguido de una infusión continua (1.5 mg/kg + 1.5 mg/kg/h, durante 2 h). A los 10 min del inicio de la infusión se inició a su vez una infusión de PACAP-38 (135 µg/kg/h) o de vehículo (0.1 ml/h) de 1 h de duración.
- 2- Inmunoneutralización *in vivo* de la somatostatina: En animales SSTR2 +/+, tras un periodo basal de 30 min se administró el anticuerpo monoclonal antisomatostatina CURE S.6 (150 µg/ratón, 0.1ml, iv) y a los 30 min se inició una infusión de PACAP-38 (135 µg/kg/h) o de vehículo (0.1 ml/h), durante 1 h.
- 3- Infusión de PACAP-38 en ratones SSTR2 -/-: En animales SSTR2 -/-, debido a la elevada tasa de secreción basal, los efectos del PACAP sobre la secreción ácida se caracterizaron en condiciones basales. Tras un periodo basal de 30 min se administró vehículo (suero fisiológico, 0.1 ml) en forma de infusión intravenosa continua; a la hora se inició una infusión de PACAP-38 en dosis acumuladas crecientes (3, 7, 22, 45, 135 o 270 µg/kg/h, 0.1 ml, durante 1 h para cada dosis).

3.3 - Reactivos utilizados

El PACAP-38 (Peptides International Inc.) y la bombesina (Sigma Chem. Co.) se disolvieron en agua destilada estéril a una concentración de 1 µg/µl y se conservaron en alícuotas (-80 °C) hasta su uso. Diluciones posteriores se realizaron en suero fisiológico estéril. El resto de reactivos son iguales a los descritos en el apartado 2.7.

4 - Análisis Estadístico

Todos los resultados están expresados como la media \pm el error estándar (SEM). Las diferencias entre dos grupos experimentales se determinaron mediante un test t de Student, para datos apareados o no apareados, según proceda. Las diferencias entre múltiples grupos experimentales se determinaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA), para datos apareados o no apareados, según proceda; seguido, cuando fue necesario, de un test de comparación múltiple (Student-Newman-Keuls). Para los conteos celulares se empleó un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis) seguido de un test de comparación múltiple (Student-Newman-Keuls). En todos los casos, una probabilidad de $P < 0.05$ fue considerada como estadísticamente significativa.

IV – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 - Cambios en la Secreción Ácida y el Vaciamiento Gástrico Asociados a la Gastritis

1.1 - Antecedentes y objetivos

La gastritis es una alteración frecuente en estados fisiopatológicos que cursan con alteraciones en la secreción, motilidad y/o sensibilidad gástrica. Como ya hemos mencionado, las alteraciones fisiopatológicas asociadas a la gastritis de origen infeccioso se han estudiado ampliamente en humanos, sobre todo la gastritis asociada a la presencia de *H. pylori*.

Sin embargo, numerosos casos de gastritis en la especie humana tienen lugar en ausencia de una infección aparente con *H. Pylori*, e incluso sin alteraciones orgánicas evidentes de la pared gástrica. Además de agentes infecciosos, una gran variedad de sustancias pueden lesionar la barrera mucosa de protección gástrica iniciando un proceso inflamatorio: fármacos con potencial gastrolesivo (salicilatos y AINEs, alcohol, etc.). Estas sustancias, generalmente, producen cuadros de gastritis asociada a lesiones orgánicas evidentes (del tipo de úlceras gástricas) (Glavin y Szabo, 1992; Wagner *et al.*, 1995; Vane y Botting, 1998). Existen además irritantes leves que no ocasionan lesiones orgánicas evidentes pero pueden inducir una inflamación de la mucosa gástrica. Pocos estudios se han dedicado a la caracterización de las alteraciones fisiopatológicas asociadas a este tipo de gastritis. Recientemente, se ha utilizado el bloqueante de los grupos sulfidrilo, yodoacetamida, para el desarrollo de gastritis en la rata. En estos estudios se ha visto que ratas tratadas con yodoacetamida desarrollan un cuadro de gastritis leve, sin lesiones orgánicas macroscópicas, acompañado de cambios importantes en las funciones secretoras y sensoriales (Barnett *et al.*, 2000; Bielefeld *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2002).

Estudios recientes en el ratón sugieren que los mecanismos que regulan la secreción ácida gástrica pueden estar alterados durante la gastritis de origen infeccioso. (Zavros *et al.*, 2002a, b, c). Estos estudios sugieren que durante el proceso inflamatorio se libera localmente un gran número de mediadores inflamatorios, los cuales maximizarían la capacidad secretora del estómago con el fin de evitar el sobrecrecimiento bacteriano. El aumento de la secreción gástrica sería el resultado de una estimulación combinada de las células G (generando un estado de hipergastrinemia) y de las células parietales y de una inhibición de las células D, con la consiguiente disminución en los niveles de somatostatina (Zavros *et al.*, 2002a, b, c). Sin embargo, esta hipótesis contrasta con resultados previos que muestran que una infección prolongada (de hasta 24 semanas) por *H. pylori* en el ratón induce una gastritis severa acompañada de una disminución en la secreción ácida gástrica (Dial *et al.*, 2000). Este estado de hipoclorhidria se ha relacionado con un aumento en los niveles de PGs, derivado de la expresión de la COX-2 (Dial *et al.*, 2000). Apoyando esta hipótesis, tanto en humanos infectados con *H. pylori* como en ratas con gastritis

inducida por yodoacetamida, se han observado aumentos en los niveles de PGs (Fu *et al.*, 1999; Barnett *et al.*, 2000). En conjunto, estas observaciones sugerirían que, durante la inflamación gástrica, se ponen en marcha mecanismos que tienden tanto a aumentar como a reducir la capacidad secretora gástrica. Sin embargo, se desconoce como estos mecanismos interaccionan entre sí.

De forma similar, los estados de gastritis cursan también con alteraciones variables en la motilidad gástrica. La gastritis no se asocia a un patrón consistente de alteraciones motoras. Tanto en humanos como en diferentes especies animales, se ha descrito la estimulación, la inhibición o la ausencia de cambios en los patrones de vaciamiento gástrico durante cuadros de gastritis, fundamentalmente de origen infeccioso (Dubois *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1996; Manes y Malfertheiner, 1999; Duval-Araujo *et al.*, 2000).

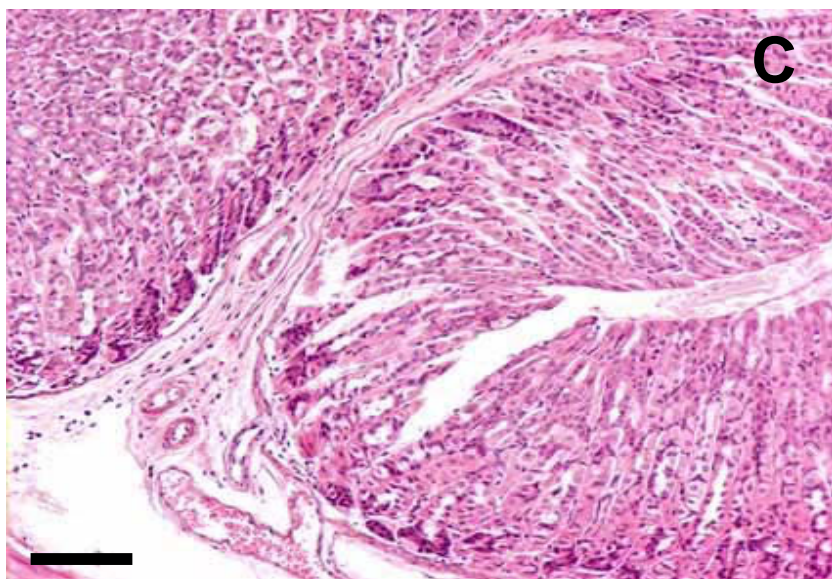
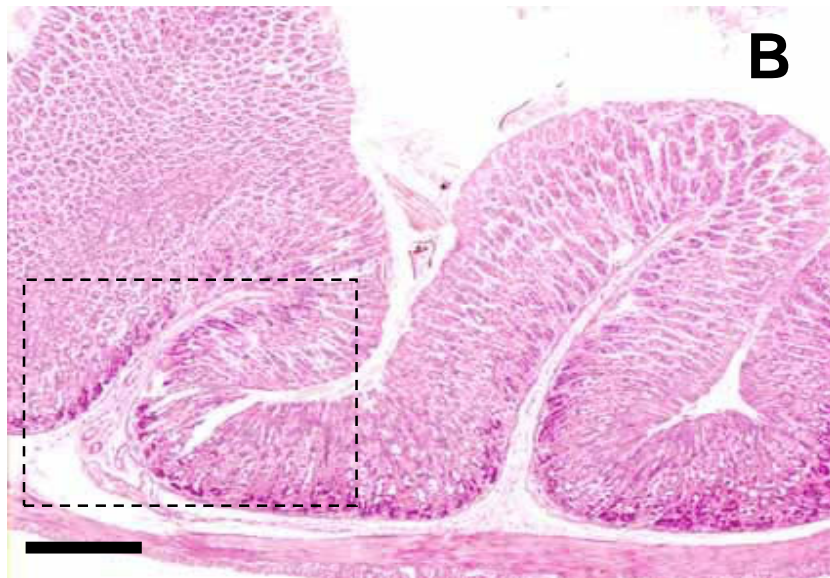
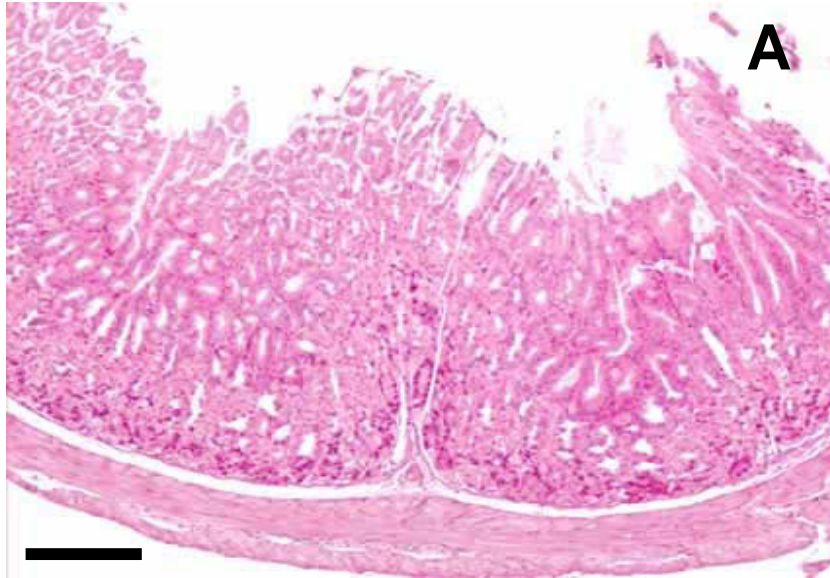
Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este estudio ha sido caracterizar los cambios morfológicos y funcionales, a nivel gástrico, asociados a una gastritis subcrónica leve en el ratón. Para ello, se ha empleado el irritante químico yodoacetamida, siguiendo un procedimiento similar al empleado previamente en la rata (Szabo *et al.*, 1984; Barnett *et al.*, 2000; Bielefeldt *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2002). En primer lugar, se han determinado los cambios histológicos en la pared gástrica, así como los cambios en el peso corporal y en la ingesta asociados a la administración subcrónica de yodoacetamida. A continuación, se han estudiado los cambios funcionales, alteraciones en el vaciamiento y en la secreción ácida gástrica, asociados al proceso inflamatorio. Por último, se han caracterizado los mecanismos implicados en los cambios funcionales observados; en particular, la posible implicación de las PGs y de células inflamatorias (mastocitos).

1.2 - Resultados

1.2.1 - Estudio Histológico

Macroscópicamente, el estómago de los animales tratados con yodoacetamida no mostró diferencias con respecto al de los animales control. Además, su peso fue similar en ambos grupos (yodoacetamida: 260 ± 5 mg, $n=55$; vehículo: 257 ± 6 mg, $n=62$; $P=0.71$).

Figura IV.1.1. (Página opuesta) Fotomicrografías representativas de secciones histológicas de antro gástrico teñidas con hematoxilina-eosina correspondientes a ratones tratados con vehículo (A) o con yodoacetamida (B) (barra: 300 μ m). La imagen B muestra un engrosamiento de la submucosa sin cambios aparentes en la mucosa o la muscular. (C) Detalle del área marcada en B (barra: 100 μ m), destacando el infiltrado inflamatorio difuso, predominantemente perivascular, en la submucosa.



En los animales tratados con yodoacetamida, en ningún caso se observaron lesiones macroscópicas en la mucosa gástrica o signos evidentes de inflamación (edema o hiperemia). El examen histológico de múltiples secciones de antro y fundus confirmó la ausencia de lesiones en la mucosa. Sin embargo, en los animales tratados con yodoacetamida se observó, ocasionalmente, dilatación de las criptas gástricas, aunque sin llegar a alterar su morfología. En numerosas zonas del antro y del fundus se observó un engrosamiento de la submucosa y la presencia de un infiltrado inflamatorio moderado y difuso localizado principalmente a nivel perivascular (Fig. IV.1.1), que en algunas zonas penetraba hasta la mucosa. El infiltrado inflamatorio se caracterizaba por la presencia de monocitos, linfocitos y neutrófilos; sin ningún predominio evidente. La tinción con azul de toluidina reveló la presencia de mastocitos, distribuidos de forma difusa entre el resto de infiltrado inflamatorio (Fig. IV.1.2). El conteo celular reveló un aumento en el número de este tipo de células en la submucosa, tanto del fundus como del antro gástricos, de los animales tratados con yodoacetamida, con respecto al grupo control (Tabla IV.1.1). En ningún caso se observaron alteraciones histológicas significativas en otras zonas de la pared gástrica.

Tabla IV.1.1 - Cuantificación del infiltrado mastocitario en el fundus y antro gástricos de animales tratados con yodoacetamida o con vehículo.^a

Tratamiento	n	Fundus		Antro	
		Mucosa	Submucosa	Mucosa	Submucosa
Vehículo	5	0.22 ± 0.05	0.68 ± 0.25	0.09 ± 0.06	0.91 ± 0.16
Yodoacetamida	5	0.29 ± 0.13	1.84 ± 0.32 [*]	0.25 ± 0.10	2.33 ± 0.18 [*]

^a: El número de mastocitos se determinó en 15 campos de microscopio, seleccionados al azar, de múltiples secciones, teñidas con azul de toluidina, correspondientes a muestras de animales tratados con vehículo o con yodoacetamida (n=5 para cada tratamiento). Los datos representan la media±SEM del número de células por campo.

*: P<0.05 vs animales tratados con vehículo [F(3,16)=10.736, P<0.001].

1.2.2 - Cambios en la ingesta y peso corporal asociados al tratamiento con yodoacetamida

Ambos grupos de animales tenían un peso corporal similar al inicio del tratamiento (yodoacetamida: 25.7±0.7 g; vehículo: 26.4±0.9 g; n=12 por grupo). Los animales tratados con yodoacetamida experimentaron una pérdida de peso de aproximadamente un 11% (P<0.05 vs peso inicial), que se evidenció a partir del 1^{er} día de tratamiento (Fig. IV.1.3), con una tendencia a la recuperación a partir del 5^o día. En el grupo control se observó únicamente una disminución transitoria en el peso corporal durante los dos primeros días de tratamiento (menos de un 5% comparado con el peso inicial, P>0.05; Fig. IV.1.3).

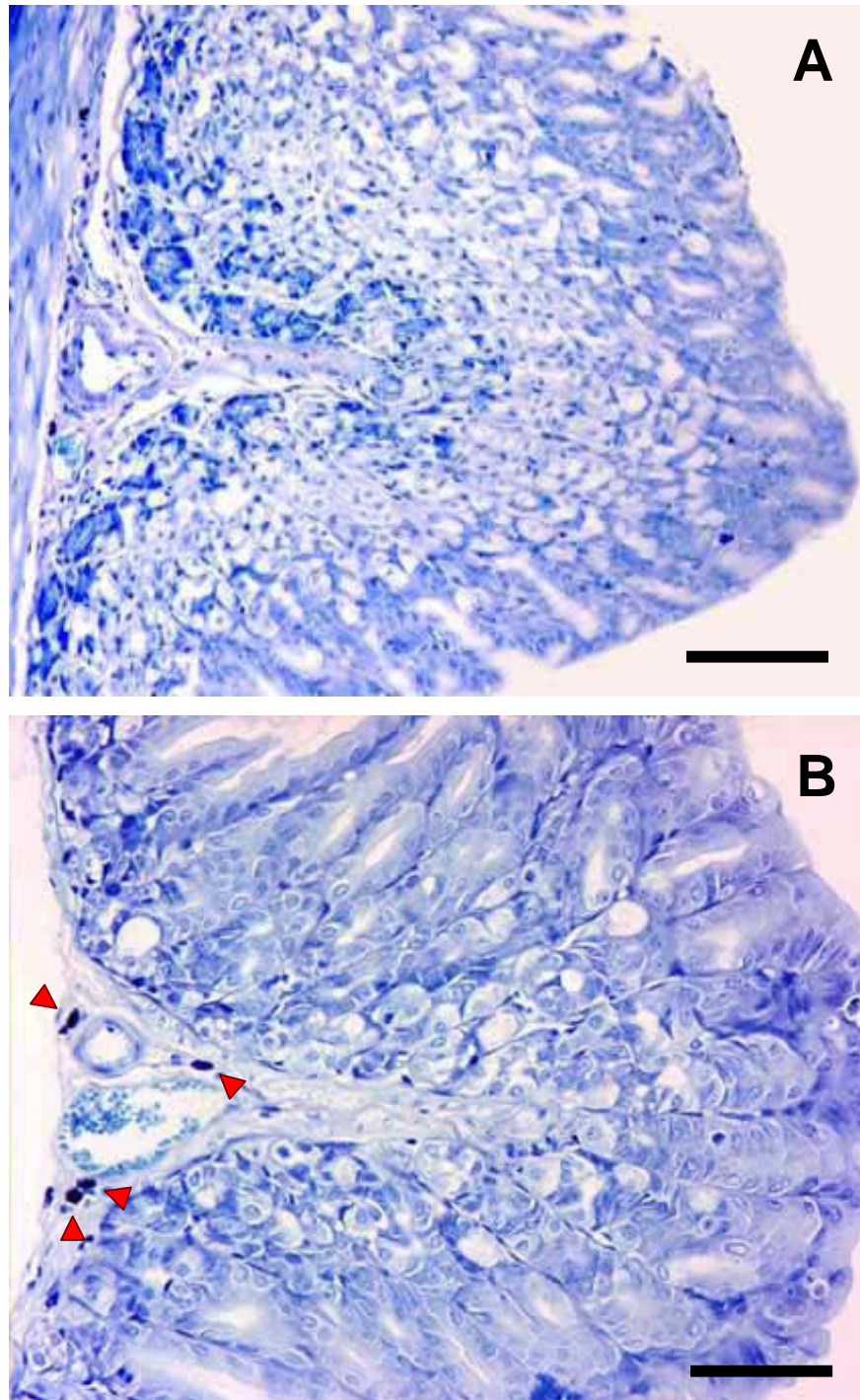


Figura IV.1.2. Fotomicrografías representativas de secciones histológicas de antro gástrico teñidas con azul de toluidina. (A) Sección correspondiente a un animal control (barra: 75 µm). (B) Sección correspondiente a un animal tratado con yodoacetamida (barra: 75 µm). Las flechas señalan varios mastocitos localizados entre el infiltrado inflamatorio perivascular observado en la submucosa.

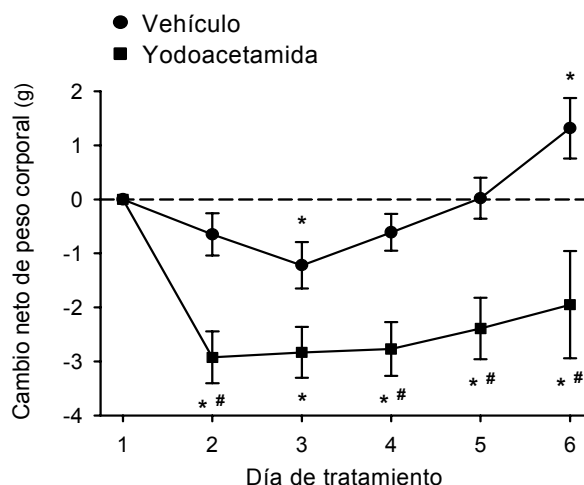


Figura IV.1.3. Efecto del tratamiento con yodoacetamida sobre el peso corporal. Los animales recibieron diariamente una administración intragástrica de yodoacetamida (0.1 % en sacarosa al 2%, 0.1 ml) o de vehículo (sacarosa 2%, 0.1 ml). Durante el mismo periodo los tratamientos se adicionaron al agua de bebida. El peso corporal se determinó diariamente. La figura muestra el cambio neto en el peso corporal (g) en relación con el peso inicial (determinado el día de inicio del tratamiento y representado como un cambio neto de 0.0 g) en animales tratados con yodoacetamida o vehículo. Los datos representan la media \pm SEM de 12 animales por grupo. *:P<0.05 vs día 1; #: P<0.05 vs vehículo el mismo día de tratamiento.

El descenso en el peso corporal en los animales tratados con yodoacetamida se acompañó con una disminución significativa en la ingesta de agua y de sólidos. Los animales tratados con vehículo consumieron cantidades crecientes de alimento a lo largo del periodo de tratamiento (Fig. IV.1.4). Un patrón similar se observó en el grupo tratado con yodoacetamida, aunque la cantidad de comida ingerida fue, consistentemente, menor a la de los controles (Fig. IV.1.4) De forma similar, la ingesta de agua fue aproximadamente un 50% menor en los animales tratados con yodoacetamida (20.4 ± 1.4 ml/6 días) que en el grupo control (39.2 ± 2.9 ml/6 días, $P<0.05$).

1.2.3 - Vaciamiento gástrico de una comida sólida nutritiva

En los animales tratados con yodoacetamida se observó un ligero aumento en la tasa de vaciamiento gástrico de una comida sólida nutritiva, pero sin llegar a ser estadísticamente significativo cuando se comparó con el grupo control (yodoacetamida: $34.9\pm 7.5\%$ en 2 h; vehículo: $21.6\pm 5.7\%$ en 2 h, $n=12$ para ambos grupos, $P>0.05$).

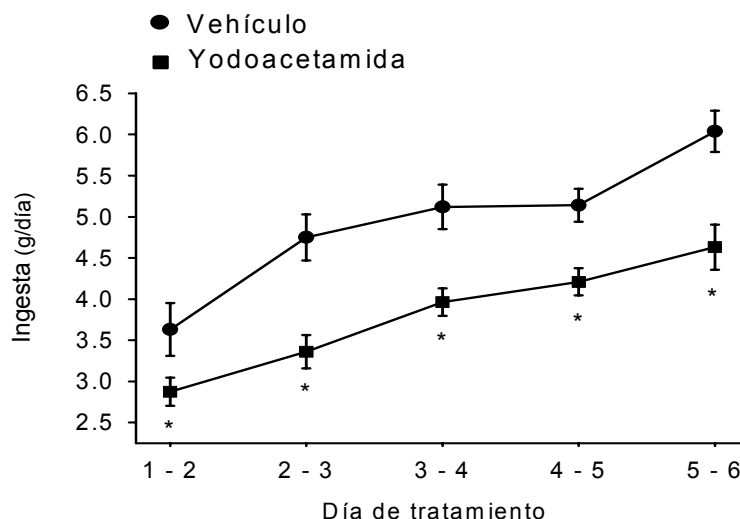


Figura IV.1.4. Efecto del tratamiento con yodoacetamida sobre la ingesta. Los animales recibieron diariamente una administración intragástrica de yodoacetamida (0.1% en sacarosa al 2%, 0.1 ml) o de vehículo (sacarosa al 2%). Durante el mismo periodo los tratamientos se adicionaron además al agua de bebida. La ingesta se determinó diariamente durante el mismo periodo de tiempo. Los datos representan la media \pm SEM de 12 animales por grupo *: $P < 0.05$ vs vehículo, el mismo día de tratamiento.

1.2.4 - Secreción ácida gástrica basal

En animales tratados con vehículo la secreción ácida basal media fue de 0.59 ± 0.05 μ moles durante 30 min de periodo basal ($n=70$). Esta tasa de secreción fue similar a la observada en animales sin ningún tipo de tratamiento (0.54 ± 0.05 μ moles/30 min, $n=8$). Los animales tratados con yodoacetamida mostraron una mayor variabilidad en la tasa de secreción ácida gástrica basal y un 68% de los mismos mostró valores de secreción por encima de la media observada en el grupo control (Fig. IV.1.5). En los animales tratados con yodoacetamida la secreción basal media alcanzó un valor de 0.91 ± 0.10 μ moles/30 min ($n=87$, $P < 0.05$ vs animales tratados con vehículo).

El pretratamiento con indometacina no modificó la secreción ácida gástrica basal ni en los animales tratados con vehículo (basal: 3.71 ± 0.55 μ moles/120 min; indometacina: 2.84 ± 0.63 μ moles/120 min; $n=3$) ni con yodoacetamida (basal: 4.21 ± 0.31 μ moles/120 min; indometacina: 4.91 ± 0.95 μ moles/120 min; $n=5$). De forma similar, la perfusión intragástrica de compuesto 48/80 no modificó la tasa de secreción basal en ninguno de los dos grupos experimentales [vehículo (basal: 2.59 ± 0.57 μ moles/120 min; compuesto 48/80: 2.36 ± 0.58 μ moles/120 min); yodoacetamida (basal: 1.98 ± 0.59 μ moles/120 min; compuesto 48/80: 1.46 ± 0.42 μ moles/120 min); $n=4$ para cada grupo].

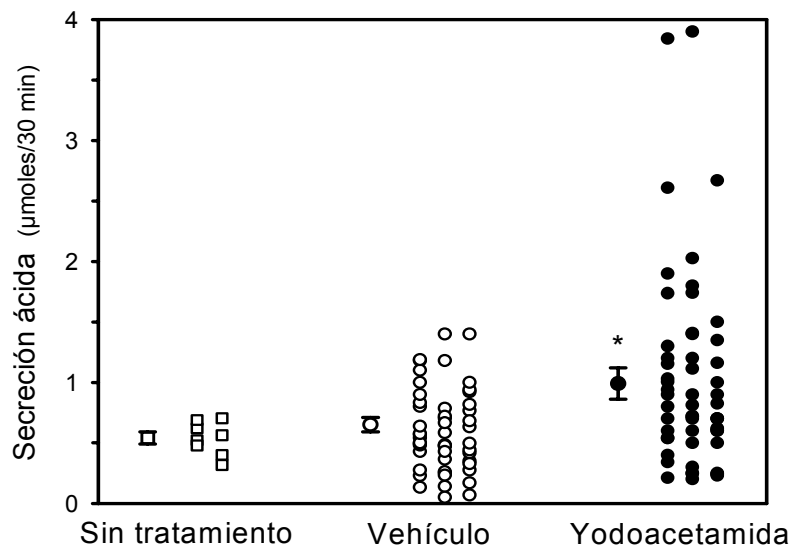


Figura IV.1.5. Secreción ácida gástrica basal en animales sin ningún tratamiento o tratados con yodoacetamida o vehículo. Cada símbolo representa la secreción ácida gástrica basal ($\mu\text{moles}/30 \text{ min}$) de un animal (no tratados, $n=8$; vehículo, $n=70$; yodoacetamida, $n=87$). Los símbolos a la izquierda, con errores, representan la media \pm SEM de cada grupo. *: $P < 0.05$ vs animales no tratados o tratados con vehículo [$F(2,161)=9.977$, $P < 0.001$].

1.2.5 - Efecto de la pentagastrina y la histamina sobre la secreción ácida

En animales tratados con vehículo, la infusión de pentagastrina estimuló la secreción ácida basal alcanzándose una fase en meseta a los 40 min, que correspondió a un incremento de un 130% sobre los valores basales de secreción. La secreción acumulada durante las 2 h de infusión de pentagastrina alcanzó un valor de $6.05 \pm 2.50 \mu\text{moles}$ ($P < 0.05$ vs basal: $2.60 \pm 0.93 \mu\text{moles}/120 \text{ min}$; $n=8$; Fig. IV.1.6). De forma similar, en los animales tratados con yodoacetamida, la infusión de pentagastrina estimuló la secreción ácida alcanzándose una fase en meseta a los 30 min del comienzo de la infusión. Durante este periodo, la secreción ácida se incrementó en un 400% con respecto a los valores basales, lo que correspondió a una secreción acumulada de $23.86 \pm 4.81 \mu\text{moles}$ durante los 120 min de infusión de pentagastrina ($P < 0.05$ vs basal: $5.70 \pm 1.99 \mu\text{moles}/120 \text{ min}$; $n=8$; $P < 0.05$ vs la respuesta secretora a pentagastrina en los animales tratados con vehículo; Fig. IV.1.6).

Tanto en los animales control, tratados con vehículo, como en los tratados con yodoacetamida, el pretratamiento con cimetidina (10 mg/kg) bloqueó completamente la respuesta secretora a la pentagastrina (Tabla IV.1.2).

Tabla IV.1.2 - Efecto del pretratamiento con cimetidina sobre la respuesta secretora a pentagastrina en animales tratados con vehículo o con yodoacetamida.^a

Tratamiento	Vehículo	Cimetidina
	Secreción ácida ($\mu\text{moles}/120 \text{ min}$) ^b	
Pretratamiento con vehículo		
Basal	1.97 \pm 0.54	3.36 \pm 0.24
Pentagastrina	4.48 \pm 0.5 *	3.22 \pm 0.78
	n = 4	n=4
Pretratamiento con yodoacetamida		
Basal	2.94 \pm 0.26	4.33 \pm 0.90
Pentagastrina	12.11 \pm 3.14 * #	6.47 \pm 2.09
	n = 7	n = 6

^a: Tras 30 min de periodo basal, se administró cimetidina (10 mg/kg, iv) o vehículo (0.1 ml/ratón, iv) y 10 min después se inició una infusión de pentagastrina (16 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$, durante 2 h). La secreción se determinó a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento.

^b: Los valores representan la media \pm SEM del número de animales indicado (n).

*: $P < 0.05$ vs respectiva secreción basal. #: $P < 0.05$ vs respuestas secretoras a la pentagastrina en el resto de grupos experimentales [$F(7,34) = 3.779$, $P = 0.004$].

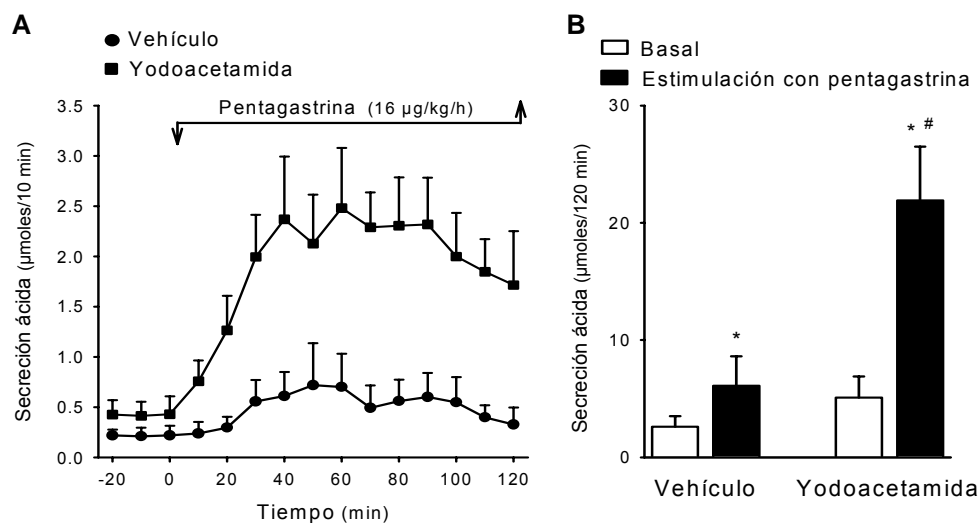


Figura IV.1.6. Efecto del pretratamiento con yodoacetamida en la respuesta secretora a pentagastrina. Tras un tratamiento de 6 días con yodoacetamida o vehículo, los animales se anestesiaron con uretano y la secreción ácida basal se determinó durante 30 min, a continuación se inició una infusión iv de pentagastrina (16 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$, durante 2h). La secreción ácida se determinó cada 10 min durante todo el experimento. A: Cambios en la secreción ácida en función del tiempo. B: Secreción ácida acumulada ($\mu\text{moles}/120 \text{ min}$). Los datos representan la media \pm SEM de 8 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs basal; #: $P < 0.05$ vs respuesta secretora a pentagastrina en los animales tratados con el vehículo (ANOVA).

En animales tratados con vehículo, la infusión de histamina a la dosis de 1 mg/kg/h sólo incrementó ligeramente la secreción ácida (2.96 ± 0.75 $\mu\text{moles}/120$ min; $P > 0.05$ vs basal: 1.67 ± 0.45 $\mu\text{moles}/120$ min; $n=6$); mientras que a la dosis de 3 mg/kg/h se alcanzaron unos valores de secreción de 16.04 ± 2.95 $\mu\text{moles}/120$ min ($P < 0.05$ vs basal: 1.70 ± 0.49 $\mu\text{moles}/120$ min; $n=7$; Fig. IV.1.7). En ratones tratados con yodoacetamida, tanto la dosis de 1 mg/kg/h (6.97 ± 2.04 $\mu\text{moles}/120$ min; $P < 0.05$ vs basal: 2.19 ± 0.40 $\mu\text{moles}/120$ min; $n=6$) como la de 3 mg/kg/h (32.34 ± 6.11 $\mu\text{moles}/120$ min; $P < 0.05$ vs basal: 5.91 ± 2.03 $\mu\text{moles}/120$ min; $n=7$) fueron eficaces estimulando la secreción (Fig. IV.1.7). Además, para ambas dosis de histamina, las respuestas secretoras fueron significativamente superiores en los animales tratados con yodoacetamida que en los tratados con vehículo (Fig. IV.1.7).

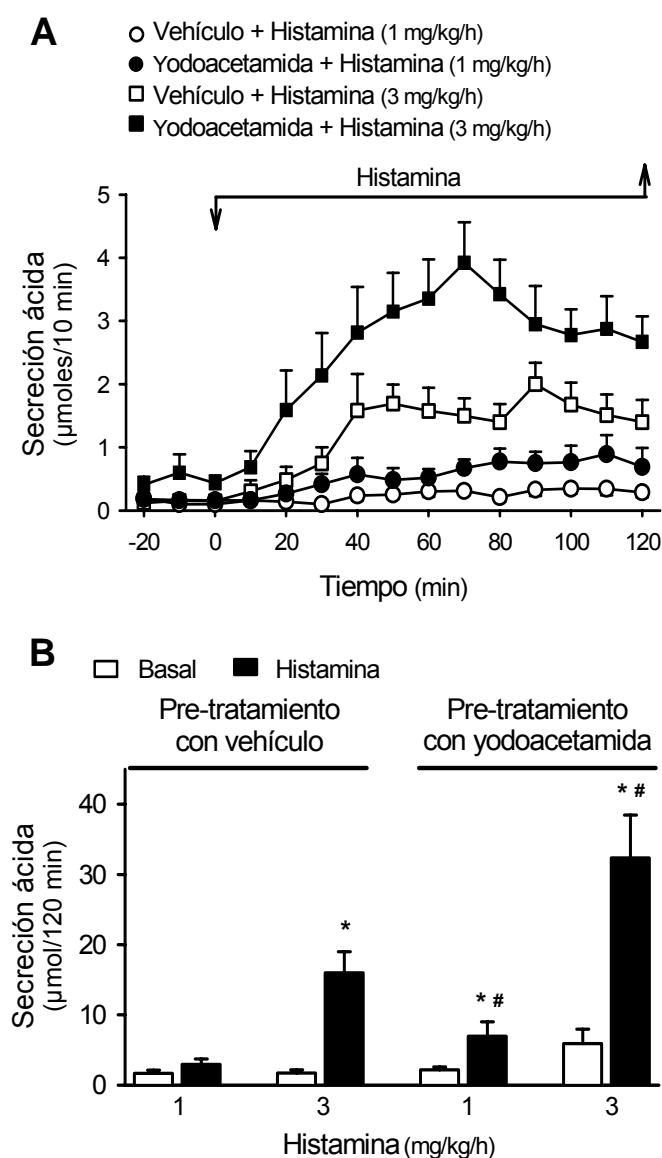


Figura IV.1.7. Efecto del pretratamiento con yodoacetamida sobre la respuesta secretora a histamina. Tras un tratamiento de 6 días con yodoacetamida o vehículo los animales se anestesiaron con uretano y la secreción ácida basal se determinó durante 30 min, a continuación se inició una infusión iv de histamina (1 o 3 mg/kg, durante 2 h). La secreción ácida se determinó a lo largo de todo el experimento a intervalos de 10 min. A: Cambios en la secreción ácida en función del tiempo. B: Secreción ácida acumulada ($\mu\text{moles}/120$ min). Los datos representan la media \pm SEM de 6-7 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs basal; #: $P < 0.05$ vs respuesta secretora a histamina en los animales tratados con vehículo y la misma dosis de histamina (ANOVA).

1.2.6 - Efecto del cromoglicato sódico sobre la secreción ácida estimulada con pentagastrina o histamina

El pretratamiento con cromoglicato sódico previno la respuesta hipersecretora a la pentagastrina observada en los animales tratados con yodoacetamida [cromoglicato sódico: 6.90 ± 1.39 $\mu\text{moles}/120$ min, $n=8$; $P < 0.05$ vs vehículo del cromoglicato sódico: 14.40 ± 2.77 $\mu\text{moles}/120$ min, $n=9$; $F(11,84)=5.249$, $P < 0.001$; Fig. IV.1.8]. Por el contrario, en animales tratados con vehículo, el cromoglicato sódico no modificó la respuesta secretora a la pentagastrina (6.93 ± 1.40 $\mu\text{moles}/120$ min, $P > 0.05$ vs vehículo del cromoglicato sódico: 5.20 ± 0.75 $\mu\text{moles}/120$ min; $n=7-8$; Fig. IV.1.8).

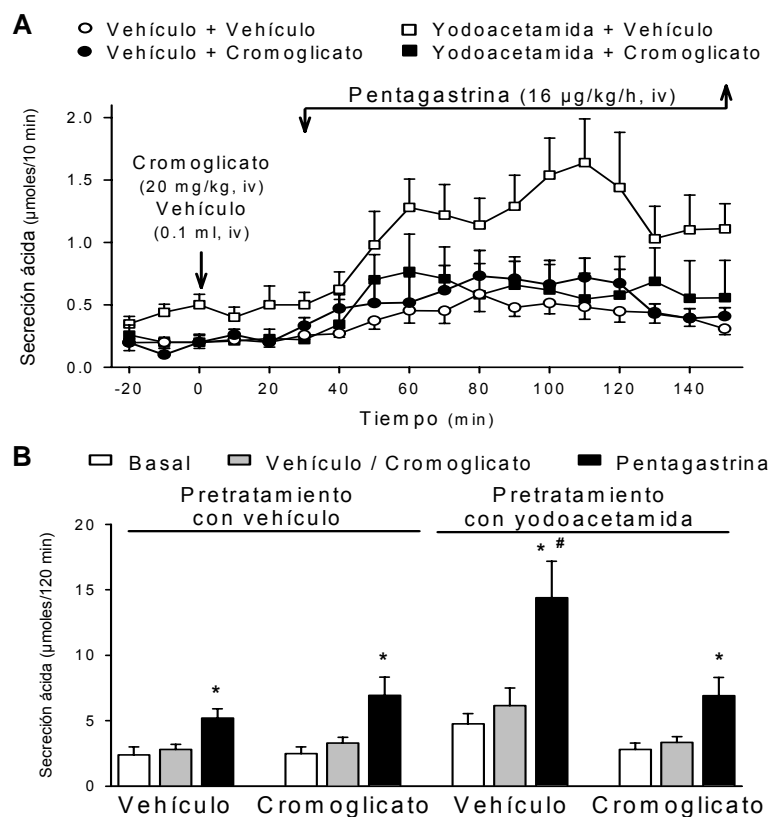


Figura IV.1.8. Efecto del cromoglicato sódico sobre la respuesta secretora a pentagastrina. Tras un tratamiento de 6 días con yodoacetamida o con vehículo, los animales se anestesiaron con uretano y la secreción ácida gástrica basal se determinó durante 30 min. A continuación, se administró el estabilizante de los mastocitos, cromoglicato sódico ($20 \text{ mg}/\text{kg}$, iv), y a los 30 min se inició la infusión de pentagastrina ($16 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$, iv, durante 2h). La secreción ácida se determinó a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento. A: Cambios en la secreción ácida en función del tiempo. B: Secreción ácida acumulada ($\mu\text{moles}/120$ min). Los datos representan la media \pm SEM de 7-9 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs basal o vehículo/cromoglicato; #: $P < 0.05$ vs respuesta secretora a pentagastrina en los demás grupos experimentales (ANOVA).

De forma similar, el pretratamiento con cromoglicato sódico también previno la respuesta hipersecretora asociada a la histamina en los animales tratados con yodoacetamida [cromoglicato sódico: 6.30 ± 1.02 $\mu\text{moles}/120$ min, $n=5$; $P < 0.05$ vs vehículo del cromoglicato sódico: 23.91 ± 5.54 $\mu\text{moles}/120$ min, $n=5$; $F(11,36)=10.107$, $P < 0.001$; Fig. IV.1.9]. En animales tratados con el vehículo de la yodoacetamida, el cromoglicato sódico no afectó la respuesta secretora inducida por histamina (cromoglicato sódico: 9.81 ± 2.16 $\mu\text{moles}/120$ min; vehículo: 11.47 ± 3.02 $\mu\text{moles}/120$ min, $n=3$, Fig. IV.1.9).

El cromoglicato sódico, por si mismo, no modificó la secreción ácida gástrica basal en ninguno de los grupos experimentales (Figs. IV.1.8 y IV.1.9).

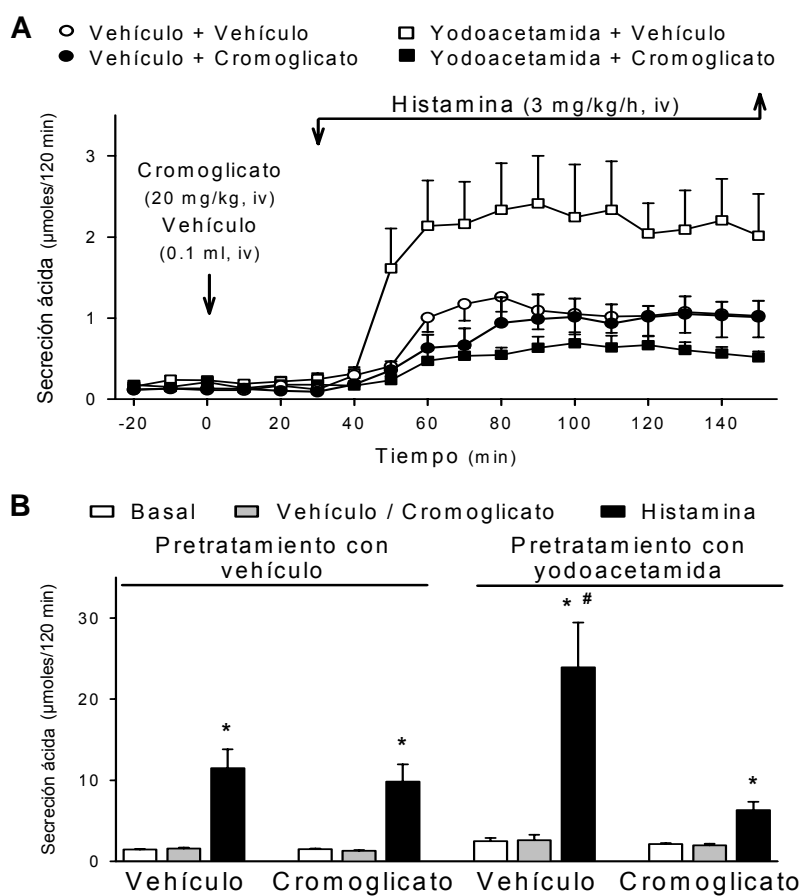


Figura IV.1.9. Efecto del cromoglicato sódico sobre la secreción ácida gástrica estimulada por histamina. El protocolo experimental es igual al descrito en la figura IV.1.8, pero en este caso, la secreción ácida se estimuló con histamina (3 mg/kg/h, iv, durante 2 h). A: Cambios en la secreción ácida en función del tiempo en animales tratados con yodoacetamida o con vehículo. B: Valores de secreción ácida ($\mu\text{mol}/120$ min) durante el periodo basal y tras la estimulación con histamina. Los datos representan la media \pm SEM de 3-7 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs basal; # $P < 0.05$ vs respuesta secretora a la histamina en los demás grupos experimentales (ANOVA).

1.2.7 - Efecto de la indometacina sobre la secreción ácida estimulada con pentagastrina o histamina

En animales tratados con yodoacetamida, la indometacina aumentó la respuesta secretora a pentagastrina en un 80% con respecto a los animales tratados con vehículo [indometacina + pentagastrina: 26.75 ± 2.45 μ moles/120 min, $n=5$; $P < 0.05$ vs vehículo de indometacina + pentagastrina: 14.75 ± 1.58 μ moles/120 min, $n=4$; $F(11,36)=53.712$, $P < 0.001$; Fig. IV.1.10]. Por el contrario, en animales tratados con vehículo de yodoacetamida, la indometacina no modificó la respuesta secretora a pentagastrina (vehículo de indometacina: 4.50 ± 0.35 μ moles/120 min, $n=3$; indometacina: 6.18 ± 1.08 μ moles/120 min, $n=4$; Fig. IV.1.10).

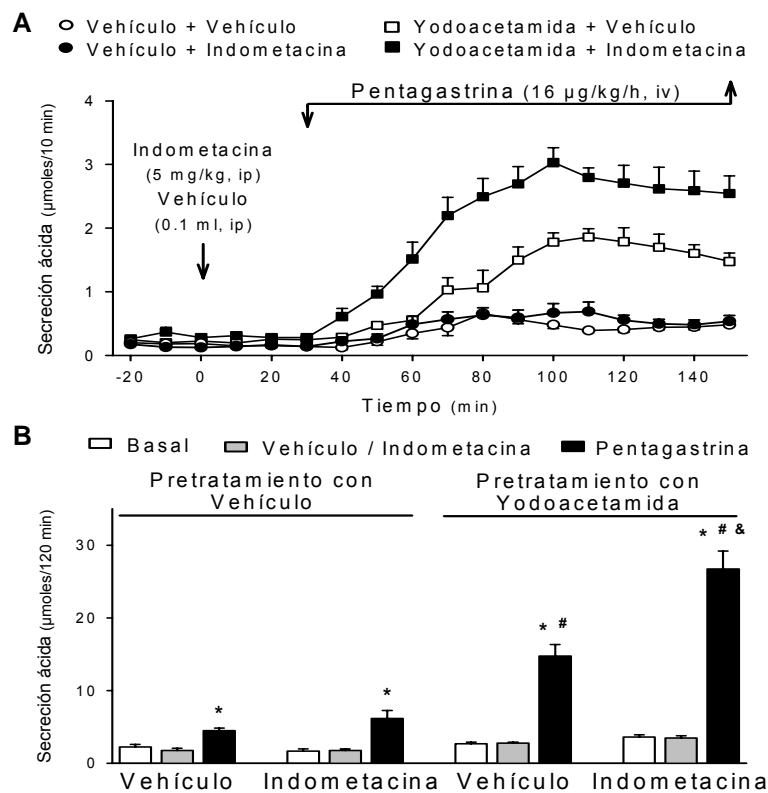


Figura IV.1.10. Efecto de la indometacina sobre la respuesta secretora a pentagastrina. Tras un tratamiento de 6 días con yodoacetamida o con vehículo, los animales se anestesiaron con uretano y la secreción ácida gástrica basal se determinó durante 30 min. A continuación, se administró indometacina (5 mg/kg, ip) y 30 min después pentagastrina (16 μ g/kg/h, iv, 2 h). La secreción ácida se determinó a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento. A: Cambios en la secreción ácida en función del tiempo. B: Secreción ácida acumulada (μ mol/120 min). Los datos representan la media \pm SEM de 3-5 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs basal o vehículo/indometacina; #: $P < 0.05$ vs respuesta a pentagastrina en animales pretratados con vehículo; &: $P < 0.05$ vs respuesta a pentagastrina en animales tratados con yodoacetamida y vehículo de indometacina (ANOVA).

Respuestas similares se observaron cuando la secreción se estimuló con histamina. En animales tratados con yodoacetamida, la indometacina aumentó la respuesta secretora a histamina hasta un valor de 37.79 ± 2.46 $\mu\text{moles}/120$ min [n=6; $P < 0.05$ vs vehículo de indometacina + histamina: 16.86 ± 0.87 $\mu\text{moles}/120$ min, n=4; $F(11,36)=87.961$, $P < 0.001$, Fig IV.1.11]. Sin embargo, en animales tratados con el vehículo de yodoacetamida la indometacina no modificó la respuesta secretora a histamina (vehículo: 8.05 ± 1.36 $\mu\text{moles}/120$ min; indometacina: 8.64 ± 0.89 $\mu\text{moles}/120$ min; n=3 para cada grupo, Fig. IV.1.11).

La indometacina, por si misma, no modificó la secreción ácida gástrica basal en ninguno de los grupos experimentales (Figs. IV.1.10 y IV.1.11).

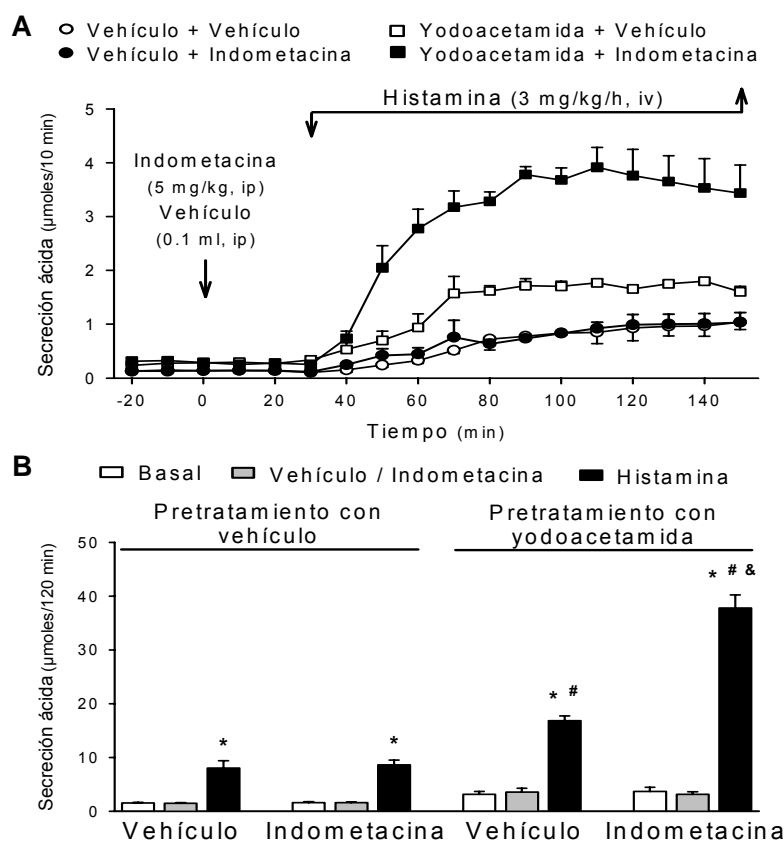


Figura IV.1.11. Efecto de la indometacina sobre la respuesta secretora a histamina. El protocolo experimental es el mismo al descrito en la figura IV.1.10, pero en este caso, la secreción se estimuló con histamina (3 mg/kg/h, iv, durante 2 h). La secreción ácida se registró a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento. A: Cambios en la secreción ácida en función del tiempo. B: Secreción ácida acumulada ($\mu\text{mol}/120$ min). Los datos representan la media \pm SEM de 3-6 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs basal o vehículo/indometacina. #: $P < 0.05$ vs respuesta secretora de histamina en animales pretratados con vehículo de yodoacetamida. &: $P < 0.05$ vs respuesta secretora a histamina en animales tratados con yodoacetamida e indometacina (ANOVA).

1.3 - Discusión

La gastritis es una alteración frecuente en estados fisiopatológicos que cursan con alteraciones en la secreción, la motilidad y/o la sensibilidad gástrica. Numerosos estudios se han dedicado a la caracterización de la gastritis de origen infeccioso, tanto asociada a la presencia de *H. pylori* como de otros agentes. Sin embargo, existen pocos estudios que caractericen las alteraciones fisiopatológicas asociadas a gastritis de origen no infeccioso. La mayoría de estos estudios utilizan como modelos de inflamación agentes irritantes (AINEs, alcohol, etc), que basan su acción inflamatoria en la inducción de lesiones, normalmente macroscópicas, en la mucosa gástrica (Ablin *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2000). Sin embargo, la presencia de gastritis en ausencia de infecciones microbianas y sin lesiones orgánicas aparentes es también frecuente. A pesar de ello, pocos estudios se han centrado en la caracterización de las alteraciones fisiopatológicas propias de estos procesos.

En este trabajo se han estudiado las alteraciones en las funciones motora y secretora en un modelo de gastritis subcrónica en el ratón inducida por una exposición de la mucosa gástrica a yodoacetamida. La yodoacetamida es un irritante químico que actúa acetilando los grupos sulfhidrilo de moléculas orgánicas (Bielefeldt *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2002). Se ha visto que diferentes compuestos con grupos sulfhidrilo (glutación, algunos aminoácidos,...) juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la mucosa gastrointestinal (Robert *et al.*, 1984; Romano *et al.*, 1992). La acción de la yodoacetamida sobre los mismos alteraría la integridad de la mucosa gastrointestinal generando un estado de inflamación leve sin lesiones orgánicas evidentes. Los resultados obtenidos muestran que, en el ratón, el tratamiento subcrónico con yodoacetamida se asocia a una respuesta inflamatoria moderada, tal y como se aprecia a nivel microscópico, con ausencia de lesiones macroscópicas en la mucosa gástrica. Estos resultados coinciden con observaciones previas en la rata, especie en la cual la exposición a yodoacetamida, adicionada al agua de bebida, induce una gastritis leve caracterizada por un infiltrado inflamatorio moderado en la submucosa y la mucosa gástrica, con ausencia de erosiones o ulceraciones (Barnett *et al.*, 2000; Bielefeldt *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2002). Estos cambios indican el desarrollo de una gastritis leve. Por lo tanto, este modelo de inflamación podría reproducir estados fisiopatológicos en los cuales no se observan alteraciones macroscópicas o incluso microscópicas del estómago.

Las posibles alteraciones en la motilidad gástrica asociadas al efecto de la yodoacetamida se evaluaron a partir del estudio del vaciamiento gástrico de una comida sólida nutritiva. No se observaron diferencias en la tasa de vaciamiento gástrico entre animales tratados con yodoacetamida y los tratados con vehículo. Estos resultados sugieren que, en el ratón, los reflejos neuroendocrinos que modulan la motilidad y el vaciamiento gástricos no están alterados durante la gastritis leve. En humanos infectados con *H. pylori* no se ha observado una correlación entre el vaciamiento gástrico y la presencia de gastritis, y se ha descrito tanto la ausencia de variaciones en

la tasa normal de vaciamiento como la presencia de incrementos o disminuciones de la misma (Chang *et al.*, 1996; Manes y Malfertheiner, 1999; Koskenpato *et al.*, 2000; Chiloiro *et al.*, 2001). De forma similar, algunos estudios en modelos animales de gastritis de origen bacteriano no han logrado demostrar un patrón de cambios consistente en el vaciamiento gástrico, lo que sugiere que existen factores dependientes de la especie o el modelo experimental que son relevantes (Dubois *et al.*, 1991; Duval-Araujo *et al.*, 2000). La relación entre vaciamiento gástrico y gastritis inducida por irritantes químicos no ha sido estudiada. Se sabe que el alcohol, a dosis elevadas (con potencial erosivo sobre la mucosa), inhibe el vaciamiento gástrico, pero este efecto se debe probablemente a sus acciones directas sobre mecanismos neuroendocrinos de control más que a efectos relacionados con una posible respuesta inflamatoria (Izbéki *et al.*, 2002). El vaciamiento gástrico también se ha relacionado con la ingesta de alimento. Así, se ha sugerido que el retraso en el vaciamiento prolongaría la distensión gástrica aumentando las señales de saciedad que llevan a una inhibición en la ingesta (Schwartz *et al.*, 1991). Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que el descenso observado en la ingesta, en los animales tratados con yodoacetamida, no guarda relación con variaciones en la tasa de vaciamiento gástrico. Esta observación sugiere que ambos factores son independientes, tal y como previamente se ha descrito en otras situaciones experimentales, como en el caso de saciedad inducida por leptina (Barrachina *et al.*, 1997a, b). Estudios previos realizados en la rata sugieren que la gastritis inducida por yodoacetamida cursa con un estado de hiperalgesia asociado a la distensión gástrica (Ozaki *et al.*, 2002; Bielefeldt *et al.*, 2002). Este estado de hiperalgesia podría alterar la acomodación gástrica al alimento, activar incluso vías nociceptivas, e inducir señales de saciedad que disminuirían la ingesta; pudiendo ser, por lo tanto, la causa de los cambios observados en este parámetro en los animales tratados con yodoacetamida. En estas condiciones, se podrían observar cambios en la ingesta en ausencia de alteraciones en el vaciamiento gástrico. La disminución en la ingesta se acompañó, además, de una pérdida de peso corporal, coincidiendo con lo observado en otros modelos de gastritis (Dial *et al.*, 1996; Bielefeldt *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2002).

En los animales tratados durante 6 días con yodoacetamida, se observó que la secreción ácida gástrica basal era superior a la de los animales tratados con vehículo, o a la de animales sin ningún tipo de tratamiento. Este resultado contrasta con estudios previos que muestran que en ratas con gastritis inducida por yodoacetamida no se observan cambios en la secreción basal (Barnett *et al.*, 2000). Estas diferencias pueden ser debidas a factores interespecíficos o al grado de desarrollo de la gastritis. En el estudio de Barnett *et al.* (2000) los animales recibieron yodoacetamida en el agua de bebida durante 5 días, mientras que en el presente estudio los animales tuvieron una doble exposición al agente irritante (administración intragástrica y adición al agua de bebida) durante un periodo de 6 días. Puesto que los animales tratados con yodoacetamida ingerían menos agua que los controles, la yodoacetamida se administró también por vía intragástrica. Con este procedimiento se evitan diferencias en la ingesta

de irritante y se asegura una mínima exposición al mismo en todos los animales; lo que, probablemente, tiende a reducir la variabilidad en la respuesta inflamatoria y permite determinar de una forma más eficaz alteraciones de tipo funcional. El estudio mencionado en ratas no considera estos factores con lo cual la respuesta inflamatoria puede ser más heterogénea y por lo tanto dificultar la caracterización de ciertos cambios funcionales, como puede ser la alteración de la secreción basal, que como se desprende de los resultados obtenidos presenta una gran variabilidad en los animales tratados con yodoacetamida.

Los cambios observados en la secreción basal podrían reflejar también una alteración en los mecanismos de regulación de la secreción ácida dependientes de la somatostatina. El uretano es un anestésico que se caracteriza porque estimula la síntesis y liberación de somatostatina (Yang *et al.*, 1990). Debido a esta liberación de somatostatina endógena los animales anestesiados con uretano muestran unos niveles de secreción basal bajos comparados con animales conscientes (Yang *et al.*, 1990; Martínez *et al.*, 1998; Kawakubo *et al.*, 1999). Varios estudios han demostrado que durante la gastritis de origen bacteriano, se liberan un gran número de mediadores inflamatorios que tienden a inhibir la actividad y/o a reducir el número de células D en la mucosa gástrica (Zavros *et al.*, 2002b, c), lo que desencadenaría un estado relativo de hipersecreción. Aunque en este estudio no se han caracterizado los cambios en los niveles de somatostatina o en la población de células D, los resultados obtenidos sugieren que este mecanismo también podría operar durante la gastritis inducida químicamente. Como consecuencia, durante la inflamación, alteraciones en el número y/o la funcionalidad de las células D podrían resultar en una liberación disminuida de somatostatina en respuesta al uretano, dando como resultado una secreción basal relativamente elevada.

Por otro lado, se observó que la respuesta secretora a la pentagastrina y a la histamina estaba incrementada en los animales con gastritis con respecto a los controles. Este cambio en la respuesta a secretagogos coincide con estudios previos en humanos infectados con *H. pylori* (El-Omar *et al.*, 1993, 1995) y en ratas con gastritis inducida con yodoacetamida (Barnett *et al.*, 2000). Esta respuesta hipersecretora podría ser debida a: i) un aumento en la producción de gastrina, probablemente relacionado con una disminución de la somatostatina antral; ii) un incremento en la respuesta a la gastrina a nivel de la célula parietal; y/o iii) un aumento en el número o la respuesta funcional de los receptores de histamina. En general, estos cambios parecen depender de una serie de mediadores inflamatorios locales liberados durante la inflamación, tal y como sugieren experimentos realizados en ratones con gastritis inducida por un sobrecrecimiento bacteriano (Zavros *et al.*, 2002a, c). El aumento de la respuesta secretora gástrica a la pentagastrina y la histamina podría ser consecuencia de una sensibilización de la vía gastrina-histamina-célula parietal, o bien asociarse a un efecto directo de la gastrina sobre las células parietales. Sin embargo, los efectos de la pentagastrina fueron bloqueados con el antagonista H₂, cimetidina, sugiriendo que la respuesta hipersecretora a esta hormona no se debe a un efecto directo de la misma

sobre la célula parietal, sino que está mediada por la liberación de histamina de células ECL.

A partir de los estudios realizados no se puede descartar que la alteración de las respuestas secretoras pueda estar también relacionada con cambios en la poblaciones de células ECL y/o parietales. Un aumento en el número de células ECL y/o parietales resultaría en un incremento de las respuestas secretoras similar al observado en estos estudios. Para determinar cambios en estas poblaciones celulares serían necesarios estudios exhaustivos mediante técnicas inmunohistoquímicas, análisis morfométrico y/o citometría de flujo. Estudios previos han descrito un aumento en el número de células parietales en el estómago de ratones infectados con gastritis asociada a un sobrecrecimiento bacteriano (Zavros *et al.*, 2002b). Sin embargo, en el mismo estudio, los cambios observados en la población de células parietales se correlacionaban con la presencia de inflamación pero no con la secreción ácida. Además, es probable que los cambios en las poblaciones de células ECL y parietales sean característicos de procesos inflamatorios crónicos. Estudios en ratones demuestran que se necesitan alrededor de 4 meses de exposición al agente infeccioso, y por lo tanto de evolución del proceso inflamatorio, para observar cambios consistentes en el número de células (Dial *et al.*, 2000). Por lo tanto, en las condiciones experimentales seguidas en este estudio, con una inflamación subcrónica desarrollada en un periodo de 6 días, es improbable que se observen cambios de este tipo.

Aunque en el estómago la histamina es producida mayoritariamente por las células ECL se han descrito otras fuentes de histamina que podrían contribuir a la estimulación de la secreción ácida. Se ha demostrado que durante el proceso de activación mastocitaria se liberan gran número de mediadores inflamatorios, entre los cuales se encuentra la histamina. Además, los mastocitos se han implicado en los mecanismos fisiopatológicos de varias patologías gastrointestinales, tales como la úlcera péptica y la enfermedad inflamatoria intestinal (Bechi *et al.*, 1993; Charalabos *et al.*, 1993; Whittle, 1993; Söderholm *et al.*, 2002). El examen histológico del estómago de los animales tratados con yodoacetamida reveló la presencia de un infiltrado inflamatorio difuso, principalmente en la submucosa, y un aumento en el número de mastocitos, identificados mediante una tinción selectiva (azul de toluidina). Estas observaciones sugerirían que la histamina procedente de los mastocitos podría contribuir a la elevada secreción basal y también a la respuesta hipersecretora asociada a la pentagastrina y a la histamina. Varios estudios muestran que los mastocitos expresan receptores para gastrina y responden a la estimulación con esta hormona liberando histamina (Tharp *et al.*, 1984; Plebani *et al.*, 1995). Además, se han descrito mecanismos por los cuales la histamina es capaz de autoregular su propia liberación en mastocitos (Bent *et al.*, 1991; Ohkubo *et al.*, 1994). En su conjunto, estas observaciones sugieren que durante la gastritis, gastrina e histamina, además de actuar sobre células ECL y parietales, podrían actuar sobre mastocitos induciendo una liberación adicional de histamina y, por lo tanto, incrementando la respuesta secretora gástrica. De acuerdo con esta hipótesis, el pretratamiento con el estabilizador de mastocitos, cromoglicato

sódico, revirtió la respuesta hipersecretora, tanto a histamina como a gastrina, observada en los animales tratados con yodoacetamida, sin modificar la acción de los secretagogos en animales tratados con vehículo. Sin embargo, contrastando con estas observaciones, la perfusión intragástrica con compuesto 48/80, un degranulador de mastocitos, no alteró la secreción ácida gástrica basal en los animales tratados con yodoacetamida.

Estudios previos han demostrado que durante la inflamación gástrica se produce un aumento en los niveles de expresión de la enzima COX-2 y en la síntesis de PGs, principalmente de PGE₂ (Gretzer *et al.*, 1998, 2001; Barnett *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos muestran que la inhibición de la síntesis de PGs con indometacina no modificó la secreción basal en ninguno de los grupos experimentales. La falta de efecto de la indometacina en animales tratados con vehículo coincide con estudios previos en la rata, y sugiere que las PGs no juegan un papel esencial regulando la secreción ácida gástrica basal en condiciones normales (Yoneda y Taché, 1993; Martínez *et al.*, 2002). Sin embargo, la ausencia de efecto de la indometacina sobre la secreción basal en los animales con gastritis contrasta con resultados previos obtenidos en ratas con gastritis inducida por el mismo irritante o en ratones con gastritis crónica asociada a la infección con *H. pylori* (Barnett *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2001). En ratones con gastritis crónica asociada a la presencia de *H. Pylori* se observó un aumento en los niveles de PGs en la mucosa gástrica, relacionado con una sobreexpresión de la COX-2, sugiriendo que la activación de la vía COX-2/PGE₂ podría ser, al menos parcialmente, responsable de los cambios en la secreción observados en estos animales (Xiao *et al.*, 2001). Las diferencias entre estas observaciones y los resultados obtenidos en este estudio podrían ser debidas al modelo experimental empleado (gastritis química vs infecciosa) o a características especie-específicas (rata vs ratón). Por otro lado, el pretratamiento con indometacina aumentó significativamente la respuesta secretora a pentagastrina e histamina en los animales tratados con yodoacetamida. Estos resultados coinciden con estudios previos en ratas con gastritis de origen químico que demuestran que la respuesta secretora a pentagastrina estaba aumentada tras el bloqueo de la síntesis de PGs (Barnett *et al.*, 2000). Aunque en dicho trabajo no se determinó si las acciones de la histamina estaban también moduladas por PGs esta hipótesis es muy plausible, ya que los efectos secretores de la gastrina son mayoritariamente dependientes de histamina, como demuestra el completo bloqueo de las acciones de la pentagastrina con antagonistas H₂. En su conjunto, estas observaciones sugieren que, en el ratón, las PGs participan en la modulación de las respuesta secretoras gástricas durante estados inflamatorios. A través de su acción, las PGs minimizarían las respuestas hipersecretoras a los diferentes estimulantes, disminuyendo la producción excesiva de ácido y manteniendo la integridad de la mucosa gástrica.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que en el ratón la irritación química de la mucosa gástrica con yodoacetamida produce una gastritis leve caracterizada por la presencia de un infiltrado inflamatorio difuso, con un incremento en el número de mastocitos en la submucosa y sin lesiones aparentes de la mucosa. La gastritis no modificó la tasa de vaciamiento gástrico pero alteró de forma significativa la secreción ácida. La secreción basal así como la respuesta a los secretagogos gastrina e histamina estuvo aumentada en animales con gastritis respecto a los controles. Los cambios en la secreción basal pueden deberse a alteraciones en el sistema de control gastrina-somatostatina, como sugieren estudios en gastritis de origen infeccioso, mientras que las PGs no parecen estar implicadas. La respuesta hipersecretora a la gastrina y la histamina fue bloqueada por el estabilizante de los mastocitos, cromoglicato sodico, sugiriendo una implicación de este tipo celular en las alteraciones observadas. En animales con gastritis, el pretratamiento con indometacina aumentó las respuestas secretoras tanto a gastrina como a histamina, sugiriendo que las PGs podrían actuar reduciendo las respuestas hipersecretoras para minimizar la exposición al ácido de la mucosa gástrica.

Por lo tanto, durante la gastritis de origen químico se darían alteraciones en los mecanismos de control de la secreción ácida gástrica que implicarían: i) una respuesta aumentada a secretagogos, en parte asociada a la activación de células inflamatorias (mastocitos); y ii) un mecanismo inhibitorio compensatorio dependiente de PGs.

Este modelo de gastritis de origen químico en el ratón puede ser de interés para caracterizar alteraciones en los mecanismos de control de la secreción ácida gástrica en estados fisiopatológicos asociados a la inflamación leve, así como para la identificación y caracterización de dianas de interés terapéutico en condiciones fisiopatológicas en las cuales no hay infecciones de origen bacteriano asociadas o en las que no se pueden detectar alteraciones orgánicas, como es el caso de la dispepsia funcional.

2 - Secreción Ácida y Vaciamiento Gástrico en Ratones Carentes del Receptor de Tipo 2 de la Somatostatina

2.1 - Antecedentes y objetivos

La somatostatina es el principal inhibidor fisiológico de la secreción ácida gástrica, actuando principalmente a través de un mecanismo paracrino. En el estómago, la somatostatina es sintetizada y liberada por células de tipo D, localizadas tanto en el antro como en el fundus. Ambos tipos celulares responden a diferentes estímulos (luminales y no luminales) sintetizando y secretando somatostatina, que actúa mediante un mecanismo paracrino tanto sobre células ECL y células G como sobre células parietales de la mucosa. De esta manera, el efecto inhibitorio sobre la secreción ácida resulta de la acción directa del péptido sobre las células parietales y de la acción indirecta sobre la síntesis y secreción de gastrina y de histamina (Lloyd y Debas, 1994; Lloyd y Walsh, 1994; Martínez, 2002).

Además de sus acciones sobre la secreción varios estudios sugieren que la somatostatina es un regulador fisiológico de la motilidad gastrointestinal, tanto en estados postprandiales como durante los periodos interdigestivos. Los efectos de la misma sobre la motilidad gástrica son variables. Estudios funcionales realizados en la especie humana han demostrado que la administración periférica de somatostatina o de su análogo, SMS 201-995, puede tanto estimular como inhibir el vaciamiento gástrico (Johansson *et al.*, 1978; Fuessl *et al.*, 1987; Von der Ohe *et al.*, 1995; Okamoto *et al.*, 1997). Los estudios en otras especies son menos frecuentes y sólo en un caso se ha observado que el SMS 201-995 inhibe el vaciamiento gástrico en la rata (Smedh *et al.*, 1999).

Las acciones biológicas de la somatostatina en sus células diana están mediadas por la interacción con receptores específicos. Hasta el momento se han descrito cinco tipos diferentes de receptores (SSTR1-5) (Patel, 1999). Estudios recientes, empleando ensayos de protección de ribonucleasas y técnicas de RT-PCR, han detectado la presencia en el estómago de los cinco subtipos de receptores (Bruno *et al.*, 1993; Raulf *et al.*, 1994). La somatostatina tiene una afinidad similar por todos ellos (Patel, 1999) y, por lo tanto, la caracterización funcional de los mismos depende del empleo de agonistas y antagonista específicos. Hasta el momento, se han desarrollado tres tipos de agonistas de receptores de somatostatina: i) análogos peptídicos, no selectivos, de la somatostatina; de ellos, el más representativo es el SMS 201-995; ii) análogos peptídicos de la somatostatina con afinidad relativamente selectiva por los diferentes subtipos de receptores; y iii) agonistas no peptídicos con elevada afinidad por los diferentes subtipos de receptores. Usando algunos de estos análogos el control de la secreción ácida dependiente de somatostatina se ha vinculado al receptor SSTR2 (Martínez, 2002), aunque el papel del resto de subtipos no ha sido caracterizado con detalle.

Los mecanismos fisiológicos de regulación de la secreción ácida gástrica, han sido ampliamente estudiados en varias especies animales (fundamentalmente en rata y perro) y en menor grado en la especie humana. Durante los últimos años, asociado a los avances en genética y biología molecular, el ratón se ha convertido en un importante modelo animal en investigación biomédica. Sin embargo, apenas existen estudios caracterizando la función gástrica en el ratón y en su mayoría se trata de estudios *in vitro*.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo del siguiente estudio ha sido caracterizar, *in vivo*, la implicación relativa de los receptores de la somatostatina en la regulación de la secreción ácida y del vaciamiento gástrico en el ratón. Para ello, se ha empleado un modelo animal modificado genéticamente, un ratón carente del receptor de tipo 2 de la somatostatina (SSTR2 *-/-*), combinado con el empleo de agonistas y antagonistas de los diferentes subtipos de receptores. En la mayoría de modelos animales con manipulaciones genéticas empleados para el estudio de la función gastrointestinal se han descrito cambios morfológicos asociados a los cambios genotípicos y fenotípicos (Samuelson y Hinkle, 2003). Por lo tanto, además de los cambios funcionales mencionados, se han estudiado los cambios morfológicos en el estómago asociados a la falta de receptor SSTR2, mediante técnicas estándar de histología, así como los cambios en las poblaciones de células con inmunoreactividad de tipo gástrica (células G) y somatostatina (células D), mediante técnicas de inmunohistoquímica.

2.2 - Resultados

2.2.1 - Histología del estómago

A nivel macroscópico no se observaron diferencias ni de morfología ni de tamaño entre los estómagos de animales SSTR2 *-/-* y SSTR2 *+/+*. El peso del estómago fue similar en ambos grupos (SSTR2 *+/+*: 186±8 mg; SSTR2 *-/-*: 201±5 mg; n=20 para cada grupo; P=0.70); lo que representa una proporción similar con respecto al peso corporal total (SSTR2 *+/+*: 22.9±0.3 g; SSTR2 *-/-*: 23.5±0.4 g). En ningún caso se observaron lesiones macroscópicas en la mucosa gástrica o signos de inflamación. El examen histológico de múltiples secciones de fundus y antro gástricos confirmó la ausencia de lesiones en la superficie de la mucosa o de inflamación (Fig. IV.2.1). El análisis morfométrico de las preparaciones histológicas, tanto de fundus como de antro, mostró un grado de desarrollo similar del epitelio, la submucosa y la capa muscular en ambos grupos de animales (Fig. IV.2.1 ; tabla IV.2.1).

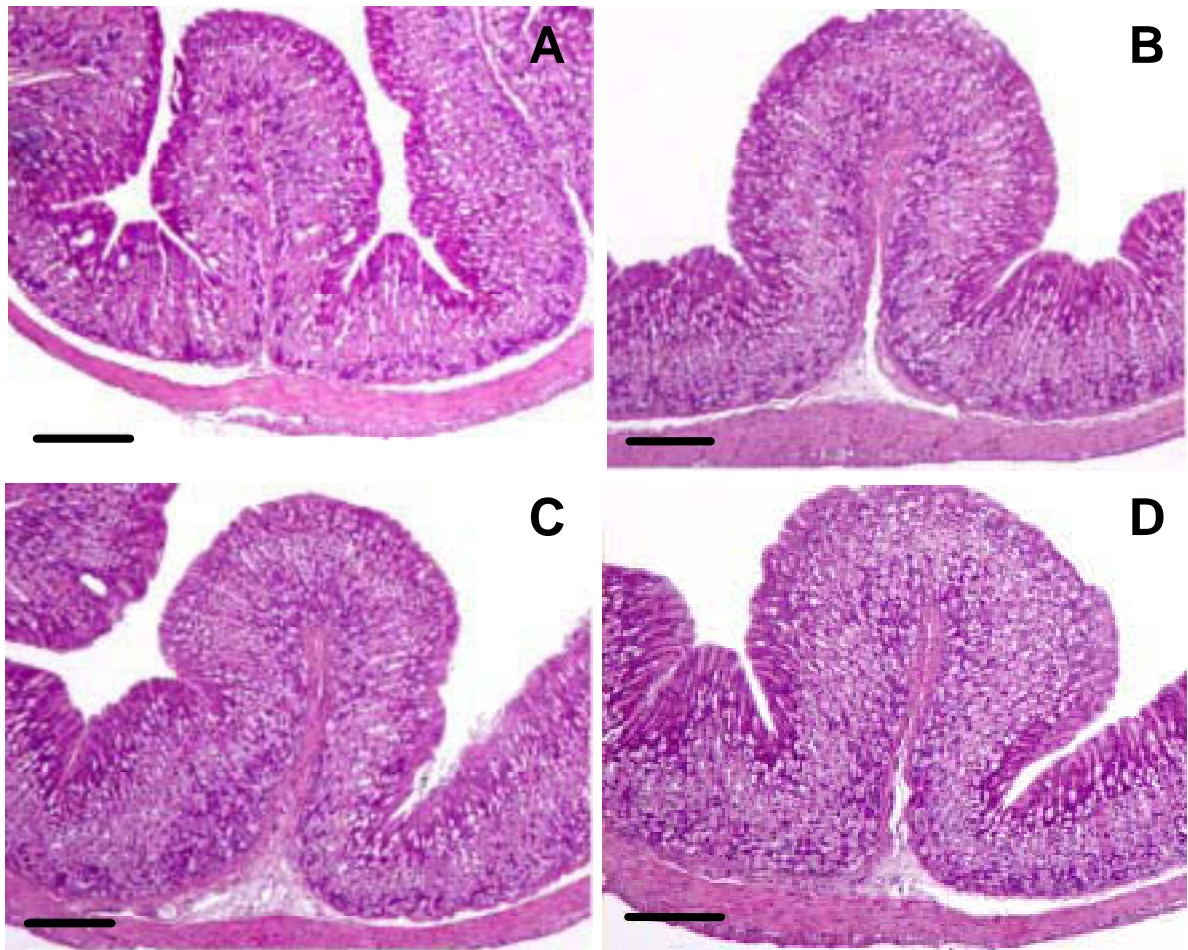


Figura IV.2.1. Fotomicrografías representativas de secciones histológicas de fundus (A, B) y antro (C, D) gástricos teñidas con hematoxilina-eosina, correspondientes a un animal de tipo salvaje (SSTR2 +/+; A, C) y a un animal SSTR2 -/- (B, D). Barra: 200 μ m.

Tabla IV.2.1 - Morfometría gástrica en ratones SSTR2 +/+ y SSTR2 -/-.

	Antro (μ m) ^a			Fundus (μ m) ^a		
	Mucosa	Submucosa	Muscular	Mucosa	Submucosa	Muscular
SSTR2 +/+	283 \pm 10	73 \pm 10	121 \pm 14	301 \pm 16	68 \pm 10	119 \pm 10
SSTR2 -/-	276 \pm 5	63 \pm 8	137 \pm 12	306 \pm 12	67 \pm 5	122 \pm 14
N	6			6		

^aLos datos corresponden al grosor de la mucosa, la submucosa y la capa de músculo, expresado como media \pm SEM. El grosor de las diferentes áreas se determinó a partir de 10 medidas, en zonas localizadas al azar de múltiples secciones de antro y fundus gástrico teñidas con hematoxilina-eosina y correspondientes a 6 animales para cada grupo. El análisis morfométrico se realizó a partir de imágenes digitalizadas, mediante el programa informático ImageJ.

2.2.2 - Inmunohistoquímica para gastrina y somatostatina

En secciones de antro gástrico de animales SSTR2 +/+, mantenidos *ad libitum*, incubadas con el anticuerpo anti-gastrina, CURE n° 05109.1, se observaron abundantes células inmunoreactivas, con una distribución homogénea en la parte inferior de las glándulas de la mucosa (9.8 ± 1.9 células inmunoreactivas/campo; Figs. IV.2.2 y IV.2.3). En animales SSTR2 -/-, mantenidos *ad libitum*, se observó un patrón similar de distribución de la inmunoreactividad de tipo gastrina, con una abundancia de células inmunoreactivas (9.0 ± 0.4 células inmunoreactivas/campo) similar a la observada en animales SSTR2 +/+ (Figs. IV.2.2 y IV.2.3). En animales ayunados durante 18-20 h, la distribución y abundancia de células inmunoreactivas fue similar a la observada para animales mantenidos *ad libitum* (SSTR2 +/+: 10.6 ± 0.6 células inmunoreactivas/campo; SSTR2 -/-: 10.1 ± 0.4 células inmunoreactivas/campo; Fig. IV.2.2). Por el contrario, en muestras de fundus gástrico, sólo en algunas preparaciones se observó ocasionalmente alguna célula con inmunoreactividad, mientras que en la mayoría de ellas la ausencia de células inmunoreactivas fue total, independientemente del estado de los animales o de sus características genéticas (Figs. IV.2.2, IV.2.3).

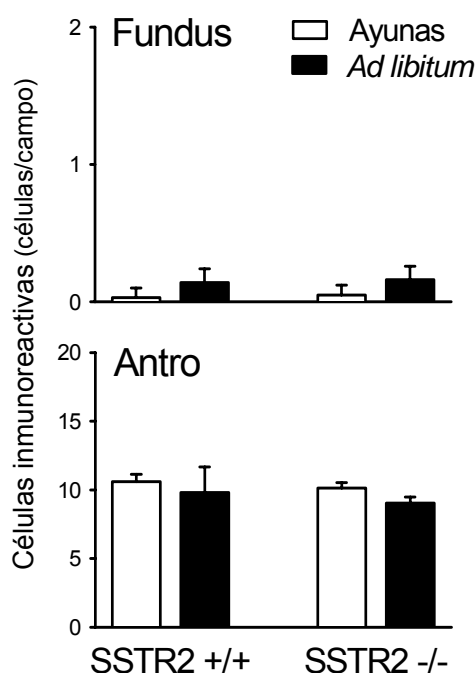


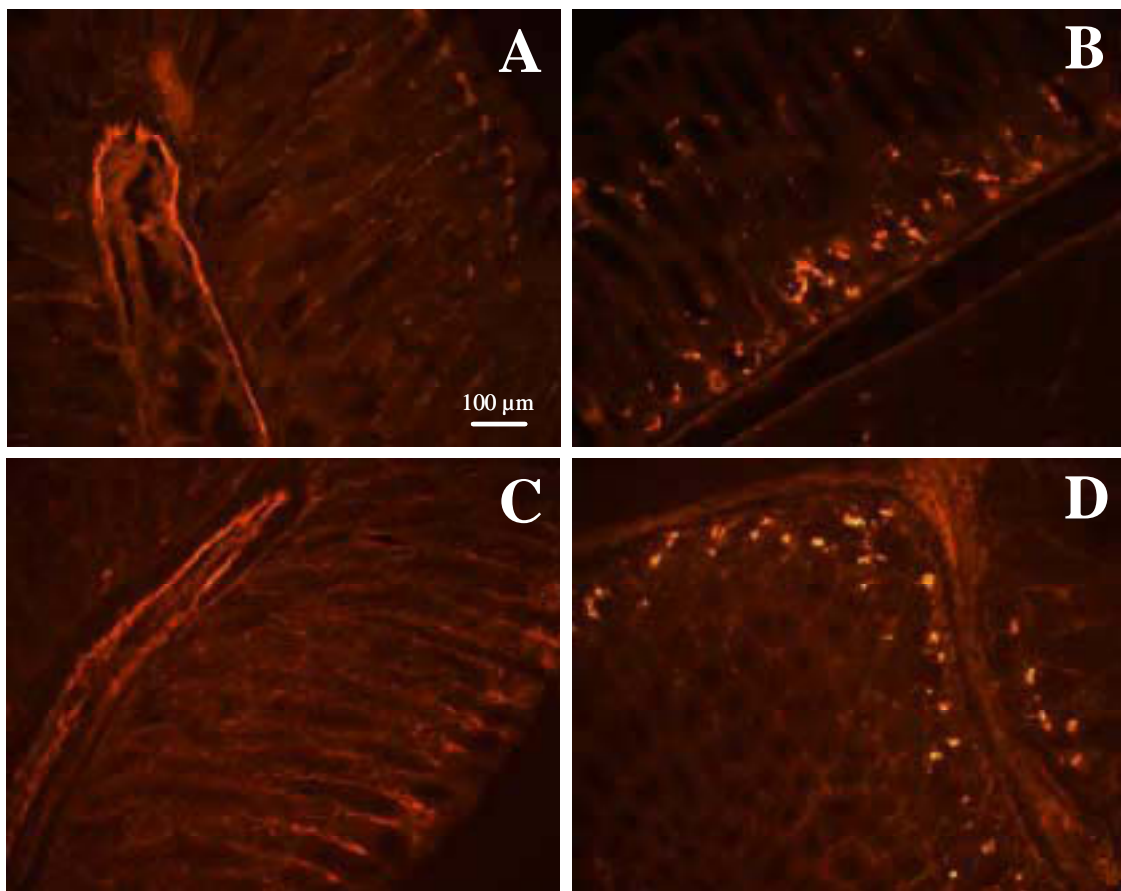
Figura IV.2.2. Abundancia relativa de células con inmunoreactividad de tipo gastrina en el fundus y antro gástricos de animales SSTR2 +/+ y SSTR2 -/- mantenidos *ad libitum* o en ayunas por un periodo de 18-20 h. Los datos corresponden a la media \pm SEM del número de células inmunoreactivas en 5 campo de microscopio (X40) en tres preparaciones para cada área gástrica, obtenidas de 5 animales por grupo.

Figura IV.2.3. (Página opuesta) Secciones representativas de la inmunoreactividad de tipo gastrina en el fundus (A, C) y antro gástricos (B, D) en animales SSTR2 +/+ (A, B) y SSTR2 -/- (C, D) mantenidos *ad libitum*. Nótese la ausencia de inmunoreactividad en el fundus gástrico (A, C) mientras que en antro (B, D) se observan abundantes células con inmunoreactividad de tipo gastrina, localizadas en la parte inferior de las glándulas de la mucosa.

Células con inmunoreactividad de tipo somatostatina se observaron tanto en secciones de fundus como de antro gástricos. En el fundus, el número de células inmunoreactivas fue similar en animales SSTR2 +/+ y SSTR2 -/- mantenidos en ayunas por 18-20 h (Tabla IV.2.2; Fig. IV.2.4). En animales alimentados *ad libitum* el número de células inmunoreactivas se redujo un 80% en los animales SSTR2 +/+ y un 50% en los animales SSTR2 -/- (Tabla IV.2.2; Fig. IV.2.4). Las células inmunoreactivas se distribuyeron preferentemente en la zona media de las glándulas.

En la región antral de animales SSTR2 +/+ mantenidos en ayunas se observaron abundantes células con inmunoreactividad de tipo somatostatina, localizándose predominantemente en la parte inferior de las glándulas. Una distribución similar se observó en animales SSTR2 -/- aunque el número de células fue inferior al observado en animales SSTR2 +/+. De nuevo, en animales *ad libitum* se observó un menor número de células inmunoreactivas, independientemente del genotipo considerado; aunque en este caso el número de células inmunoreactivas se redujo sólo entre un 22% y un 29% con respecto a los valores en animales en ayunas (tabla IV.2.2; Fig. IV.2.4).

En todos los casos, la incubación de los anticuerpos con un exceso de antígeno (gastrina-17 o somatostatina-14) resultó en una pérdida completa de inmunoreactividad, demostrando la especificidad de la misma.



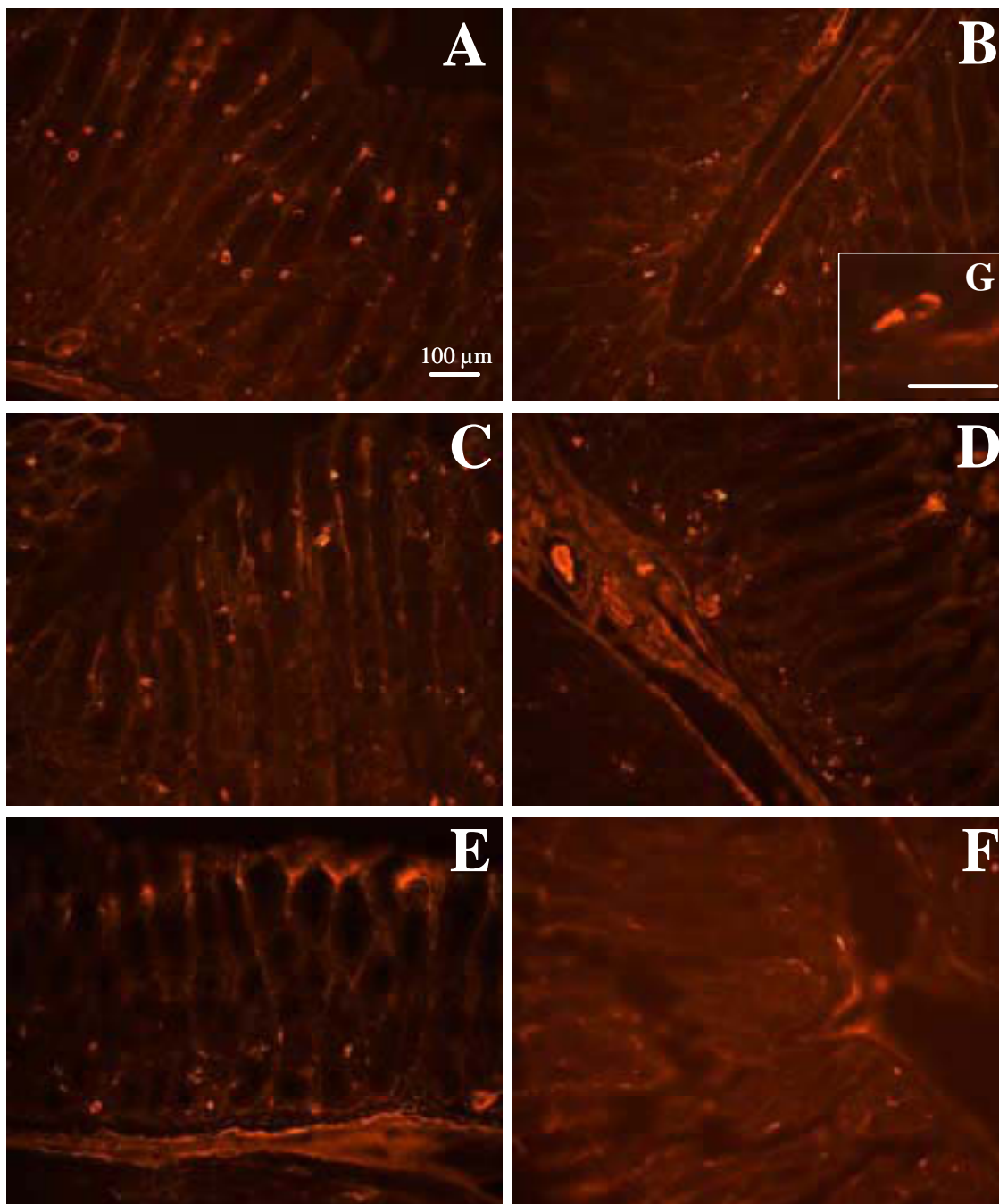


Figura IV.2.4. Secciones representativas de la inmunoreactividad de tipo somatostatina en el fundus (A, C, E) y antro gástricos (B, D, F) en animales SSTR2 $-/-$ ayunados por 18-20 h (A, B) o mantenidos ad libitum (C, D) y en animales SSTR2 $+/+$ mantenidos ad libitum (E, F). Nótese la diferente distribución de la inmunoreactividad en fundus (parte media de las glándulas) y antro (parte inferior de las glándulas). Véase como en los animales mantenidos ad libitum se observa una menor inmunoreactividad en la zona fúndica. La imagen en G muestra en detalle una célula inmunoreactiva de la zona antral, con la típica morfología descrita para las células D (barra: 50 μ m).

Tabla IV.2.2 – Abundancia relativa de células con inmunoreactividad de tipo somatostatina en el fundus y antro gástricos de animales SSTR2 +/+ y SSTR2 -/- alimentados *ad libitum* o en ayunas.

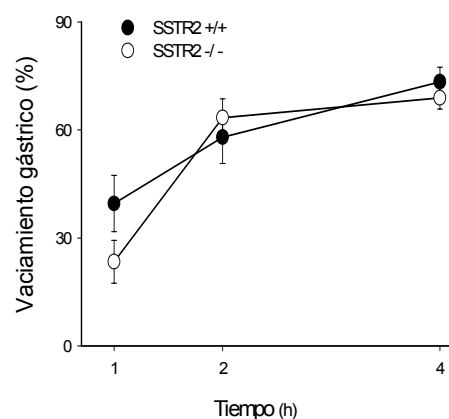
	Fundus		Antro	
	Células inmunoreactivas/campo ^a			
	Ayunas	<i>Ad libitum</i>	Ayunas	<i>Ad libitum</i>
SSTR2 +/+	13.7±3.7	1.9±1.2 #	15.4±2.3	12.0±2.2
SSTR2 -/-	9.7±0.7	5.0±1.7 * #	6.8±1.4 *	4.8±0.5 *
N	5		5	

^aLos datos representan la media±SEM del número de células inmunoreactivas por campo a partir de 5 campos de microscopio (X40) en tres secciones para cada una de las áreas gástricas y el número de animales indicado (N) (15 campos de microscopio por área gástrica y animal). *: P<0.05 vs SSTR2 +/+; #: P<0.05 vs ayuno.

2.2.3 - Vaciamiento gástrico de una comida sólida nutritiva en ratones SSTR2 +/+ y SSTR2 -/-

La tasa de vaciamiento gástrico de una comida sólida nutritiva fue similar en animales SSTR2 +/+ y SSTR2 -/- cuando se valoró 1 h (SSTR2 +/+: 39.8±7.4%, n=10; SSTR2 -/-: 26.6±5.3%, n=11; P=0.074), 2 h (SSTR2 +/+: 61.8±10.1%, n=10; SSTR2 -/-: 63.4±5.2%, n=10; P>0.05) o 4 h después de la retirada del alimento (SSTR2 +/+: 73.3±4.05%, n=8; SSTR2 -/-: 68.9±3.2%, n= 8; P>0.05; Fig. IV.2.5). Durante la hora de acceso al alimento, la cantidad de comida ingerida fue similar en ambos grupos (SSTR2 +/+: 0.60±0.07 g; SSTR2 -/-: 0.72±0.08 g, P>0.05).

Figura IV.2.5. Tasa de vaciamiento gástrico en función del tiempo en animales SSTR2 +/+ y SSTR2 -/-. Tras un periodo de ayuno de 18-20 h los animales tuvieron libre acceso a una comida sólida nutritiva estándar durante 1 h. La tasa de vaciamiento gástrico se determinó 1, 2 y 4 horas después de la retirada del alimento. Los datos representan la media ± SEM de 8-10 animales por grupo.



2.2.4 - pH intragástrico en ratones SSTR2 +/+ y SSTR2 -/-

En animales conscientes, ayunados durante 18-20 h, el pH intragástrico fue similar en ambos grupos (SSTR2 -/-: 3.38 ± 0.12 ; SSTR2 +/+: 3.50 ± 0.11 ; $n=10$ por grupo; $P>0.05$). Sin embargo, en ratones SSTR2 -/- anestesiados durante 1 h con uretano los valores de pH intragástrico (3.92 ± 0.08 , $n=10$) fueron significativamente más bajos que los de animales SSTR2 +/+ (6.80 ± 0.03 , $n=10$; $P<0.05$) en las mismas condiciones experimentales.

En animales conscientes ayunados durante 18-20 h y realimentados durante 1 h con una comida sólida nutritiva estándar, los valores de pH intragástrico, 1 h tras la retirada del alimento, fueron similares en ambos grupos (SSTR2 +/+: 4.63 ± 0.12 , $n=9$; SSTR2 -/-: 4.84 ± 0.25 , $n=10$; $P>0.05$). Estos valores de pH correspondieron a un contenido de ácido similar (SSTR2 +/+: 8.63 ± 1.13 μmoles ; SSTR2 -/-: 9.78 ± 1.04 μmoles ; $P>0.05$).

2.2.5 - Secreción ácida gástrica basal y respuesta a secretagogos en ratones SSTR2 +/+ y SSTR2 -/- anestesiados con uretano

En animales anestesiados con uretano, la tasa de secreción ácida gástrica basal fue estable durante un periodo experimental de hasta 2 h y, aproximadamente, de 12 a 15 veces superior en ratones SSTR2 -/- (1.33 ± 0.14 $\mu\text{moles}/10$ min, $n=5$) que en ratones SSTR2 +/+ (0.09 ± 0.01 $\mu\text{moles}/10$ min, $n=5$; $P<0.05$; Fig. IV.2.6).

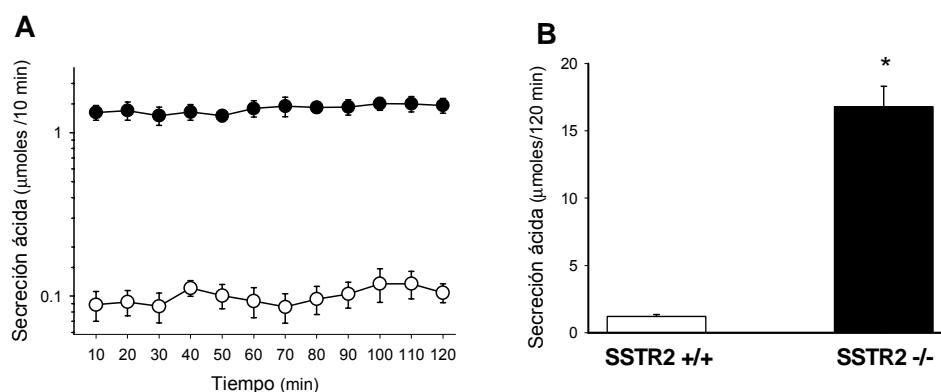


Figura IV.2.6. Secreción ácida gástrica basal en animales SSTR2 +/+ (○) y SSTR2 -/- (●) anestesiados con uretano. La secreción ácida gástrica basal se determinó a intervalos de 10 min durante un periodo de 2 h. A: Secreción ácida gástrica basal en función del tiempo. Nótese que el eje de ordenadas está representado en escala logarítmica, mostrando la diferencia de, aproximadamente, un orden de 10 en la tasa de secreción basal entre los dos grupos de animales. B: Secreción ácida acumulada durante el mismo periodo de tiempo. Los datos representan la media \pm SEM de 5 animales por grupo. *: $P<0.001$ vs secreción basal en animales SSTR2 +/+.

En animales SSTR2 +/+, la infusión de pentagastrina (16 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) aumentó la secreción ácida gástrica basal alcanzando valores aproximadamente 3 veces superiores a los basales a los 30 min del comienzo de la misma (0.22 ± 0.01 $\mu\text{moles}/10$ min; $P<0.05$ vs basal: 0.08 ± 0.01 $\mu\text{moles}/10$ min, $n=5$; Fig. IV.2.7). Estos valores se mantuvieron relativamente estables a lo largo de todo el periodo de infusión. Una respuesta similar se observó en los animales SSTR2 -/- en los cuales la tasa de secreción ácida durante la infusión de pentagastrina alcanzó valores aproximadamente 3 veces superiores a los basales (3.09 ± 0.17 $\mu\text{moles}/10$ min; $P<0.05$ vs basal: 0.90 ± 0.07 $\mu\text{moles}/10$ min, $n=4$; Fig. IV.2.7). La respuesta secretora neta a la pentagastrina en animales SSTR2 -/- (22.08 ± 8.49 $\mu\text{moles}/120$ min) fue aproximadamente 14 veces superior a la observada en animales SSTR2 +/+ (1.48 ± 0.26 $\mu\text{moles}/120$ min; $P<0.05$; Fig. IV.2.7).

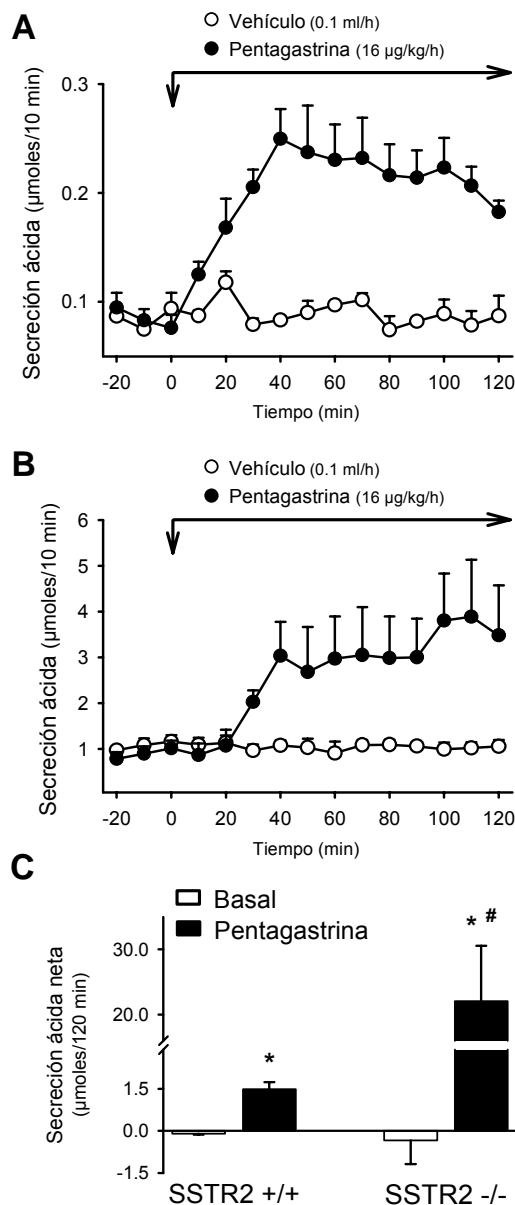


Figura IV.2.7. Efecto de la pentagastrina sobre la secreción basal en animales SSTR2 +/+ (A) y SSTR2 -/- (B). Tras 30 min de periodo basal, se inició una infusión intravenosa de vehículo (0.1 ml/h, 2 h) o de pentagastrina (16 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$, 2 h). La secreción ácida gástrica se determinó a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento. A: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo en animales SSTR2 +/+. B: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo en animales SSTR2 -/-. C: Respuesta secretora neta durante el tiempo de infusión de vehículo o de pentagastrina. Los datos representan la media \pm SEM de 4-5 animales por grupo. *: $P<0.05$ vs respectiva basal. #: $P<0.05$ vs respuesta secretora en animales SSTR2 +/.

La infusión de histamina (5 mg/kg/h) en animales SSTR2 +/+ estimuló la secreción ácida gástrica basal alcanzándose una fase en meseta a los 30 min del comienzo de la misma, durante este periodo la secreción alcanzó valores ($1.11 \pm 0.27 \mu\text{mol}/10 \text{ min}$) aproximadamente 11 veces superiores a los observados durante el periodo basal ($0.09 \pm 0.01 \mu\text{mol}/10 \text{ min}$, $n=4$; Fig. IV.2.8). En animales SSTR2 -/-, la administración de histamina indujo una respuesta secretora similar, sin embargo en este caso la histamina sólo aumentó la secreción alrededor de 2 veces sobre los valores basales ($2.65 \pm 0.10 \mu\text{moles}/10 \text{ min}$; $P < 0.05$ vs basal: $1.42 \pm 0.06 \mu\text{moles}/10 \text{ min}$; $n=3$; Fig. IV.2.8). La respuesta secretora neta a la histamina fue similar en ambos grupos de animales (SSTR2 +/+: $11.08 \pm 2.20 \mu\text{moles}/120 \text{ min}$; $P > 0.05$ vs SSTR2 -/-: $13.46 \pm 0.11 \mu\text{moles}/120 \text{ min}$; Fig. IV.2.8).

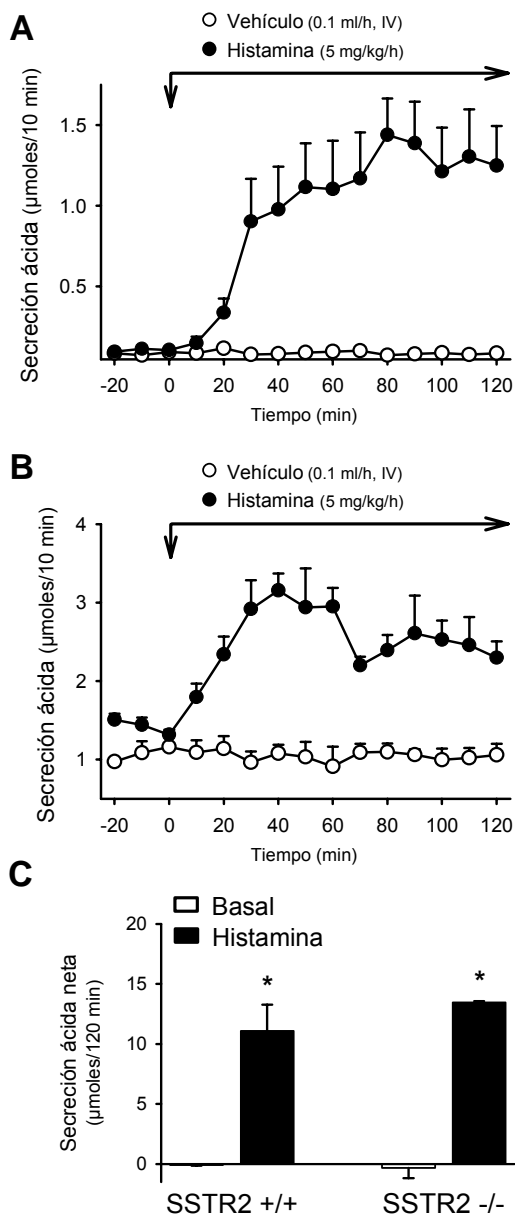


Figura IV.2.8. Efecto de la histamina sobre la secreción basal en animales SSTR2 +/+ (A) y SSTR2 -/- (B). Tras 30 min de periodo basal, se inició una infusión intravenosa de vehículo (0.1 ml/h, 2 h) o de histamina (5 mg/kg/h, 2h). La secreción ácida gástrica se determinó a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento. A: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo en animales SSTR2 +/+. B: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo en animales SSTR2 -/-. C: Respuesta secretora neta durante el tiempo de infusión de vehículo o de histamina. Los datos representan la media \pm SEM de 3-5 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs respectiva basal.

2.2.6 - Efectos de la inmunoneutralización de la gastrina y la somatostatina sobre la secreción basal

En animales SSTR2 +/+, el anticuerpo monoclonal anti-somatostatina (CURE S.6, 150 µg/ratón, iv) incrementó la secreción ácida gástrica basal alcanzándose una fase de meseta a los 30 min de su administración. Esta fase fue estable durante los 90 min siguientes y se correspondió con un incremento de un 400% sobre los niveles basales de secreción (0.30 ± 0.04 µmol/10 min; $P < 0.05$ vs basal: 0.08 ± 0.01 µmol/10 min; $n=4$; Fig. IV.2.9). Por el contrario, la inmunoneutralización de la somatostatina (CURE S.6, 150 µg/ratón) en animales SSTR2 -/- no modificó la elevada tasa de secreción basal (basal: 17.61 ± 1.34 µmol/2 h; anti-somatostatina: 17.51 ± 3.36 µmol/2 h; Fig. IV.2.9).

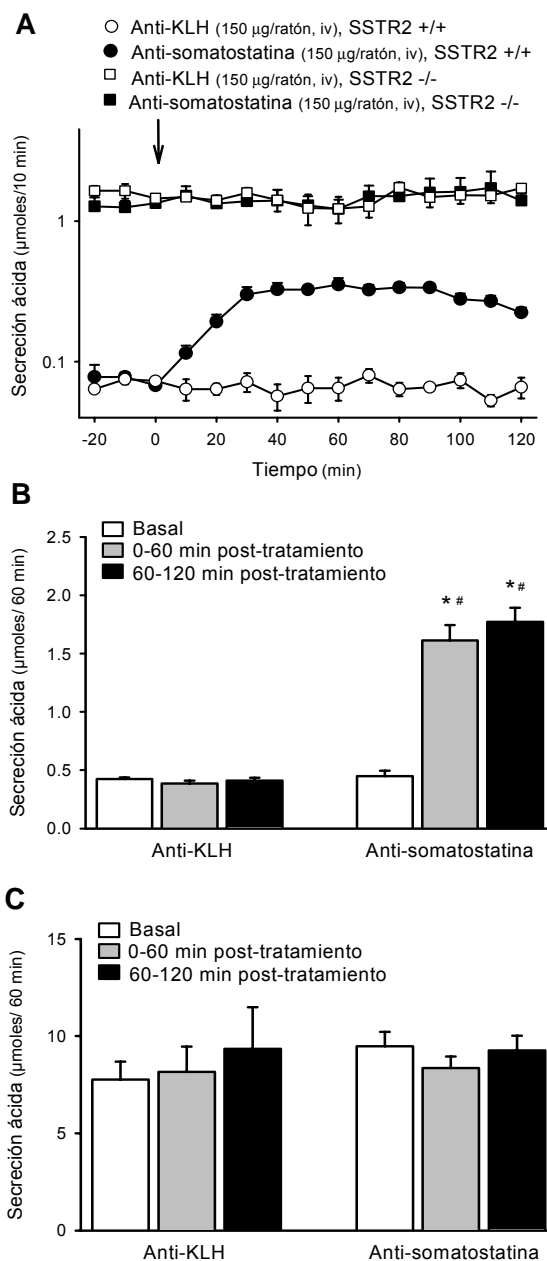


Figura IV.2.9. Efectos de la inmunoneutralización de la somatostatina endógena sobre la secreción ácida basal en ratones SSTR2 +/+ y SSTR2 -/- anestesiados con uretano. Tras 30 min de periodo basal se administró el anticuerpo monoclonal anti-somatostatina (CURE S.6, 150 µg) o un anticuerpo control (anti-KLH, 150 µg). La secreción ácida gástrica se determinó a intervalos de 10 min durante las 2 h siguientes. A: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo. B: Secreción ácida acumulada en animales SSTR2 +/+. C: Secreción ácida acumulada en animales SSTR2 -/-. Los datos representan la media \pm SEM de 4 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs basal, #: $P < 0.05$ vs anti-KLH. [SSTR2 +/+: $F(5,18)=71.275$, $P < 0.001$; SSTR2 -/ -: $F(5,18)=0.324$, $P > 0.05$].

En un experimento se comprobó la capacidad del anticuerpo anti-somatostatina para inmunoneutralizar las acciones de la somatostatina administrada exógenamente. En animales SSTR2 +/+, se administró anticuerpo anti-somatostatina (CURE S.6, 150 µg/ratón) y a los 30 min se inició una infusión de somatostatina-14 (20 µg/kg/h, por 1 h). En estas condiciones, la somatostatina-14 no modificó el incremento en la secreción ácida inducido por el anticuerpo (2.29 ± 0.08 µmol/60 min, n=3) cuando se comparó con la tasa de secreción en animales tratados con vehículo de la somatostatina-14 (2.04 ± 0.16 µmol/60 min, n=5; $P > 0.05$; Fig. IV.2.10).

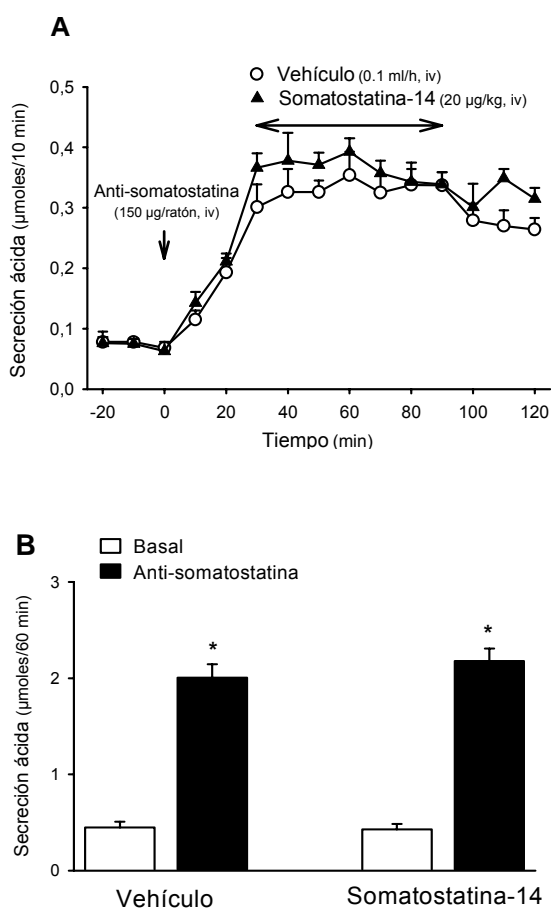


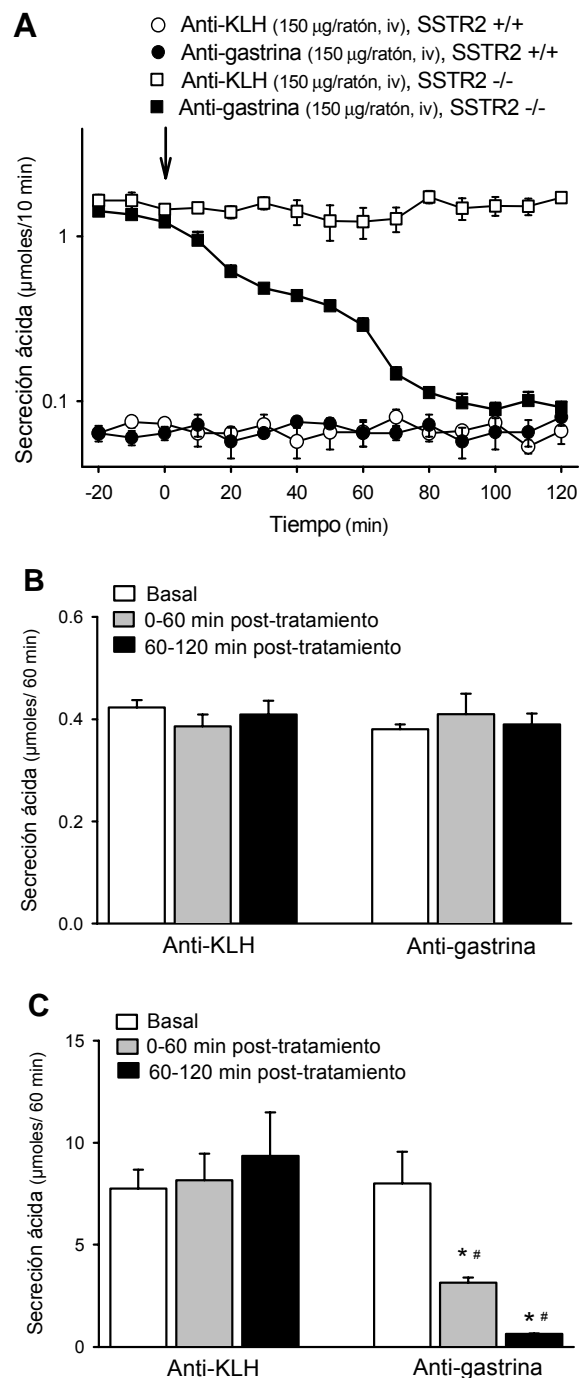
Figura IV.2.10. Efectos de la somatostatina-14 sobre la secreción ácida gástrica en animales SSTR2 +/+ tras la inmunoneutralización de la somatostatina endógena. Tras un periodo basal de 30 min se administró el anticuerpo monoclonal anti-somatostatina (CURE S.6, 150 µg/ratón) y a los 30 min se inició la perfusión de somatostatina-14 (20 µg/kg, iv) o de vehículo (0.1 ml, iv) durante 1 h. A: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo. B: Valores de secreción ácida acumulada durante la hora de infusión de somatostatina-14 o de vehículo. Los datos representan la media±SEM de 3-5 animales por grupo. *:P <0.05 vs secreción basal [F(3,12)=88.457, P<0.001].

La inmunoneutralización de la gastrina endógena con el anticuerpo monoclonal anti-gastrina (CURE nº 05109.1, 150 µg/ratón, iv) disminuyó la elevada tasa de secreción ácida gástrica basal observada en animales SSTR2 -/- anestesiados con uretano. La secreción se redujo de forma progresiva, en función del tiempo, de forma que a los 80 min post-administración se alcanzaron valores de secreción similares a los observados en animales SSTR2 +/+ (0.10 ± 0.01 µmol/10 min; $P > 0.05$ vs SSTR2 +/+: 0.09 ± 0.02 µmol/10 min, n=4; Fig. IV.2.11). La inmunoneutralización de la gastrina en

animales SSTR2 +/+ no modificó la secreción basal ($0.84 \pm 0.01 \mu\text{mol}/2 \text{ h}$; $P > 0.05$ vs basal: $0.78 \pm 0.02 \mu\text{mol}/2 \text{ h}$, $n=4$; Fig. IV.2.11).

El anticuerpo control (anti-KLH, 150 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, iv) en ningún caso modificó la secreción basal (SSTR2 -/-: $17.51 \pm 3.36 \mu\text{mol}/2 \text{ h}$, $P > 0.05$ vs basal: $15.51 \pm 1.84 \mu\text{mol}/2 \text{ h}$, $n=4$; SSTR2 +/+: $0.86 \pm 0.02 \mu\text{mol}/2 \text{ h}$, $P > 0.05$ vs basal: $0.91 \pm 0.06 \mu\text{mol}/2 \text{ h}$, $n=4$; Figs. IV.2.9 y IV.2.11).

Figura IV.2.11. Efectos de la inmunoneutralización la gastrina endógena sobre la secreción ácida basal en ratones SSTR2 +/+ y SSTR2 -/- anestesiados con uretano. Tras 30 min de periodo basal se administró el anticuerpo monoclonal anti-gastrina (CURE n° 05109.1; 150 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) o el anticuerpo control (anti-KLH, 150 $\mu\text{g}/\text{ratón}$). La secreción ácida gástrica se determinó a intervalos de 10 min durante las 2 h siguientes. A: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo. B: Secreción ácida acumulada en animales SSTR2 +/+. C: Secreción ácida acumulada en animales SSTR2 -/-. Los datos representan la media \pm SEM de 4 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs basal; #: $P > 0.05$ vs anti-KLH. [SSTR2 +/+: $F(5,18)=2.121$, $P=0.110$; SSTR2 -/ -: $F(5,18)=21.38$, $P < 0.0011$.



2.2.7 - Efecto del bloqueo de los receptores H2 y del bloqueo colinérgico sobre la secreción basal en animales SSTR2 +/+ y SSTR2 -/- y sobre la secreción estimulada en animales SSTR2 +/+

En animales SSTR2 -/- anestesiados con uretano el bloqueo de los receptores H2 con cimetidina (30 mg/kg, iv) disminuyó en un 82% la secreción ácida gástrica basal (cimetidina: 2.40 ± 0.12 μ moles/120 min; $P < 0.05$ vs basal: 13.62 ± 1.45 μ moles/120 min; $n=4$; Fig. IV.2.12), sin afectar la secreción en animales SSTR2 +/+ (0.39 ± 0.04 μ moles/120 min; $P > 0.05$ vs basal: 0.41 ± 0.04 μ moles/120 min, $n=4$; Fig. IV.2.12).

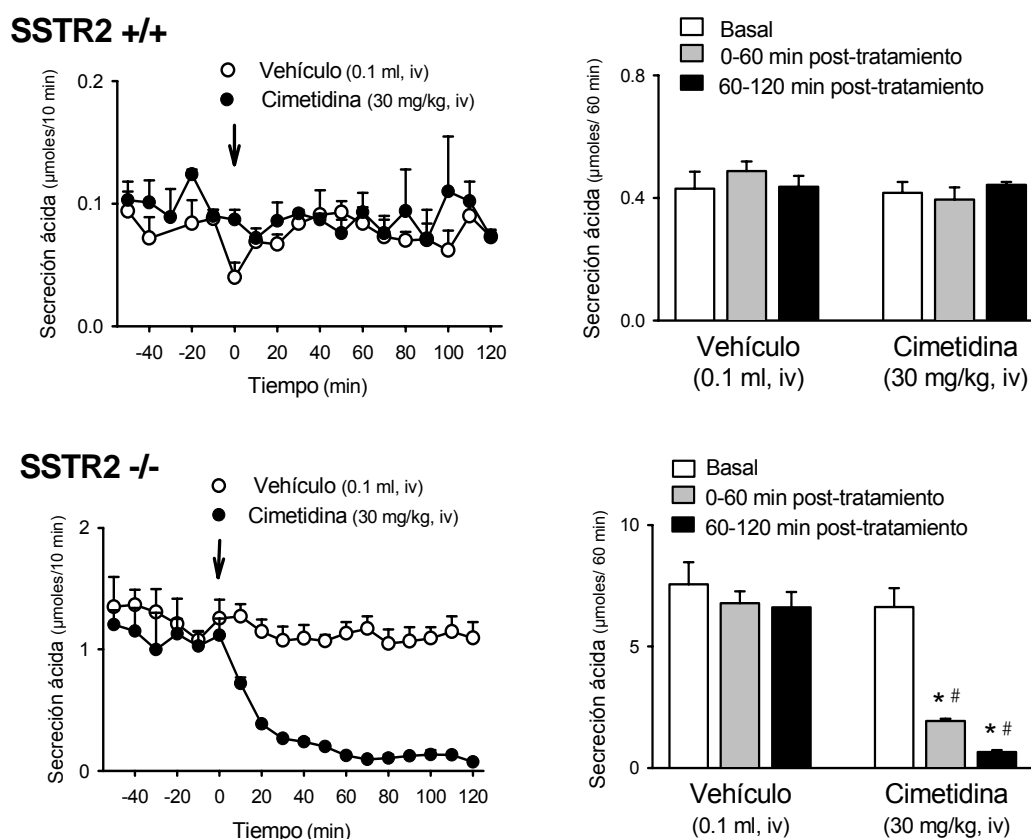


Figura IV.2.12. Efecto de la cimetidina sobre la secreción ácida gástrica basal en animales SSTR2 +/+ y SSTR2 -/-. Tras 60 min de periodo basal se administró cimetidina (30 mg/kg) o vehículo (0.1 ml) en forma de bolus intravenoso. La secreción ácida se registró a intervalos de 10 min durante las 2 h siguientes. Los gráficos de la izquierda representan cambios en la secreción ácida en función del tiempo y los de la derecha los valores acumulados de secreción (μ mol/60 min) durante el periodo basal y tras el tratamiento correspondiente. Los datos representan la media \pm SEM de 4 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs basal. #: $P < 0.05$ vs vehículo [SSTR2 +/+: $F(5,18)=0.949$, $P=0.479$; SSTR2 -/ -: $F(5,18)=25.193$, $P < 0.001$].

En animales SSTR2 $-/-$ el bloqueo colinérgico con atropina (2 mg/kg, sc) no modificó la elevada secreción ácida gástrica basal observada durante la anestesia con uretano (atropina: 8.25 ± 1.93 $\mu\text{mol}/60$ min; vehículo: 9.17 ± 1.53 $\mu\text{mol}/60$ min; basal: 8.12 ± 1.41 $\mu\text{mol}/60$ min, $n=4$ para cada grupo; $P>0.05$; Fig. IV.2.13). De la misma forma, no se observaron cambios en la secreción ácida basal tras la administración de atropina en animales SSTR2 $+/+$ (atropina: 0.45 ± 0.04 $\mu\text{mol}/60$ min; vehículo: 0.53 ± 0.03 $\mu\text{mol}/60$ min; basal: 0.47 ± 0.03 $\mu\text{mol}/60$ min, $n = 4$ para cada grupo; $P>0.05$; Fig. IV.2.13).

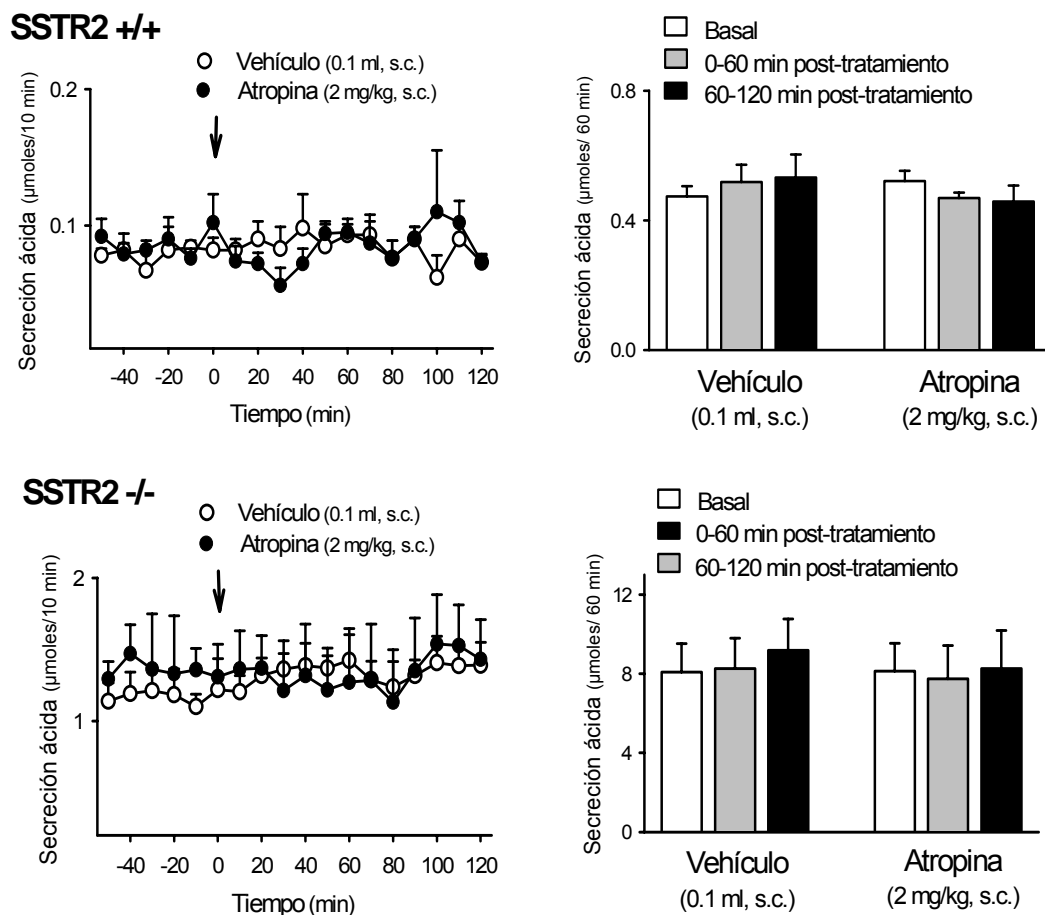


Figura IV.2.13. Efecto de la atropina sobre la secreción ácida gástrica basal en animales SSTR2 $+/+$ y SSTR2 $-/-$. Tras 60 min de periodo basal se administró atropina (2 mg/kg, s.c.) o vehículo (0.1 ml, s.c.). La secreción ácida se registró a intervalos de 10 min durante las 2 h siguientes. Los gráficos de la izquierda representan cambios en la secreción ácida en función del tiempo y los de la derecha los valores acumulados de secreción ($\mu\text{mol}/60$ min) durante el periodo basal y tras el tratamiento correspondiente. Los datos representan la media \pm SEM de 4 animales por grupo [SSTR2 $+/+$: $F(5,18)=0.474$, $P=0.790$; SSTR2 $-/-$: $F(5,18)=0.089$, $P=0.993$].

En un experimento se determinaron los efectos del bloqueo colinérgico con atropina sobre la secreción ácida estimulada con pentagastrina en animales SSTR2 +/+. La infusión de pentagastrina estimuló la secreción ácida gástrica basal alcanzando una fase de meseta a los 30 min del comienzo de la misma, que correspondió con un incremento de aproximadamente un 140% sobre los valores basales de secreción (0.17 ± 0.01 $\mu\text{moles}/10$ min, $P < 0.05$ vs basal: 0.071 ± 0.01 $\mu\text{moles}/10$ min). En estas condiciones, la administración de atropina (2 mg/kg, s.c.) no afectó la respuesta secretora a la pentagastrina cuando se comparó con la observada en animales tratados con vehículo (pentagastrina + vehículo: 1.07 ± 0.06 $\mu\text{moles}/60$ min, $n=4$; $P > 0.05$ vs pentagastrina + atropina: 1.00 ± 0.01 $\mu\text{moles}/60$ min, $n=4$ para cada grupo, Fig. IV.2.14).

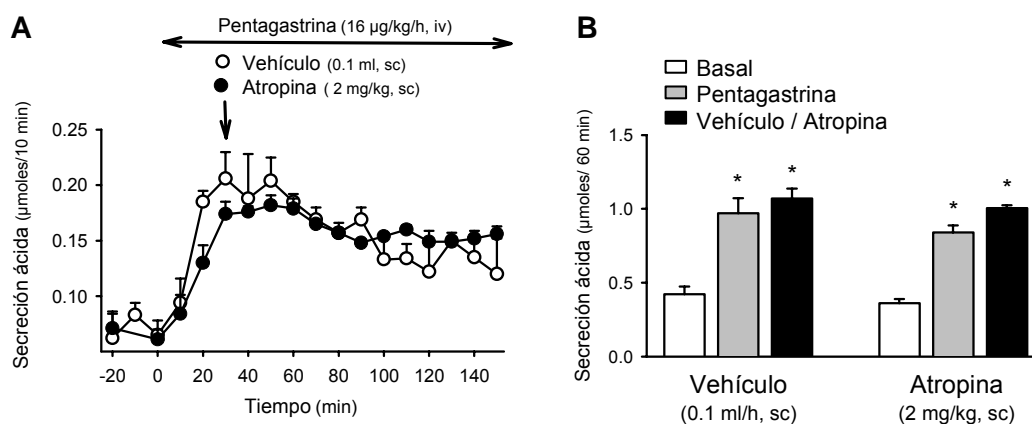


Figura IV.2.14. Efecto de la atropina sobre la secreción ácida gástrica estimulada por pentagastrina en animales SSTR2 +/+ anestesiados con uretano. Tras 30 min de periodo basal la secreción ácida gástrica se estimuló con pentagastrina, a los 30 min del comienzo de la infusión se administró atropina. La secreción ácida gástrica se registró a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento. A: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo. B) Secreción ácida acumulada durante un periodo de 60 min tras la administración de la atropina o el vehículo. Los datos representan la media \pm SEM de 4 animales por grupo. * $P < 0.05$ vs secreción basal [$F(5,18)=24.327$, $P < 0.001$].

2.2.8 - Efectos de la somatostatina-14 sobre la secreción ácida gástrica estimulada por secretagogos en animales SSTR2 +/+ o la secreción basal en animales SSTR2 -/-

En animales SSTR2 +/+, debido a la baja tasa de secreción ácida gástrica basal, los efectos de la somatostatina se valoraron cuando la secreción se estimuló con los secretagogos pentagastrina o histamina. La infusión de pentagastrina (16 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$)

estimuló la secreción ácida gástrica basal, alcanzando una fase en meseta a los 30 min del inicio de la infusión ($1.25 \pm 0.05 \mu\text{mol}/60 \text{ min}$, $n=9$). Estos valores representaron un aumento en la secreción de aproximadamente 2.5 veces con respecto a los valores basales ($0.49 \pm 0.07 \mu\text{mol}/60 \text{ min}$; $P < 0.05$). La infusión de somatostatina-14 ($20 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$, por 1 h) inhibió la respuesta secretora a pentagastrina en un $47.2 \pm 8.9 \%$ ($0.67 \pm 0.12 \mu\text{mol}/60 \text{ min}$, $n=7$; $P < 0.05$ vs pentagastrina + vehículo: $1.25 \pm 0.04 \mu\text{mol}/60 \text{ min}$, $n=5$; Fig. IV.2.15).

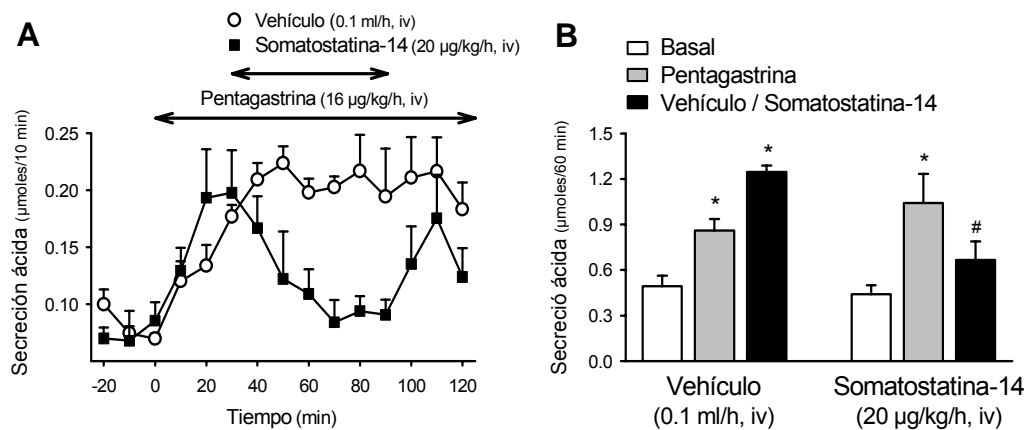


Figura IV.2.15. Efectos de somatostatina-14 sobre la secreción ácida gástrica estimulada con pentagastrina en ratones SSTR2 +/+. En animales anestesiados con uretano, tras 30 min de periodo basal, la secreción ácida gástrica se estimuló con pentagastrina. A los 30 min del comienzo de la infusión de pentagastrina se inició una infusión de 1 h de somatostatina-14. La secreción ácida gástrica se registró a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento. A: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo. B: Secreción ácida gástrica acumulada durante los 60 min de infusión de somatostatina-14 o de vehículo. Los datos representan la media \pm SEM de 5-7 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs respectiva basal; #: $P < 0.05$ vs pentagastrina [$F(5,30)=6.891$, $P < 0.001$].

La infusión de histamina ($5 \text{ mg}/\text{kg}/\text{h}$) en animales SSTR2 +/+ resultó, a los 40 min del inicio de la misma, en una tasa de secreción de aproximadamente 12 veces los valores basales ($1.56 \pm 0.13 \mu\text{mol}/10 \text{ min}$; $P < 0.05$ vs secreción basal: $0.13 \pm 0.02 \mu\text{mol}/10 \text{ min}$). La infusión de somatostatina-14 ($20 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) inhibió la respuesta secretora a histamina en un $41.0 \pm 12.7\%$ ($5.50 \pm 1.18 \mu\text{mol}/60 \text{ min}$; $P=0.074$ vs vehículo: $9.35 \pm 1.81 \mu\text{mol}/60 \text{ min}$; $n=4$ para cada grupo; Fig. IV.2.16).

A diferencia de lo observado en animales SSTR2 +/+, la somatostatina-14 (20 µg/kg/h, 1 h) no modificó la elevada secreción basal observada en ratones SSTR2 -/- anestesiados con uretano (10.71 ± 1.31 µmol/60 min; $P > 0.05$ vs basal: 10.18 ± 1.65 µmol/60 min, $n=4$, $P > 0.05$, Fig. IV.2.17).

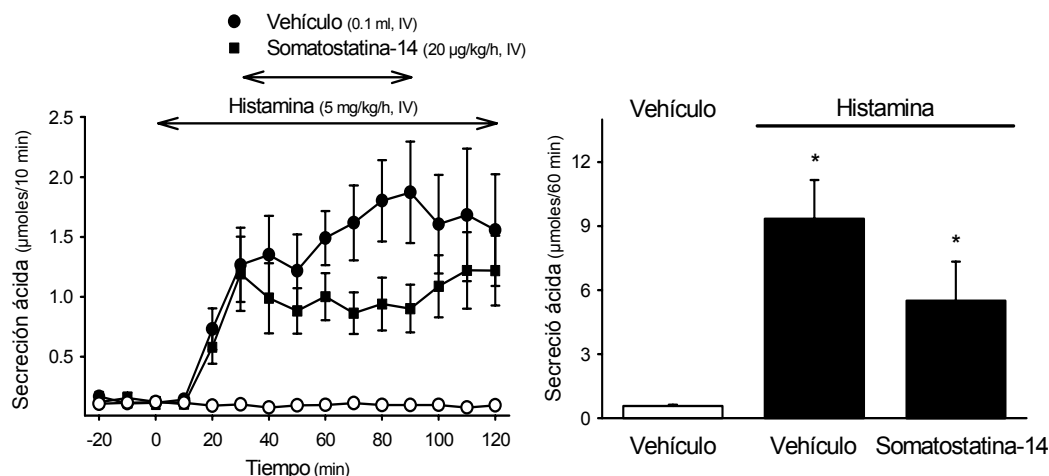


Figura IV.2.16. Efectos de somatostatina-14 sobre la secreción ácida gástrica estimulada con histamina en ratones SSTR2 +/+. Se siguieron los mismos protocolos a los expuestos en la figura IV.2.15, pero en este caso la secreción ácida se estimuló con histamina (5 mg/kg/h). La gráfica de la izquierda representa los cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo y la de la derecha valores acumulados de secreción durante la hora de infusión de somatostatina-14 o vehículo. Los datos representan la media \pm SEM de 4 animales por grupo *: $P < 0.05$ vs secreción ácida no estimulada [$F(2,8)=9.409$, $P=0.008$].

2.2.9 - Efecto de los análogos de la somatostatina sobre la secreción ácida gástrica en ratones SSTR2 +/+ y SSTR2 -/-

En animales SSTR2 +/+, la administración de pentagastrina (16 µg/kg/h) estimuló la secreción ácida gástrica basal alcanzando un valor de 0.26 ± 0.03 µmol/10 min a los 30 min del inicio de la infusión ($P < 0.05$ vs basal: 0.09 ± 0.02 µmol/10 min). La administración de somatostatina-14 en forma de dosis acumuladas crecientes (1, 5, 10, 15 y 20 µg/kg), con un intervalo de 30 min entre dosis, inhibió de forma dosis dependiente la respuesta secretora a la pentagastrina, de forma que a la dosis de 15 µg/kg la secreción se redujo hasta valores similares a los observados en el periodo basal (0.30 ± 0.03 µmoles/30 min; $P > 0.05$ vs basal: 0.27 ± 0.02 µmoles/30 min, $n=4$; Figs. IV.2.18 y IV.2.20).

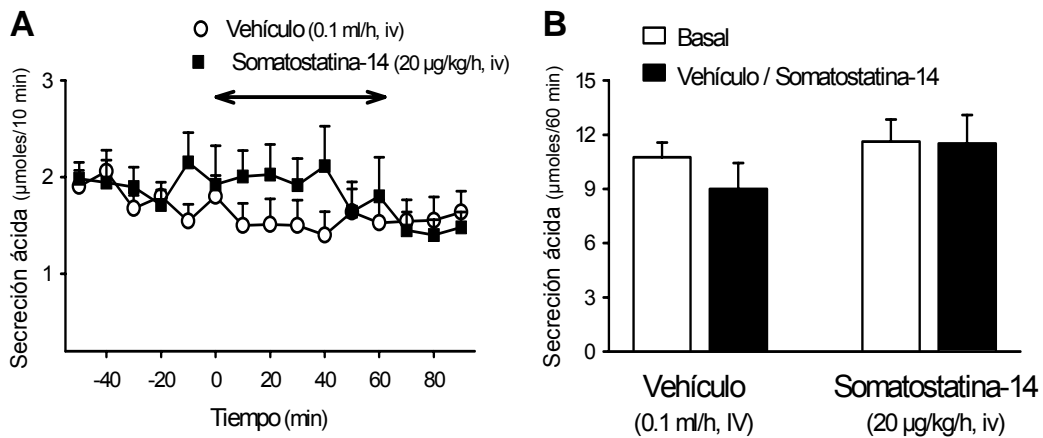


Figura IV.2.17. Efectos de somatostatina-14 sobre la secreción ácida gástrica basal en ratones SSTR2 $-/-$ anestesiados con uretano. Tras un periodo basal de 1 h, se perfundió somatostatina-14 (20 µg/kg/h, durante 1 h). La secreción ácida gástrica se registró a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento. A: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo. B: Secreción ácida acumulada (µmol/60 min) durante el periodo basal o el tiempo de infusión de somatostatina-14 o vehículo. Los datos representan la media±SEM de 4 animales por grupo. [F(3,20)=1.285, P=0.307].

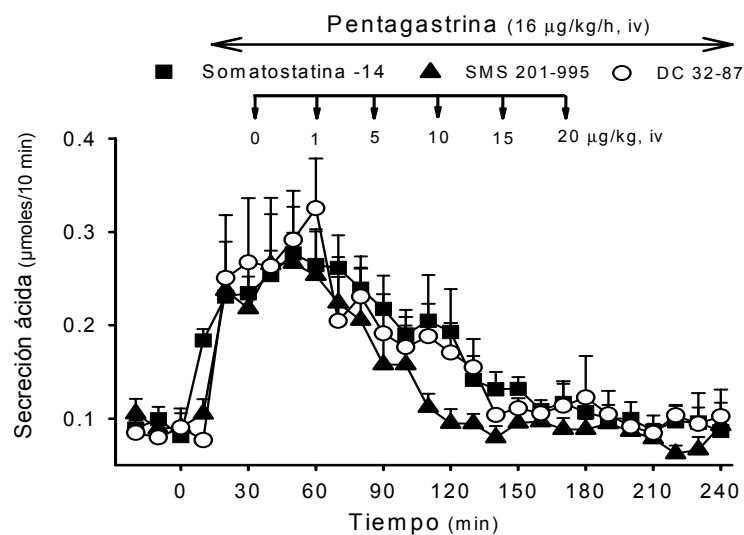


Figura IV.2.18. Efecto de la somatostatina-14 y sus análogos SMS 201-995 y DC 32-87 sobre la secreción ácida en ratones SSTR2 $+/+$: Curva dosis-respuesta acumulada. Tras 30 min de periodo basal, se infundió pentagastrina (16 µg/kg/h, iv). A los 30 min del inicio de la infusión, se administró somatostatina-14, SMS 201-995 o DC 32-87 en dosis acumuladas (1, 5, 10, 15 y 20 µg/kg, iv) con un intervalo de 30 min entre dosis. La secreción ácida gástrica se determinó a lo largo de todo el experimento a intervalos de 10 min. Los datos representan la media±SEM de 4 animales por grupo.

Tabla IV.2.3. Potencia relativa de la somatostatina-14 y sus análogos, SMS 201-995 y DC 32-87, inhibiendo la secreción ácida estimulada con pentagastrina en ratones SSTR2 +/+.

Tratamiento	DE ₅₀ (µg/kg) ^a (intervalo de confianza, 95%)	r ²
Somatostatina-14	5.98 (4.94-7.02)	0.908
SMS 201-995	0.93 (0.20-2.23)	0.889
DC 32-87	3.63 (2.47-4.79)	0.833

^aLos valores de la DE₅₀ se calcularon a partir de un ajuste por regresión no lineal de las curvas dosis-respuesta acumuladas para cada uno de los péptidos (0–20 µg/kg) (véanse las Figs. IV.2.18 y IV.2.21).

Respuestas inhibitorias similares se observaron cuando se administraron los análogos de la somatostatina, SMS 201-995 y DC 32-87. Para el SMS-201-995, la respuesta secretora se inhibió hasta valores semejantes a los basales a la dosis de 10 µg/kg (0.27±0.03 µmoles/30 min; P>0.05 vs basal: 0.28±0.04 µmoles/30 min, n=4; Figs. IV.2.19 y IV.2.21). Para el compuesto DC 32-87 el retorno a los niveles basales de secreción se alcanzó a la dosis de 15 µg/kg (0.28±0.03 µmoles/30 min; P>0.05 vs basal: 0.27±0.02 µmoles /30 min, n=4; Figs. IV.2.18 y IV.2.20). En función de la DE₅₀ el orden de potencia de estos péptidos para inhibir la secreción estimulada con pentagastrina fue: SMS 201-995>DC 32-87>Somatostatina-14 (Tabla IV.2.3).

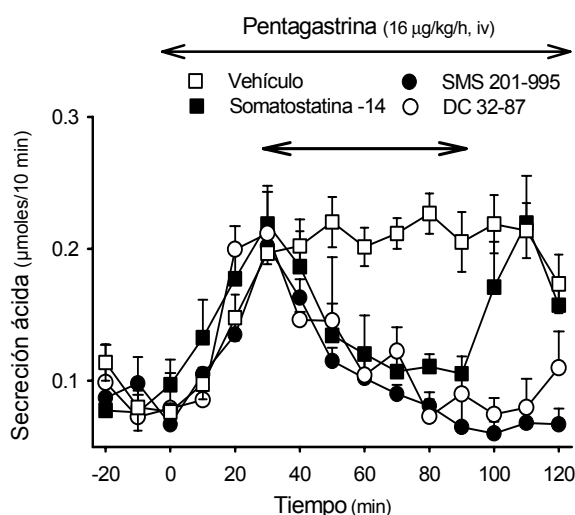


Figura IV.2.19. Efecto de somatostatina-14 y sus análogos, SMS 201-995 y DC 32-87, sobre la secreción ácida gástrica estimulada por pentagastrina en ratones SSTR2 +/+. A los 30 min del inicio de la infusión de pentagastrina, se inició una infusión de somatostatina-14 (20 µg/kg/h), SMS 201-995 (20 µg/kg/h), DC 32-87 (20 µg/kg/h) o vehículo (0.1 ml/h). Los datos representan la media±SEM de 4-5 animales por grupo.

Respuestas inhibitorias similares, tanto para la somatostatina-14 como para el SMS 201-995 y el compuesto DC 32-87, se observaron cuando los péptidos se administraron en forma de infusión intravenosa continua (1 h). La somatostatina-14 (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) inhibió la respuesta secretora a pentagastrina un $47.1\pm 6.1\%$ (0.67 ± 0.12 $\mu\text{moles}/60$ min; $n=7$ $P<0.05$ vs vehículo: 1.25 ± 0.12 $\mu\text{moles}/60$ min, $n=8$). A los 20 min de finalizar la infusión de somatostatina-14, los valores de secreción aumentaron hasta valores cercanos a los observados en los animales tratados con vehículo (0.23 ± 0.21 $\mu\text{mol}/10$ min; $P>0.05$ vs somatostatina-14: 0.22 ± 0.36 $\mu\text{moles}/10$ min; Fig. IV.2.19). De la misma forma, la infusión de DC 32-87 (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) inhibió la respuesta secretora a pentagastrina en un $47.2\pm 7.9\%$ (0.67 ± 0.07 $\mu\text{moles}/60$ min, $n=6$; $P<0.05$ vs vehículo; Fig. IV.2.19); mientras que el SMS 201-995 (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) la inhibió en un $48.3\pm 2.1\%$ (0.64 ± 0.02 $\mu\text{moles}/60$ min, $n=5$; $P<0.05$ vs vehículo; Fig. IV.2.19).

Ninguno de los análogos de la somatostatina con afinidad selectiva por los receptores SSTR1 (L-797-591), SSTR3 (BIM-23056), SSTR4 (L-803-087) o SSTR5 (BIM-23052), infundidos por vía intravenosa a dosis de 20, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ($n=3-5$ para cada dosis y compuesto), modificó la respuesta secretora a pentagastrina en animales SSTR2 +/+ (Fig. IV.2.20).

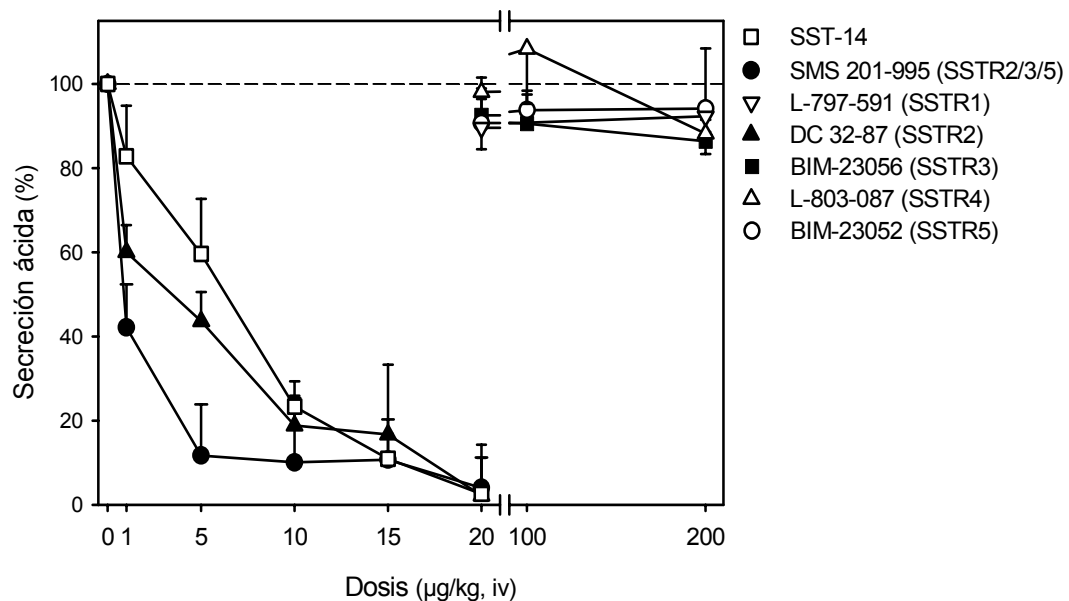


Figura IV.2.20. Efecto de la somatostatina-14 y de sus análogos sobre la secreción ácida estimulada por pentagastrina en animales SSTR2 +/+. La figura representa los cambios (%) en la secreción ácida gástrica en función de la respuesta secretora máxima a la pentagastrina (100%). Nótese que las curvas para somatostatina-14, SMS 201-995 y DC 32-87 se obtuvieron a partir de curvas dosis respuesta acumuladas (véase la Fig. IV.2.19), mientras que las correspondientes al resto de análogos se obtuvieron mediante la infusión continua de los diferentes compuestos por 1 h.

Experimentos similares en animales SSTR2 $-/-$ anestesiados con uretano mostraron que ni la somatostatina-14 (dosis acumuladas de 1, 5, 10, 15 o 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o infusión continua de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) ni ninguno de los análogos con selectividad específica por los diferentes receptores (administrados en dosis acumuladas de 1-20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o como una infusión de 20, 100 o 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) modificó la elevada tasa de secreción ácida gástrica basal característica de estos animales (Fig. IV.2.21).

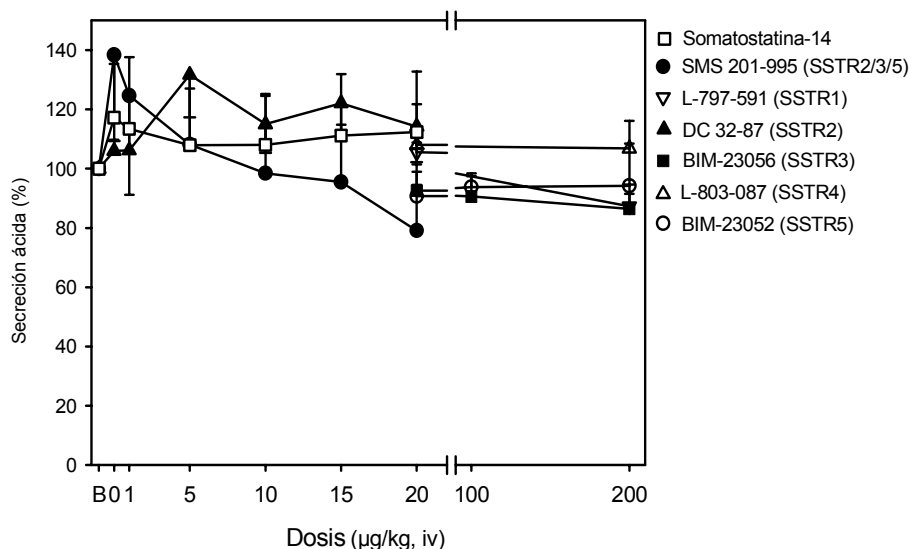


Figura IV.2.21. Efecto de la somatostatina-14 y de sus análogos sobre la secreción ácida basal en animales SSTR2 $-/-$ anestesiados con uretano. La figura representa los cambios (%) en la secreción ácida gástrica con respecto a la secreción basal (B), tomada como 100%. Nótese que las curvas para somatostatina-14, SMS 201-995 y DC 32-87 se obtuvieron a partir de curvas dosis respuesta acumuladas (siguiendo los protocolos descritos para los experimentos en animales SSTR2 $+/+$), mientras que las correspondientes al resto de análogos se obtuvieron mediante la infusión continua de los mismos durante 1 h.

2.2.10 - Efecto del antagonista selectivo de los receptores SSTR2, PRL-2903, sobre la secreción ácida basal y las acciones de la somatostatina

En animales SSTR2 $+/+$ anestesiados con uretano, el compuesto PRL-2903, administrado en forma de bolus (1.5 mg/kg, 0.1 ml, iv) produjo una estimulación transitoria de la secreción ácida; alcanzándose una respuesta secretora máxima a los 30 min tras la administración [1.30 ± 0.02 $\mu\text{moles}/10$ min; $P < 0.05$ vs basal: 0.09 ± 0.02 ; $n=8$; $F(2,17)=26.978$, $P < 0.001$] y volviéndose a valores similares a los basales a los 80 min (0.27 ± 0.07 $\mu\text{moles}/10$ min; $P > 0.05$ vs basal; Fig. IV.2.22).

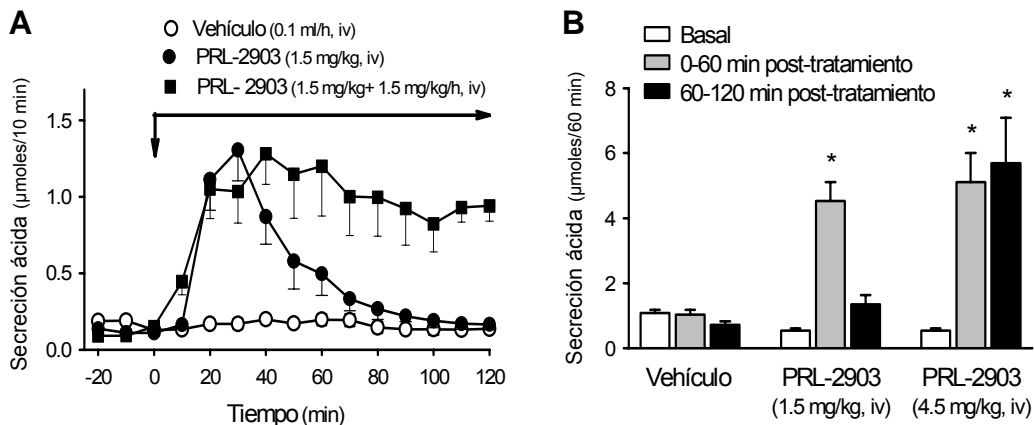


Figura IV.2.22. Efectos del antagonista SSTR2, PRL-2903, sobre la secreción ácida gástrica basal en ratones SSTR2 +/+. Tras 30 min de periodo basal los animales recibieron un bolus de PRL-2903 (1.5 mg/kg, 0.1 ml), un bolus de PRL-2903 (1.5 mg/kg, 0.1 ml) seguido de una infusión continua (1.5 mg/kg/h) durante 2 h o vehículo (bolus de 0.1 ml + 2 h de infusión). A: Cambios en la secreción ácida basal en función del tiempo. B: Secreción ácida acumulada (µmoles/60 min) para los diferentes tratamientos. Los datos representan la media±SEM de 5-8 animales por grupo. *:P<0.05 vs basal o vehículo [F(8.42)=12.389, P<0.001].

Cuando el PRL-2903 se administró como un bolus (1.5 mg/kg, 0.1 ml, iv) seguido de una infusión continua (1.5 mg/kg/h, 2 h) la secreción aumentó alcanzando una fase de meseta a los 20-30 min tras el inicio de la infusión. A partir de este punto la secreción permaneció estable durante los 90 min siguientes, alcanzando un valor medio de 1.04 ± 0.05 µmoles/10 min (n=5; P<0.05 vs basal: 0.09 ± 0.01 µmoles/10 min; P<0.05 vs secreción en animales tratados con vehículo: 0.15 ± 0.01 µmoles/10 min, n=4; Fig. IV.2.22). La respuesta secretora con el antagonista PRL-2903 fue 3 veces superior a la observada con el anticuerpo anti-somatostatina CURE S.6 (PRL-2903: 5.69 ± 1.39 µmoles/60 min, n=5; P<0.05 vs anti-somatostatina: 1.82 ± 0.14 µmoles/60 min, n=4; F(5,21)=9.416, P=0.005; véase el apartado 2.2.6). Por el contrario, en animales SSTR2 -/-, el compuesto PRL-2903, administrado según el mismo protocolo (bolus + perfusión de 2 h) no modificó la secreción basal. Los valores acumulados de secreción durante 60 min de infusión de PRL-2903, fueron similares a los observados durante el periodo basal o durante la infusión de vehículo (PRL-2903: 13.59 ± 1.57 µmoles/1 h, n=4; P>0.05 vs basal: 12.87 ± 2.30 µmoles/1 h o vehículo: 12.00 ± 5.67 µmoles/1 h, n=4; Fig. IV.2.23). En animales SSTR2 +/+ en los que la secreción basal se estimuló con PRL-2903, la infusión simultánea de somatostatina-14 (20 µg/kg/h, 1 h) no modificó la respuesta secretora al antagonista. Los valores de secreción observados indican que la acción inhibitoria de la somatostatina-14 fue bloqueada completamente por el antagonista (PRL-2903 + somatostatina: 5.45 ± 0.48 µmoles/60min, n=4; P>0.05 vs PRL-2903 + vehículo: 6.19 ± 1.17 µmoles/60 min, n=3; F(3,10)=31.999, P=0.364; Figura IV.2.24).

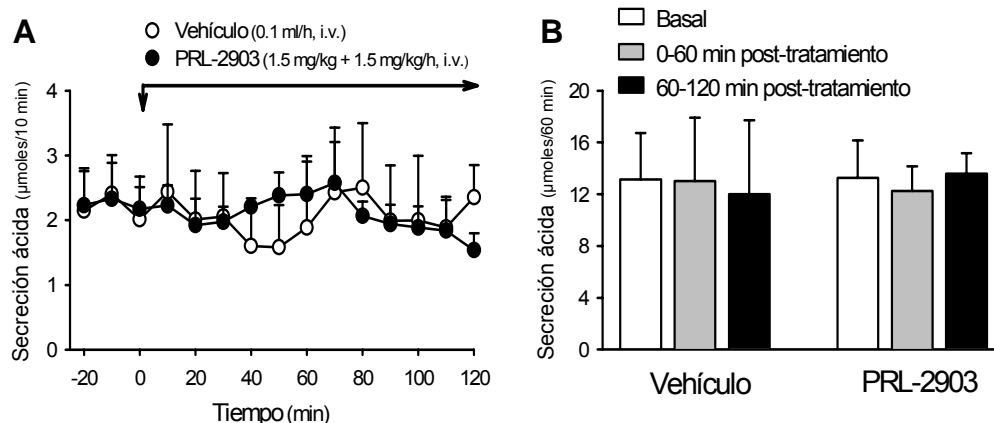


Figura IV.2.23. Efectos del antagonista selectivo de los receptores SSTR2, PRL-2903, sobre la secreción ácida gástrica basal en ratones SSTR2 $-/-$. Tras 30 min de periodo basal, los animales recibieron PRL-2903 en forma de bolus (1.5 mg/kg, 0.1 ml) seguido de una infusión continua (1.5 mg/kg/h) durante 2 h, o vehículo. A: Cambios en la secreción ácida basal en función del tiempo. B: Secreción ácida acumulada (μ moles/60 min) para los diferentes tratamientos. Los datos representan la media \pm SEM de 4 animales por grupo.

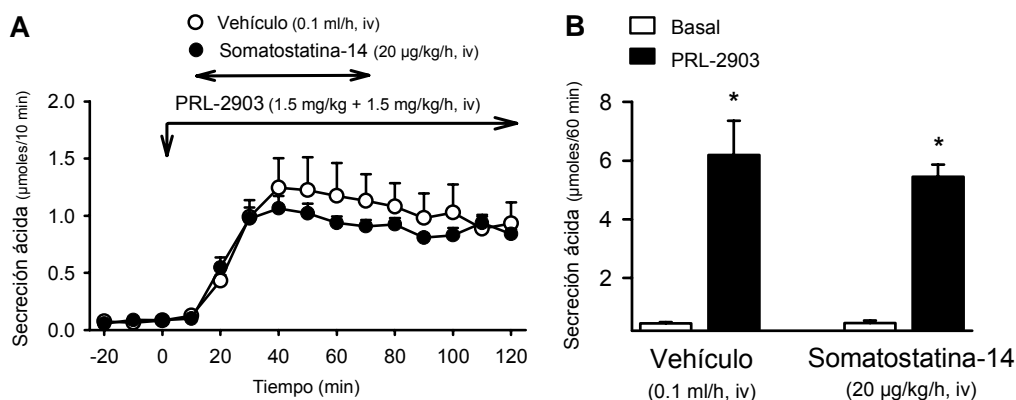


Figura IV.2.24. Efectos de la somatostatina sobre la secreción ácida gástrica tras el bloqueo de los receptores SSTR2 con el antagonista selectivo PRL-2903. Tras 30 min de periodo basal, se administró PRL-2903 (bolus de 1.5 mg/kg, seguido de una infusión continua de 1.5 mg/kg/h por 2 h). A los 10 min del comienzo de la infusión de PRL-2903, se inició una infusión de somatostatina-14 (20 μ g/kg/h, iv) o vehículo (0.1 ml) durante 1 hora. La secreción ácida gástrica se determinó a intervalos de 10 min. A: Cambios en la secreción ácida en función del tiempo. B: Valores acumulados de secreción ácida (μ mol/h) durante el periodo de infusión de somatostatina o vehículo. Los datos representan la media \pm SEM de 3-4 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs basal [$F(3,10) = 31.999$; $P < 0.01$].

2.3 - Discusión

Los estudios funcionales realizados combinando el empleo de un modelo animal manipulado genéticamente, en el que se ha eliminado el receptor SSTR2, técnicas de inmunoneutralización *in vivo*, y una aproximación farmacológica, basada en el empleo de agonistas de los diferentes subtipos de receptores y un antagonista selectivo de los receptores SSTR2, demuestran la importancia del receptor SSTR2 mediando las acciones inhibitorias de la somatostatina sobre la secreción ácida gástrica en el ratón.

El pH y el contenido intragástrico de ácido fueron similares en animales de tipo salvaje (SSTR2 +/+) y en animales SSTR2 -/-, tanto en ayunas como en estado postprandial. Esto sugiere que en animales SSTR2 -/- se podrían presentar mecanismos compensatorios que suplen la falta del receptor SSTR2 o bien, que este receptor no es necesario para el mantenimiento y regulación normal de la secreción ácida gástrica. Sin embargo, cuando los animales se anestesiaron con uretano, el pH intragástrico de los ratones SSTR2 +/+ aumentó hasta valores cercanos a la neutralidad, mientras que en los animales SSTR2 -/- se mantuvo igual al de los animales conscientes. Estos cambios de pH se correlacionan con una tasa de secreción basal entre 11 y 15 veces superior en los ratones SSTR2 -/- con respecto a los SSTR2 +/+, confirmando observaciones previas realizadas en estos animales (Martínez *et al.*, 1998). El aumento en el pH intragástrico y la secreción basal en animales SSTR2 +/+ puede asociarse a los efectos del uretano. En la rata, el uretano aumenta la síntesis y liberación de somatostatina (Yang *et al.*, 1990), lo que lleva, en esas condiciones, a una tasa de secreción basal muy reducida con respecto a animales conscientes (Martínez *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos, aunque no se han valorado los niveles de somatostatina, están de acuerdo con un efecto similar del uretano en el ratón. Por lo tanto, el uretano se puede considerar como un anestésico de utilidad para estudiar la importancia de la somatostatina en los mecanismos de control de la función gástrica. Las acciones de otros anestésicos sobre la síntesis y liberación de somatostatina no se han estudiado; sin embargo, la variabilidad en la secreción ácida basal que se observa en animales anestesiados con otros agentes (como el pentobarbital) puede sugerir que su acción sobre esta hormona no es tan importante como en el caso del uretano. La elevada tasa de secreción basal observada en los animales SSTR2 -/- anestesiados con uretano, con un pH intragástrico similar al de los animales conscientes, sugiere que, en estos animales, la somatostatina liberada por el anestésico no está ejerciendo sus acciones inhibitorias, debido a la falta de receptores SSTR2. Estas observaciones se confirman, además, por los efectos de la inmunoneutralización *in vivo* de la somatostatina y por los de la manipulación farmacológica de los receptores SSTR2.

La inmunoneutralización de la somatostatina endógena con el anticuerpo monoclonal CURE S.6 incrementó hasta 4 veces la secreción ácida gástrica basal en animales SSTR2 +/+ anestesiados con uretano. Esto sugiere que la baja tasa de secreción observada en estos animales es debida a la liberación de somatostatina, asociada probablemente, tal y como ya se ha comentado, al anestésico empleado

(Yang *et al.*, 1990, Martínez *et al.*, 1995). Por el contrario, en los ratones SSTR2 *-/-*, la inmunoneutralización de la somatostatina endógena no modificó la elevada tasa de secreción basal. Resultados similares se obtuvieron mediante el bloqueo farmacológico de los receptores SSTR2 con el antagonista selectivo de los mismos, PRL-2903, que elevó 10 veces la tasa de secreción basal en ratones SSTR2 *+/+*, sin modificarla en animales SSTR2 *-/-*.

Estos resultados sugieren que, al igual que se ha observado en otras especies, los receptores SSTR2 median las acciones de la somatostatina controlando la secreción ácida. Sin embargo, en ratones SSTR2 *-/-* conscientes, el pH intragástrico, tanto en ayunas como en estado postprandial, es similar al de animales de tipo salvaje. Esto podría sugerir que otros tipos de receptores para somatostatina pueden participar también en el control de la secreción ácida compensando la falta del receptor de tipo 2 y generando respuestas secretoras aparentemente normales. Estudios morfológicos han detectado la presencia en el estómago de los cinco subtipos de receptores de la somatostatina (Bruno *et al.*, 1993; Raulf *et al.*, 1994), lo que apoyaría un control de la secreción a múltiples niveles. Además, estudios funcionales empleando análogos de la somatostatina con actividad selectiva para los receptores SSTR2, 3 y 5 muestran que la activación de los tres subtipos puede inducir respuestas de tipo inhibitorio en la secreción ácida, aunque con diferentes potencias (Lloyd *et al.*, 1995, 1997; Aurang *et al.*, 1997). Sin embargo, la implicación de los receptores SSTR1 y 4 no ha sido estudiada. Los resultados obtenidos muestran que, en el ratón, la somatostatina media sus acciones inhibitorias a través de la activación de los receptores SSTR2, sin que ningún otro subtipo parezca estar implicado. En primer lugar, se observó que la infusión intravenosa de somatostatina y su análogo no selectivo, SMS 201-995 (agonista SSTR2/3/5), inhibieron de manera dosis dependiente la secreción ácida gástrica estimulada por pentagastrina en animales SSTR2 *+/+*. De forma similar al análogo de la somatostatina, DC 32-87, con actividad agonista preferente sobre los receptores SSTR2, inhibió también la secreción ácida. La potencia relativa de estos péptidos, en función de la DE₅₀ estimada, fue SMS 201-995 > DC 32-87 > somatostatina-14, lo que concuerda parcialmente con la afinidad de los mismos por el receptor SSTR2 (K_i: somatostatina-14, 0.2-1.3 nM; SMS 201-995, 0.4-2.1 nM; DC 32-87, 0.024 nM; Patel, 1999). Además, estos resultados coinciden también con estudios *in vitro* en mucosa gástrica aislada de rata en los cuales el SMS 201-995 inhibió la secreción ácida estimulada con pentagastrina con una potencia aproximadamente 3 veces superior a la de la somatostatina-14, pero similar a la del agonista preferente de los receptores SSTR2, BIM-23027 (Wyatt *et al.*, 1996). Igualmente, los resultados obtenidos coinciden con estudios funcionales previos *in vivo* en otras especies. Así, en la rata, el compuesto DC 32-87 inhibió la secreción ácida gástrica estimulada por pentagastrina con una potencia similar a la de la somatostatina (Rossowski *et al.*, 1994; Coy y Rossowski, 1995), mientras que en el perro el mismo análogo mostró una potencia superior a la del péptido endógeno (Lloyd *et al.*, 1997).

Por otro lado, la administración en forma de infusión intravenosa de agonistas selectivos de los receptores SSTR1 (L-797-591), SSTR3 (BIM-23056), SSTR4 (L-803-087) y SSTR5 (BIM-23052) no modificó la respuesta secretora a la pentagastrina a dosis (200 µg/kg) 10 veces superiores a las necesarias para inhibir la secreción aproximadamente un 50% cuando se emplearon el agonista SSTR2, DC 32-87, o la propia somatostatina-14. Estos resultados contrastan con observaciones previas en el perro, especie en la cual el compuesto BIM-23058 (SSTR3) y el compuesto BIM-23052 (SSTR5) inhibieron la respuesta secretora a una comida un 70% y un 91%, respectivamente; en las mismas condiciones, dosis 10 veces más bajas de somatostatina-14 inhibieron la secreción un 74% (Lloyd *et al.*, 1997). Sin embargo, los resultados obtenidos coinciden con estudios en la rata en los que el compuesto DC 25-20 (SSTR3) fue, al menos, 50 veces menos potente que la somatostatina inhibiendo la secreción ácida gástrica, mientras que el compuesto DC 23-99 (SSTR5) careció totalmente de efecto inhibitorio (Rossowski *et al.*, 1994; Coy y Rossowski, 1995). De la misma forma, en la rata y en el perro, se ha demostrado que el compuesto DC 32-87 también inhibe la secreción ácida gástrica estimulada por histamina y betanecol (Aurang *et al.*, 1997; Lloyd *et al.*, 1997), aunque con menor efectividad que cuando la secreción se estimula con pentagastrina. En su conjunto, estas observaciones pueden sugerir la existencia de cierta variabilidad de tipo especie-específica en los receptores implicados en el control de la secreción.

Los resultados obtenidos con la somatostatina y sus análogos con actividad agonista selectiva se correlacionan con las observaciones realizadas empleando el antagonista selectivo de los receptores SSTR2, PRL-2903. Como ya se ha mencionado, el bloqueo farmacológico de los receptores SSTR2 con PRL-2903 aumentó la secreción ácida gástrica basal en animales de tipo salvaje, sin afectar la tasa de secreción en animales SSTR2 *-/-*. Cuando el PRL-2903 se administró como una dosis única en forma de bolus la respuesta secretora fue transitoria, con un pico máximo de estimulación tras el cual los niveles de secreción volvieron rápidamente a valores basales, al igual que lo observado previamente en la rata (Kawakubo *et al.*, 1999), sugiriendo que las acciones del antagonista son reversibles. Sin embargo, cuando el antagonista PRL-2903 se administró en forma de bolus seguido de una infusión continua se alcanzó un valor máximo de estimulación que se mantuvo relativamente estable durante el periodo de infusión, alcanzándose una respuesta secretora similar a la tasa de secreción basal de animales SSTR2 *-/-*, lo que indica un bloqueo completo de las acciones de la somatostatina endógena sobre los receptores SSTR2. Estos efectos son similares a los descritos para la inmunoneutralización de la somatostatina endógena. Sin embargo, hay que destacar que la respuesta secretora a la inmunoneutralización fue aproximadamente 3 veces inferior a la obtenida con el bloqueo farmacológico del receptor SSTR2; lo que sugiere que la manipulación farmacológica es más efectiva que la inmunoneutralización eliminando los efectos *in vivo* de la somatostatina. Por otro lado, ambos tratamientos fueron igualmente efectivos bloqueando los efectos antiseoretos de la somatostatina administrada exógenamente. Estos resultados

coinciden con estudios funcionales en ratas conscientes en los cuales la administración intravenosa de PRL-2903 revirtió las acciones inhibitorias de la somatostatina sobre la secreción ácida estimulada por pentagastrina (Rossowski *et al.*, 1994).

Por lo tanto, puede concluirse que el receptor SSTR2 es el mediador de las acciones inhibitorias de la somatostatina sobre la secreción ácida gástrica en el ratón. Estas observaciones farmacológicas se confirman con los resultados obtenidos en animales SSTR2 *-/-*. En estos ratones, ni la infusión de somatostatina ni la de sus análogos SMS 201-995 o DC 32-87, a dosis efectivas inhibiendo la secreción en ratones de tipo salvaje, ni la del antagonista selectivo de los receptores SSTR2, PRL-2903, modificó la secreción ácida gástrica. Además, la infusión de los agonistas selectivos para los receptores SSTR1, 3, 4 o 5 careció también de efecto, al igual que se ha descrito anteriormente para los animales SSTR2 *+/+*, lo que indica que, en ausencia de receptores SSTR2 funcionales, no hay cambios compensatorios asociados a otros subtipos de receptores. De los resultados obtenidos, sin embargo, no puede deducirse por qué variante (a o b) del receptor SSTR2 están mediados los efectos de la somatostatina. Ello se debe a que en los ratones SSTR2 *-/-* empleados se ha eliminado el fragmento de DNAC que codifica para la forma larga del receptor (SSTR2a), que a su vez contiene la forma corta del mismo (SSTR2b) y, por lo tanto, ninguna de las dos variantes se expresa en estos animales (Patel *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1997).

Estudios previos muestran que, a pesar de las diferencias en secreción basal entre animales SSTR2 *+/+* y *-/-* anestesiados con uretano, los niveles plasmáticos de gastrina son similares en ambos grupos (Martínez *et al.*, 1998), sugiriendo que las diferencias en la tasa de secreción no se deben a una hipergastrinemia asociada a alteraciones en el feedback inhibitorio sobre células G dependiente de somatostatina (Schubert *et al.*, 1987; Vuyyuru *et al.*, 1995). En animales SSTR2 *-/-* anestesiados con uretano, la inmunoneutralización *in vivo* de la gastrina disminuyó la elevada tasa de secreción ácida gástrica basal hasta valores similares a los observados en animales SSTR2 *+/+*, sugiriendo que la elevada secreción basal es totalmente gastrina-dependiente. Otros mecanismos estimulantes de la secreción, principalmente la estimulación colinérgica, no parecen estar implicados en los cambios observados. Así, el bloqueo colinérgico con atropina no modificó la elevada tasa de secreción ácida basal en animales SSTR2 *-/-*, indicando que ésta es totalmente independiente del input colinérgico. Sin embargo, la administración del antagonista H2, cimetidina, disminuyó la tasa de secreción ácida basal en ratones SSTR2 *-/-* hasta valores similares a los del tipo salvaje y con un patrón similar al observado mediante la inmunoneutralización de la gastrina. Este resultado, junto a los efectos de la inmunoneutralización de la gastrina endógena, sugiere que la alta tasa de secreción basal de estos animales se debe a la estimulación directa de las células parietales dependiente de histamina liberada por la acción de la gastrina sobre las células ECL.

La elevada tasa de secreción basal de los animales SSTR2 *-/-* anestesiados con uretano no representa, sin embargo, la capacidad secretora máxima del estómago, ya que en estos animales se pueden observar respuestas estimulantes asociadas a los

secretagogos pentagastrina o histamina. La respuesta secretora neta a la histamina fue similar en animales SSTR2 $-/-$ y SSTR2 $+/+$; mientras que, por el contrario, la estimulación con pentagastrina fue mucho más efectiva en los animales SSTR2 $-/-$ que en los SSTR2 $+/+$. La respuesta a la pentagastrina en animales SSTR2 $-/-$ fue similar a la observada con histamina, lo que probablemente refleje una falta de acción de la somatostatina endógena liberada en respuesta a la presencia de gastrina (Schubert *et al.*, 1987; Vuyuru *et al.*, 1995) y asociada a la falta del receptor SSTR2. Además, esta diferencia entre los animales de tipo salvaje y los mutantes apoyaría un mecanismo de acción de la somatostatina mediado, preferentemente, por una acción inhibitoria sobre las células ECL, evitando la liberación de histamina. Esta respuesta hipersecretora a la gastrina o a la histamina exógena no se observa, sin embargo, cuando se induce la liberación endógena de estos mediadores con una comida normal (Ohning *et al.*, 1996, 1998; Martínez *et al.*, 2002); tal y como se desprende de los cambios de pH y de contenido gástrico de ácido en animales en estado postprandial. Esto, una vez más, sugeriría que en condiciones fisiológicas mecanismos alternativos a los dependientes de somatostatina tienden a normalizar las respuestas secretoras gástricas en los animales SSTR2 $-/-$.

Estudios en animales con modificaciones genéticas que afectan a los mecanismos de control de la secreción gástrica han demostrado que los cambios funcionales en la secreción se asocian, generalmente, a cambios morfológicos en la mucosa y en la abundancia relativa y características de las células secretoras de la misma (Samuelson y Hinkle, 2003). Los resultados obtenidos muestran que el estómago de los animales carentes del receptor SSTR2 presenta un desarrollo completamente normal sin ningún tipo de alteración macroscópica o microscópica de la pared gástrica. Estas observaciones indican que el receptor SSTR2 no desempeña funciones vitales en el desarrollo y mantenimiento de la mucosa gástrica o bien que existen mecanismos compensatorios que reemplazan al receptor resultando en un desarrollo morfológico completamente normal. Los estudios inmunohistoquímicos realizados muestran que la abundancia y distribución de células con inmunoreactividad de tipo gastrina (probablemente células G) es similar en ambos grupos de animales. Esta observación concuerda con que tanto los animales de tipo salvaje como los carentes en el receptor SSTR2 tengan niveles plasmáticos de gastrina similares y las respuestas secretoras a una comida normal sean también similares. El número de células con inmunoreactividad de tipo somatostatina (células D) fue similar entre ambos grupos en el fundus aunque en la zona antral se observó un menor número de células inmunoreactivas en los animales SSTR2 $-/-$ que en los de tipo salvaje. Sin embargo, esta diferencia no parece incidir en las respuestas secretoras en animales conscientes, ya que ambos grupos muestran una tasa de secreción ácida similar en periodos interdigestivos (ayunas) y una respuesta secretora a la ingestión de alimento también similar. En condiciones de ayuno se observó un mayor número de células con inmunoreactividad de tipo somatostatina que en animales alimentados *ad libitum*. Esta observación puede relacionarse con la acumulación de péptido en el interior celular

durante los periodos interdigestivos y su liberación (con la consiguiente pérdida de inmunoreactividad) en los periodos postprandiales. Cambios similares en la inmunoreactividad de tipo somatostatina se han descrito tras la infusión de gastrina exógena en el ratón, que actuaría estimulando células D e induciendo la liberación de somatostatina y, por lo tanto, la pérdida de inmunoreactividad (Zavros *et al.*, 2002c).

En ratones de tipo salvaje, la somatostatina inhibió la secreción ácida gástrica estimulada por pentagastrina con mayor eficacia que cuando ésta se estimuló con histamina. Teniendo en cuenta el mecanismo de acción de estos secretagogos (la histamina actúa directamente sobre células parietales, mientras que la gastrina tiene un efecto indirecto a través de la estimulación de células ECL) (Prinz *et al.*, 1999; Lindström *et al.*, 2001b) puede especularse que, en el ratón, la somatostatina inhibe la secreción ácida inhibiendo la liberación de histamina de células ECL y, en menor medida, por un efecto directo sobre las células parietales. Evidencias tanto morfológicas como funcionales apoyan este mecanismo de acción de la somatostatina. Estudios inmunohistoquímicos y de RT-PCR han determinado la presencia de receptores SSTR2 tanto en células parietales como en células ECL (Prinz *et al.*, 1994; Sternini *et al.*, 1997; Schindler y Humphrey, 1999). Confirmando estas observaciones, estudios recientes empleando un ratón "knockin", en el cual se sustituyó el gen del receptor SSTR2 por un gen marcador lacZ, lo que permite localizar exactamente los tejidos y tipos celulares que expresan este gen, han descrito la presencia de receptores SSTR2 en células parietales y ECL de la mucosa gástrica (Allen *et al.*, 2002). A nivel funcional, estudios realizados en estómago aislado de ratón, han demostrado que la somatostatina exógena disminuye la liberación de histamina y que la inmunoneutralización de la somatostatina endógena aumenta los niveles de la misma (Vuyyuru y Shubert, 1997), lo que sugiere un efecto directo sobre células ECL. De forma similar, en otros estudios utilizando un modelo experimental similar al anterior, la somatostatina inhibió la secreción ácida gástrica estimulada por pentagastrina, sin embargo, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente estudio, no modificó significativamente la respuesta secretora a histamina (Komasaka *et al.*, 2002); lo que de nuevo sugiere un efecto predominante sobre células ECL. Sin embargo, estudios *in vivo* en ratas muestran que la somatostatina inhibe con mayor eficacia la respuesta secretora a betanecol que a histamina (Aurang *et al.*, 1997); lo que sugiere que en esta especie la acción directa de la somatostatina sobre las células parietales es más importante en el control de la secreción que en el ratón. Además, en el mismo estudio, la somatostatina inhibió la liberación de histamina inducida por pentagastrina en aproximadamente un 40%, mientras que cuando la secreción se estimuló con betanecol la somatostatina no modificó los niveles de histamina sugiriendo, de nuevo, que su efecto inhibitorio se asocia a una acción directa sobre células parietales (Aurang *et al.*, 1997). De forma similar, estudios *in vitro* en mucosa gástrica aislada de rata, muestran que la somatostatina inhibe con una eficacia similar la secreción estimulada por pentagastrina o por estimulación directa de la célula parietal con el agonista H₂, dimaprit, (Wyatt *et al.*, 1996). Igualmente, estudios *in vitro* en segmentos de mucosa gástrica antral canina y

humana muestran que la somatostatina inhibe tanto la liberación de histamina como de gastrina (Zaki *et al.*, 1996). En conjunto, estos estudios junto a los resultados obtenidos aquí, sugieren que la somatostatina inhibe la secreción mediante, al menos, tres mecanismos: i) inhibición de la liberación de gastrina de células G (probablemente un efecto indirecto, ya que no hay evidencia de la existencia de receptores para somatostatina en estas células); ii) acción sobre células ECL inhibiendo la liberación de histamina; y iii) una acción inhibitoria directa sobre células parietales. Los resultados obtenidos sugieren, además, que existen variaciones especie-específicas en la importancia de estos mecanismos mediando las acciones de la somatostatina. Sin embargo, independientemente de la importancia relativa de cada vía, de la especie considerada y del modelo experimental empleado, todos los resultados obtenidos hasta el momento coinciden en que el receptor SSTR2 es el mediador común de las acciones antisecretoras de la somatostatina .

Estudios funcionales realizados en diferentes especies han demostrado que la somatostatina es un modulador fisiológico de la motilidad gastrointestinal. Sin embargo, su papel en la regulación de la motilidad gástrica no se conoce con exactitud. En la especie humana se ha observado que tanto la somatostatina como su análogo SMS 201-995, administrados periféricamente, tienen efectos tanto estimulantes (Johansson *et al.*, 1978; Fuessl *et al.*, 1987) como inhibitorios sobre el vaciamiento gástrico (Bloom *et al.*, 1975; Okamoto *et al.*, 1997). Estudios realizados mediante RT-PCR han demostrado que los cinco subtipos de receptores de la somatostatina se expresan en células de músculo liso de estómago (Corleto *et al.*, 1999). De forma similar, estudios mediante hibridación *in situ* han demostrado la presencia de ARNm para el receptor SSTR2 en el plexo mientérico y en la capa muscular externa (Krempels *et al.*, 1997), sugiriendo su implicación en el control de la actividad motora. A pesar de estas observaciones son escasos los estudios funcionales que describan qué tipos de receptores están implicados en las acciones periféricas de la somatostatina sobre la motilidad gástrica. En la rata se ha observado que la administración subcutánea de SMS 201-995 inhibe el vaciamiento gástrico (Smedh *et al.*, 1999), lo que sugiere una implicación de los receptores SSTR2, 3 y/o 5. El único estudio que emplea agonistas específicos para los receptores de somatostatina muestra que el agonista selectivo SSTR5, BIM-23052, administrado intracisternalmente estimula el vaciamiento gástrico en la rata, sin embargo cuando se administra periféricamente carece de efecto (Martínez *et al.*, 2000), lo que indica que este receptor participa a nivel central, pero no periférico, en las acciones motoras de la somatostatina. En este estudio, el empleo de animales carentes del receptor SSTR2 sirvió para determinar si este receptor participa en la regulación del vaciamiento gástrico en el ratón. Los resultados obtenidos muestran únicamente una tendencia a la disminución en la tasa de vaciamiento durante la primera hora tras la ingestión de una comida sólida nutritiva en animales SSTR2 *-/-*, sin observarse diferencias a las 2 o 4 h. En su conjunto, estos resultados sugieren que el receptor tipo 2 de la somatostatina no tiene un papel esencial en la regulación del

vaciamiento gástrico en el ratón o que, en su ausencia, mecanismos alternativos tienden a normalizar este proceso.

Conclusiones

Los resultados obtenidos utilizando animales modificados genéticamente (carentes del receptor SSTR2), la inmunoneutralización de la somatostatina endógena y la manipulación farmacológica de los receptores de somatostatina con agonistas selectivos y el antagonista de los receptores SSTR2, PRL-2903, demuestran que en el ratón la somatostatina inhibe periféricamente la secreción ácida gástrica a través de receptores SSTR2. La actividad antisecretora de la somatostatina frente a los secretagogos pentagastrina e histamina y la presencia de receptores SSTR2 en células ECL y en células parietales hace plausible la hipótesis de que la somatostatina regule la secreción ácida gástrica a través de un mecanismo paracrino que implica la inhibición directa de la célula parietal y la inhibición de la liberación de histamina de células ECL. El empleo sistemático de agonistas selectivos demuestra que los receptores SSTR1, SSTR3, SSTR4 y SSTR5, aunque presentes en el estómago, no parecen desempeñar un papel funcional en la regulación periférica de la secreción ácida gástrica. Por lo tanto, el receptor SSTR2 es el responsable directo de las acciones antisecretoras de la somatostatina en el estómago, mediando los efectos de la misma regulando la actividad secretora de las células ECL y parietales.

La falta del receptor SSTR2 no parece afectar al desarrollo del estómago ni al mantenimiento de una mucosa gástrica funcional, con una capacidad secretora igual a la de los animales de tipo salvaje. Los estudios inmunohistoquímicos muestran que las poblaciones celulares con inmunoreactividad de tipo gastrina (célula G) y de tipo somatostatina (células D) tiene una distribución idéntica en ambos grupos de animales. La cuantificación de las mismas sugiere una reducción en el número de células con inmunoreactividad de tipo somatostatina en la región antral, aunque el significado funcional de esta observación no está claro ya que las respuestas secretoras de estos animales parecen normales en situaciones fisiológicas, como es tras la ingestión de una comida estándar. En conjunto, estas observaciones sugieren que las señales derivadas de la interacción de la somatostatina con los receptores SSTR2 no afectan al crecimiento y diferenciación de la mucosa gástrica, ni de las diferentes poblaciones de células G y D y que mecanismos alternativos pueden compensar la falta de receptores SSTR2 y mantener la actividad secretora gástrica, en condiciones fisiológicas, dentro de unos márgenes similares a los observados en animales de tipo salvaje.

Además, el receptor SSTR2 no parece ser esencial en la regulación del vaciamiento gástrico o bien, mecanismos compensatorios suplen su falta normalizándolo.

3 - Interacción entre Somatostatina y Bombesina o PACAP en el Control de la Secreción Ácida Gástrica en el Ratón

3.1 - Antecedentes y objetivos

Como ya se ha mencionado previamente, la somatostatina se considera el principal inhibidor fisiológico de la secreción ácida gástrica. Sin embargo, otros neuropéptidos inhiben la secreción ácida con potencias comparables, o incluso superiores, a la de la somatostatina. El mecanismo de acción de la mayoría de estos péptidos no se conoce totalmente. Para algunos de ellos, estudios *in vitro* sugieren que la somatostatina podría actuar como el mediador de las respuestas inhibitorias observadas. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido adecuadamente evaluada, sobre todo en condiciones *in vivo*, que reflejan con mayor fiabilidad con respecto a otros modelos los mecanismos fisiológicos de control de la secreción ácida. Teniendo en cuenta ésto, este estudio se centra en la caracterización de los efectos sobre la secreción, y la posible interacción con la somatostatina, de los neuropéptidos bombesina y PACAP.

La bombesina y péptidos relacionados, como el GRP, regulan a nivel central y periférico la secreción ácida gástrica. Numerosos estudios han demostrado que la bombesina, actuando a nivel central, inhibe la secreción ácida gástrica en diferentes especies y modelos experimentales (Martínez y Taché, 2000). Sin embargo, la administración periférica de bombesina produce respuestas variables dependiendo de la especie considerada y del protocolo seguido en la administración del péptido. Se ha visto que la infusión intravenosa de bombesina en el gato, el perro y la especie humana estimula la secreción ácida gástrica (Helman y Hirschowitz, 1987; Bado *et al.*, 1989; Kovacs *et al.*, 1995; Hildebrand *et al.*, 2001). Sin embargo, los efectos son variables ya que, en el perro y en la especie humana, a dosis elevadas la bombesina inhibe la secreción (Helman y Hirschowitz, 1987; Walsh *et al.*, 1988). De forma similar, en la rata, la administración periférica de bombesina puede tanto inhibir como estimular la secreción ácida gástrica, dependiendo del protocolo seguido en la administración del péptido (Bertaccini *et al.*, 1973; Rossowski *et al.*, 1989; Sandvik *et al.*, 1989; Shubert *et al.*, 1991a; Martínez *et al.*, 1995). Las acciones estimulantes de la bombesina parecen ser gastrina-dependientes. Así, diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* muestran que la bombesina estimula la liberación de gastrina por acción directa sobre las células G (Sugano *et al.*, 1987; Kovacs *et al.*, 1995; Squires *et al.*, 1999). Sin embargo, estudios realizados *in vitro* en estómago aislado de rata y ratón demuestran que la bombesina también estimula la secreción de somatostatina (Sandvik *et al.*, 1989, 1997; Shubert *et al.*, 1989). En su conjunto, estas observaciones sugieren que las diferencias observadas en la respuestas secretoras pueden deberse a un balance entre las acciones estimulantes asociadas a la liberación de gastrina y las inhibitorias asociadas a la liberación de somatostatina (Sandvik *et al.*, 1989). A estos efectos hay que añadir la

posibilidad de una acción inhibitoria directa de la bombesina sobre las células parietales (Sandvik *et al.*, 1989; Shubert *et al.* 1991a,b).

Los efectos de la bombesina sobre la secreción ácida gástrica *in vivo* en el ratón no se han estudiado. Por lo tanto, en este estudio, en primer lugar, se han caracterizado las acciones de la bombesina sobre la secreción basal y estimulada por secretagogos. A continuación, se ha estudiado la implicación de la somatostatina en los efectos observados. Para ello se han bloqueado los efectos del péptido mediante su inmunoneutralización con anticuerpos específicos o interfiriendo su interacción con los receptores SSTR2, bien mediante el bloqueo farmacológico de los mismos con el antagonista selectivo PRL-2903, o bien por su eliminación mediante manipulación genética (ratones carentes del receptor SSTR2).

De forma similar a lo descrito para la bombesina, el PACAP modula la secreción ácida gástrica a través de mecanismos aún en discusión. Los estudios realizados *in vivo* hasta el momento sugieren que el PACAP inhibe la secreción ácida. Estudios *in vivo* en la rata muestran que la administración periférica de PACAP inhibe la secreción ácida gástrica, probablemente por efecto directo sobre la célula parietal (Mungan *et al.*, 1992, 1995). Sin embargo, estudios *in vitro* en estómago aislado de rata, sugieren que el PACAP inhibe la secreción ácida a través de un mecanismo mediado principalmente por la liberación local de somatostatina (Li *et al.*, 2000). Estudios *in vitro* en cultivos celulares primarios de estómago de rata, han demostrado que el PACAP estimula tanto la liberación de histamina de células ECL como la de somatostatina de células D (Zeng *et al.*, 1999; Lindström *et al.*, 2001b). Este mecanismo se ve parcialmente respaldado por estudios moleculares, mediante análisis por Western Blot y RT-PCR, que muestran la presencia del receptor de VIP/PACAP, PAC1, en células ECL (Zeng *et al.*, 1998). Estas observaciones han llevado a algunos autores a sugerir que el PACAP, actuando a través de estos receptores, estimularía la secreción ácida gástrica (Zeng *et al.*, 1999; Pisegna *et al.*, 2000). Sin embargo, sólo se han observado respuestas estimulatorias en condiciones en las que la somatostatina endógena se bloqueó mediante inmunoneutralización, sugiriendo que los efectos periféricos del péptido sobre la secreción ácida son el resultado de la estimulación simultánea de células ECL (histamina) y de células D (somatostatina) (Pisegna *et al.*, 2000).

Hasta la fecha, los efectos del PACAP sobre la secreción ácida gástrica sólo se han estudiado en la rata, desconociéndose sus acciones en otras especies. En el ratón, resultados obtenidos *in vitro* con VIP, perteneciente a la misma familia de péptidos que el PACAP y con actividad biológica sobre los mismos receptores, muestran que éste neuropéptido inhibe la secreción ácida y estimula la liberación de somatostatina (Schubert, 1991) sin embargo, se desconocen los efectos del PACAP. Así, de forma similar a lo expuesto anteriormente para la bombesina, en primer lugar, se han caracterizado los efectos del PACAP sobre la secreción ácida *in vivo* en el ratón, tanto en condiciones basales como durante la estimulación con secretagogos. Posteriormente, se ha estudiado la implicación de la somatostatina en los efectos observados. Para ello, se ha seguido la misma estrategia empleada para caracterizar la

interacción entre bombesina y somatostatina, interfiriendo el mecanismo de acción de la somatostatina en el estómago a diferentes niveles durante la administración exógena de PACAP.

3.2 - Resultados

3.2.1 - Efectos de la bombesina sobre la secreción ácida gástrica basal y estimulada por secretagogos en ratones SSTR2 +/+ y sobre la secreción basal en ratones SSTR2 -/-

De forma similar a lo descrito en el apartado 2.2.5, la secreción basal en animales SSTR2 +/+ anestesiados con uretano fue baja (0.08 ± 0.01 μ moles/10 min) y estable durante todo el periodo experimental. En estas condiciones, la infusión intravenosa de bombesina (10-40 μ g/kg/h, 1 h) no modificó la secreción ácida (Tabla IV.3.1).

Tabla IV.3.1. Efectos de la bombesina sobre la secreción ácida gástrica basal en animales SSTR2 +/+ y SSTR2 -/-.^a

		Bombesina (μ g/kg/h, iv)				
		Vehículo	10	15	20	40
		Secreción ácida (μ moles/60 min)				
SSTR2 +/+	Basal	0.61 \pm 0.03	0.65 \pm 0.06	0.45 \pm 0.07	0.58 \pm 0.12	0.51 \pm 0.06
	0-1 h	0.57 \pm 0.05	0.51 \pm 0.07	0.35 \pm 0.05	0.41 \pm 0.05	0.51 \pm 0.16
	N	3	4	4	4	4
SSTR2 -/-	Basal	12.61 \pm 3.68	12.04 \pm 0.47	11.54 \pm 3.06	14.01 \pm 3.76	11.84 \pm 0.3
	0-1 h	9.21 \pm 1.77	9.47 \pm 1.50	10.54 \pm 2.27	15.97 \pm 4.20	9.67 \pm 0.33
	N	6	4	6	6	5

^aTras un periodo basal, se administraron vehículo (suero fisiológico, 0.1 ml/h) o bombesina (10-40 μ g/kg/h) por vía intravenosa durante 1h (periodo 0-1 h); la secreción ácida se determinó a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento. Los datos representan los valores acumulados de secreción ácida en μ mol/h y están expresados como la media \pm SEM del número de animales indicado para cada tratamiento (N).

Cuando la secreción se estimuló con diferentes secretagogos, la bombesina inhibió de forma dosis-dependiente la respuesta secretora a los mismos, aunque con diferente potencia en función del secretagogo empleado (Figs. IV.3.1, IV.3.2 y IV.3.3).

La infusión intravenosa de pentagastrina estimuló la secreción ácida gástrica, alcanzándose una fase de meseta a los 30 min del comienzo de la misma. En animales tratados con vehículo, la fase de meseta fue estable durante el resto del tiempo de infusión, con una secreción media de 0.30 ± 0.06 $\mu\text{moles}/10$ min ($P < 0.05$ vs secreción basal: 0.12 ± 0.03 $\mu\text{moles}/10$ min; $n=6$; Fig. IV.3.1). La infusión de bombesina (10, 15 o 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) inhibió de forma dosis-dependiente la respuesta secretora a pentagastrina; con una reducción en la tasa neta de secreción del $27.7 \pm 8.9\%$ ($n=6$; $P > 0.05$ vs vehículo), $45.9 \pm 12.8\%$ (0.6 ± 0.16 $\mu\text{moles}/60$ min, $n=6$; $P < 0.05$ vs vehículo: 1.03 ± 0.3 $\mu\text{moles}/60$ min) y $85.4 \pm 8.7\%$ [0.06 ± 0.14 $\mu\text{moles}/60$ min, $n=6$; $P < 0.05$ vs vehículo; $F(4,23)=5.234$, $P=0.004$], respectivamente (Fig. IV.3.1).

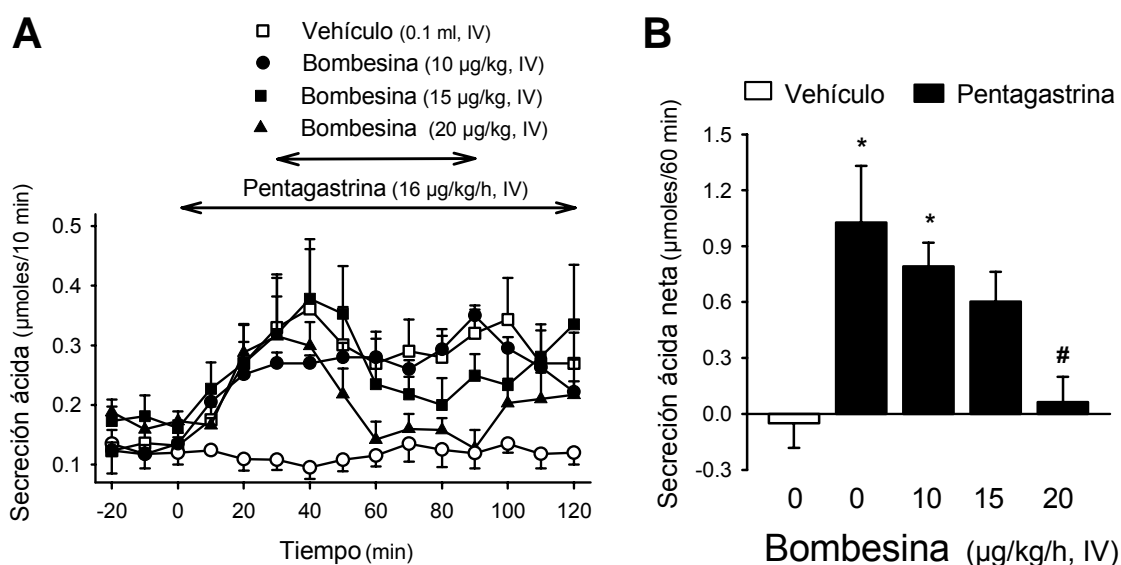


Figura IV.3.1. Efecto de la bombesina sobre la secreción ácida gástrica estimulada por pentagastrina. En animales SSTR2 $+/+$ anestesiados con uretano. Tras 30 min de periodo basal, la secreción ácida gástrica se estimuló con pentagastrina. A los 30 min del comienzo de la infusión se administró bombesina durante 60 min. La secreción ácida gástrica se determinó a intervalos de 10 min a lo largo todo el experimento. A: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo. La gráfica con círculos blancos representa la secreción ácida en animales tratados únicamente con vehículo. B: Cambios netos en la secreción ácida gástrica acumulada durante los 60 min de infusión de bombesina o de vehículo. Los datos representan la media \pm SEM de 6 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs vehículo; #: $P < 0.05$ vs pentagastrina + vehículo de bombesina [$F(4,23)=5.234$, $P=0.004$].

La histamina (5 mg/kg/h) estimuló la secreción ácida alcanzándose unos valores de secreción de 15 a 20 veces superiores a los basales a los 60 min del comienzo de la infusión (2.18 ± 0.43 $\mu\text{moles}/10$ min; $P < 0.05$ vs basal: 0.10 ± 0.01 $\mu\text{moles}/10$ min; $n=7$). La infusión de bombesina (20 o 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) inhibió la secreción estimulada por histamina en un $30.8 \pm 16.4\%$ (8.61 ± 2.04 $\mu\text{moles}/60$ min, $n=6$; $P > 0.05$ vs vehículo: 12.43 ± 2.41 $\mu\text{moles}/60$ min, $n=7$) y un $64.2 \pm 4.4\%$ [4.44 ± 0.54 $\mu\text{moles}/60$ min, $n=6$; $P < 0.05$ vs vehículo; $F(3,19)=7.702$, $P=0.001$], respectivamente (Fig. IV.3.2). La infusión de betanecol (0.6 mg/kg/h) estimuló la secreción ácida gástrica alcanzándose valores 12 veces superiores a los basales a los 30 min del comienzo de la misma (1.02 ± 0.16 $\mu\text{moles}/10$ min; $P < 0.05$ vs basal: 0.087 ± 0.01 $\mu\text{moles}/10$ min; $n=5$). La bombesina (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) inhibió la respuesta secretora al betanecol en un $48.8 \pm 13.9\%$ [3.16 ± 0.86 $\mu\text{moles}/60$ min, $n=4$; $P < 0.05$ vs vehículo: 6.51 ± 1.17 $\mu\text{moles}/60$ min; $F(2,10)=13.25$, $P=0.002$; Fig. IV.3.3].

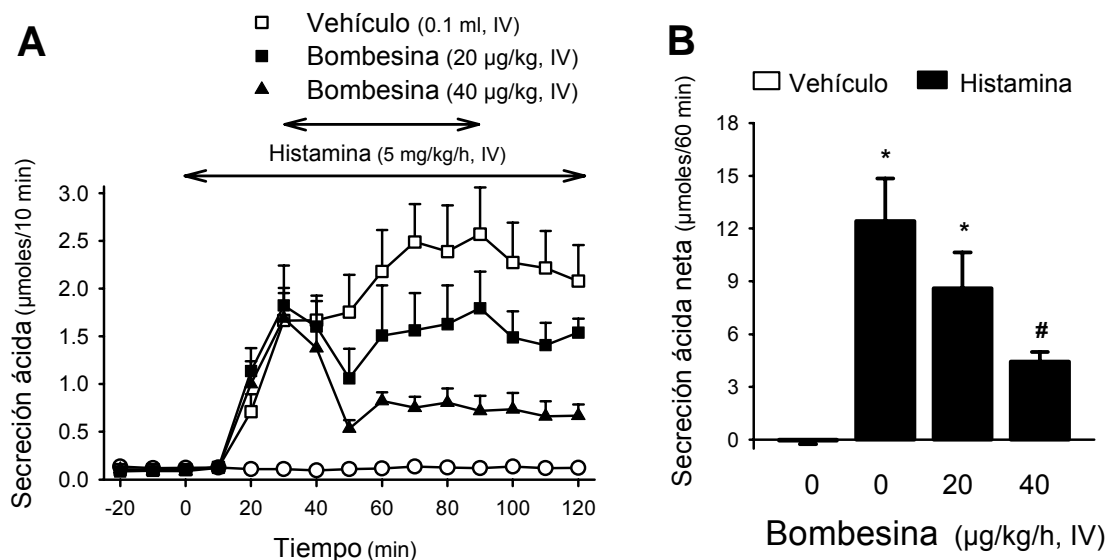


Figura IV.3.2. Efectos de la bombesina sobre la secreción ácida gástrica estimulada por histamina. El protocolo experimental es igual al descrito en la figura IV.3.1, pero en este caso se empleó histamina como secretagogo. A: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo. La gráfica con círculos blancos representa la secreción ácida en animales tratados únicamente con vehículo. B: Cambios netos en la secreción ácida gástrica acumulada durante los 60 min de infusión de bombesina o vehículo. Los datos representan la media \pm SEM de 6-7 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs vehículo; #: $P < 0.05$ vs histamina + vehículo [$F(3,19)=7.702$, $P=0.001$].

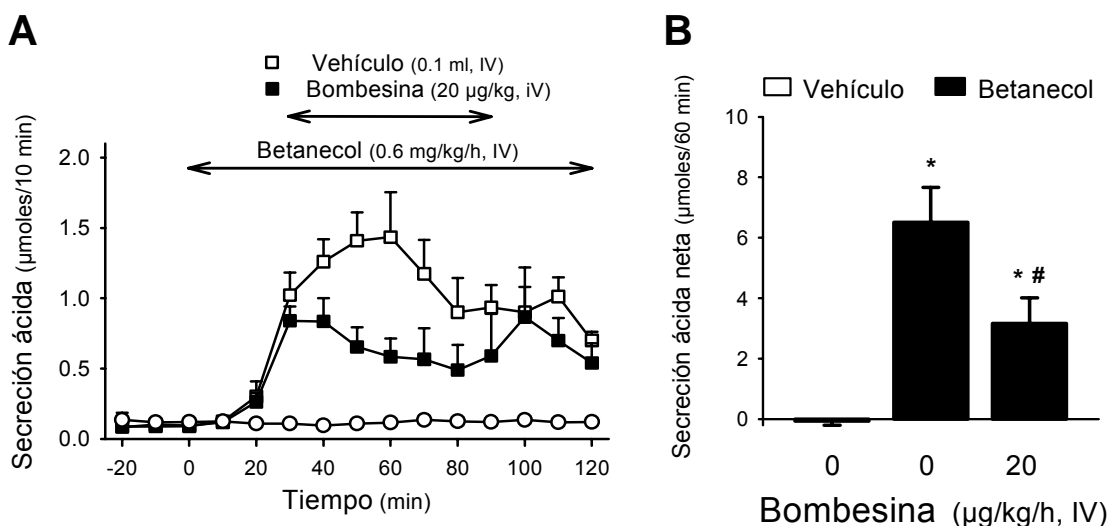


Figura IV.3.3. Efectos de la bombesina sobre la secreción ácida gástrica estimulada por betanecol. El protocolo experimental es igual al descrito en la figura IV.3.1, pero en este caso se empleó betanecol como secretagogo. A: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo. La gráfica con círculos blancos representa la secreción ácida en animales tratados únicamente con vehículo. B: Cambios netos en la secreción ácida gástrica acumulada durante los 60 min de infusión de bombesina o vehículo. Los datos representan la media±SEM de 4-5 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs vehículo; #: $P < 0.05$ vs betanecol + vehículo [$F(2,10)=13.25$, $P=0.002$].

En animales SSTR2 $-/-$, anestesiados con uretano, se observó, de forma similar a lo descrito anteriormente (véase el apartado 2.2.5), una tasa de secreción ácida gástrica basal entre 10 y 13 veces superior a la secreción basal observada en los animales SSTR2 $+/+$ en las mismas condiciones experimentales (SSTR2 $-/-$: 1.43 ± 0.1 µmoles/10 min, $n=11$; SSTR2 $+/+$ control: 0.12 ± 0.01 µmoles/10 min, $n=4$, $P < 0.05$). La infusión de bombesina (10, 15, 20 o 40 µg/kg/h, 1 h) no modificó la elevada tasa de secreción ácida gástrica basal característica de los animales SSTR2 $-/-$ (Tabla IV.3.1).

3.2.2 - Efectos de la bombesina sobre la secreción ácida gástrica en ratones SSTR2 $+/+$ tratados con anticuerpo anti-somatostatina o con el antagonista de los receptores SSTR2, PRL-2903

De forma similar a lo descrito anteriormente (véase el apartado 2.2.6), en animales SSTR2 $+/+$ la administración del anticuerpo monoclonal anti-somatostatina CURE S.6 (150 µg/ratón, iv) aumentó significativamente la secreción ácida gástrica basal alcanzando valores aproximadamente 4 veces superiores a los basales

($0.32 \pm 0.03 \mu\text{mol}/10 \text{ min}$; $P < 0.05$ vs basal: $0.07 \pm 0.02 \mu\text{mol}/10 \text{ min}$). En este caso, la infusión de bombesina ($20 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$, 1 h), a los 30 min de la administración del anticuerpo, no modificó la secreción ácida ($1.90 \pm 0.08 \mu\text{mol}/60 \text{ min}$, $n=5$) comparada con animales tratados con vehículo ($2.01 \pm 0.14 \mu\text{mol}/60 \text{ min}$, $n=5$; $P > 0.05$; Fig. IV.3.4).

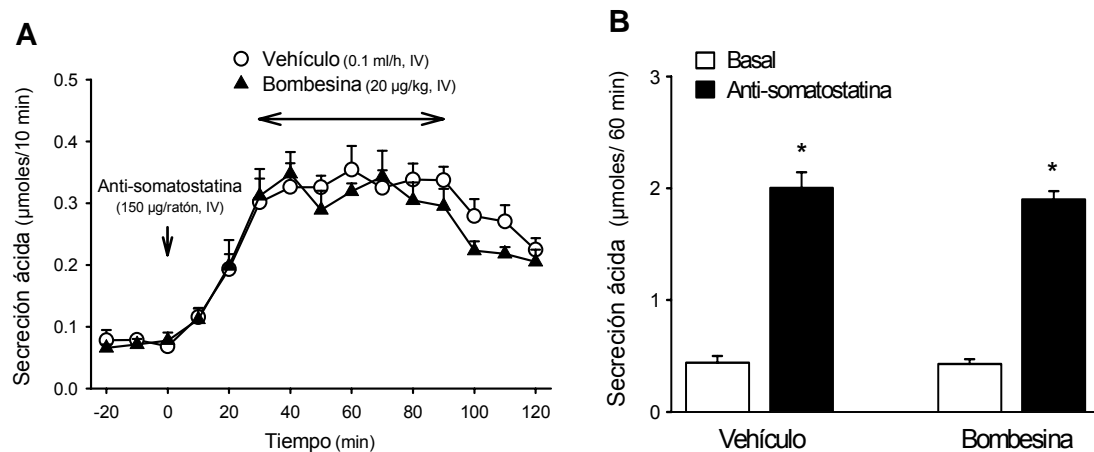


Figura IV.3.4. Efecto de la bombesina sobre la secreción ácida gástrica tras la inmunoneutralización de la somatostatina endógena en animales SSTR2 +/+. Tras un periodo basal de 30 min se administró el anticuerpo monoclonal anti-somatostatina CURE S.6 ($150 \mu\text{g}/\text{ratón}$, iv). A los 30 min se inició la perfusión intravenosa de bombesina o vehículo (1 h). La secreción ácida gástrica se determinó a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento. A: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo. B: Valores de secreción ácida acumulada para los diferentes tratamientos. Los datos representan la media \pm SEM de 5-6 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs secreción basal [$F(3,14)=50.423$, $P < 0.001$].

En animales SSTR2 +/+, la administración de PRL-2903 (bolus de $1.5 \text{ mg}/\text{kg}$ seguido de una infusión intravenosa continua, $1.5 \text{ mg}/\text{kg}/\text{h}$, durante 2 h) con vehículo resultó en una respuesta secretora similar a la descrita previamente (véase el apartado 2.2.10). La infusión de bombesina ($20 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$, iv) no modificó la respuesta secretora al PRL-2903 cuando se comparó con la observada en animales tratados con vehículo ($6.16 \pm 1.21 \mu\text{moles}/60 \text{ min}$, $n=5$; $P > 0.05$ vs PRL 2903 + bombesina: $6.17 \pm 0.80 \mu\text{moles}/60 \text{ min}$, $n=4$; Fig. IV.3.5).

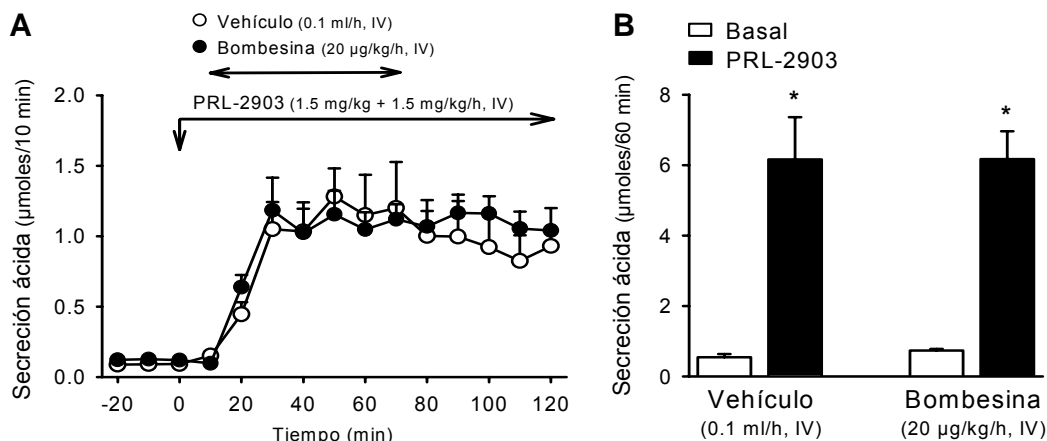


Figura IV.3.5. Efecto de la bombesina sobre la secreción ácida en animales SSTR2 +/+ tratados con el antagonista de los receptores SSTR2, PRL-2903. Tras un periodo basal de 30 min, se administró PRL-2903 (bolus de 1.5 mg/kg + infusión de 1.5 mg/kg/h durante 2 h), a los 10 min se inició una perfusión de bombesina o vehículo durante 1 h. La secreción ácida gástrica se determinó a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento. A: Cambios en la secreción ácida en función del tiempo. B: Secreción ácida acumulada durante el tiempo de infusión de la bombesina o el vehículo. Los datos representan la media \pm SEM de 4-5 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs secreción basal [$F(3,14) = 17.379$, $P < 0.001$].

3.2.3 - Efecto del PACAP-38 sobre la secreción ácida gástrica basal y estimulada por secretagogos en ratones SSTR2 +/+ y sobre la secreción basal en ratones SSTR2 -/-

En ratones SSTR2 +/+ el PACAP-38 (3-270 µg/kg, iv), administrado en forma de una infusión de 1 h, con dosis acumuladas crecientes, no modificó la baja tasa de secreción ácida gástrica basal observada durante la anestesia con uretano (Tabla IV.3.2). Por el contrario, en condiciones experimentales similares, la infusión intravenosa de PACAP-38 inhibió la secreción ácida gástrica estimulada por diferentes secretagogos.

En ratones SSTR2 +/+, la infusión de pentagastrina estimuló la secreción ácida basal alcanzando una fase de meseta a los 30 min, que correspondió a un aumento en la tasa de secreción de aproximadamente un 110% sobre los valores basales. En estas condiciones, la infusión intravenosa de PACAP-38 (45, 90 y 135 µg/kg/h, por 1 h) inhibió la respuesta secretora neta a la pentagastrina un $26.7 \pm 14.1\%$ (0.41 ± 0.01 µmoles/60 min, $n = 5$; $P > 0.05$ vs vehículo), un $47.2 \pm 16.7\%$ (0.32 ± 0.10 µmoles/60 min, $n = 5$; $P > 0.05$ vs vehículo) y un $91.1 \pm 8.2\%$ [0.05 ± 0.04 µmoles/60 min, $n = 6$; $P < 0.05$ vs vehículo: 0.60 ± 0.06 µmoles/60 min, $n = 7$; $F(4,24) = 6.839$, $P = 0.004$], respectivamente (Fig. IV.3.6).

Tabla IV.3.2. Efectos del PACAP-38 sobre la secreción ácida gástrica basal en animales SSTR2 +/+ y SSTR2 -/-.^a

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$, iv)	SSTR2 +/+	SSTR2 -/-
		(n=6)	(n=6)
		Secreción ácida ($\mu\text{moles}/60$ min)	
Basal	-	0.69 \pm 0.08	5.45 \pm 0.78
Vehículo	-	0.59 \pm 0.07	5.06 \pm 0.83
PACAP-38	3	0.65 \pm 0.12	4.85 \pm 0.93
	7	0.52 \pm 0.05	5.63 \pm 0.99
	22	0.58 \pm 0.04	6.30 \pm 1.25
	45	0.91 \pm 0.14	7.68 \pm 1.52
	135	0.62 \pm 0.10	7.85 \pm 1.86
	270	0.52 \pm 0.10	6.56 \pm 1.93

^aTras un periodo basal de 30 min, se administró vehículo (suero fisiológico, 0.1 ml, iv) seguido de infusiones de 1 h para dosis acumuladas crecientes de PACAP-38 (3-270 $\mu\text{g}/\text{kg}$, iv). La secreción ácida se determinó a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento. Los datos representan valores acumulados de secreción ácida en $\mu\text{mol}/60$ min, expresados como la media \pm SEM del número de animales indicado (n).

La infusión intravenosa de histamina (5 mg/kg/h, por 1 h) estimuló la secreción ácida basal alcanzándose, a los 30 min del inicio de la misma, valores de secreción aproximadamente 10 veces superiores a los basales (1.00 \pm 0.21 $\mu\text{moles}/10$ min; $P < 0.05$ vs basal: 0.09 \pm 0.01 $\mu\text{moles}/10$ min). El PACAP-38 (135 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) inhibió la secreción estimulada por histamina en un 39.7 \pm 7.9% [4.10 \pm 0.50 $\mu\text{moles}/60$ min; $P < 0.05$ vs vehículo: 6.91 \pm 1.10 $\mu\text{moles}/60$ min, n=5 para ambos grupos; $F(2,12)=19.852$, $P=0.020$; Fig. IV.3.7]. En iguales condiciones, la infusión de betanecol (0.6 mg/kg/h) estimuló la secreción ácida basal alcanzando una fase de meseta, aproximadamente, a los 40 min (0.86 \pm 0.27 $\mu\text{moles}/10$ min; $P < 0.05$ vs basal: 0.13 \pm 0.21 $\mu\text{moles}/10$ min). El PACAP-38 (135 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$, 1h) inhibió la respuesta secretora a betanecol en un 55.6 \pm 8.7% [2.90 \pm 0.60 $\mu\text{moles}/60$ min; $P < 0.05$ vs vehículo: 6.51 \pm 0.72 $\mu\text{moles}/60$ min, n=5 para ambos grupos; $F(2,12)=33.788$, $P < 0.001$; Figura IV.3.8].

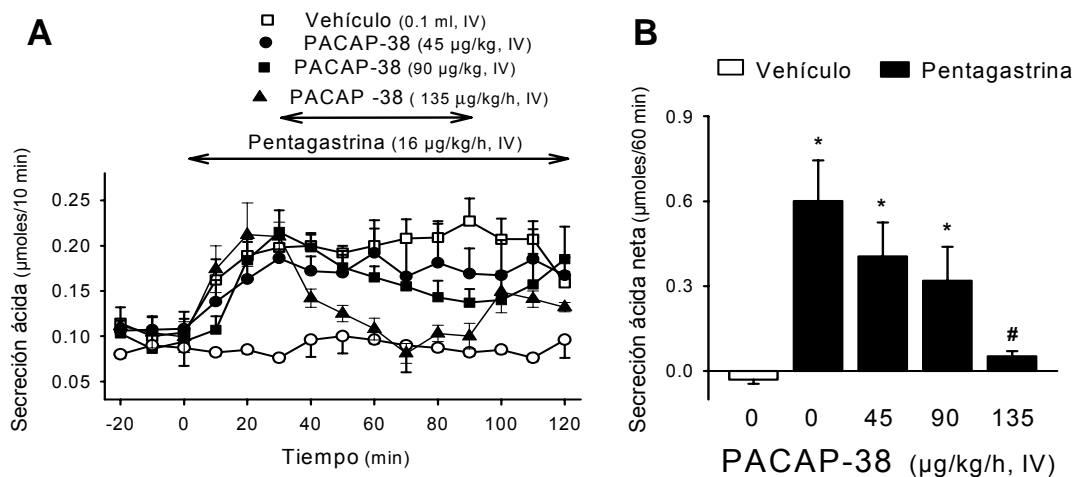


Figura IV.3.6. Efecto del PACAP-38 sobre la secreción ácida gástrica estimulada por pentagastrina en ratones SSTR2 +/+. En animales anestesiados con uretano, tras 30 min de periodo basal, la secreción ácida se estimuló con pentagastrina. A los 30 min se inició una infusión de PACAP-38 (1 h). La secreción ácida gástrica se determinó a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento. A: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo. La gráfica con círculos blancos representa la secreción en animales tratados sólo con vehículo. B: Secreción acumulada neta durante la infusión de PACAP-38 o de vehículo. Los datos representan la media±SEM de 5-7 animales por grupo. *: P<0.05 vs secreción ácida no estimulada; #: P<0.05 vs pentagastrina+vehículo [F(4,24)=6.839, P<0.001].

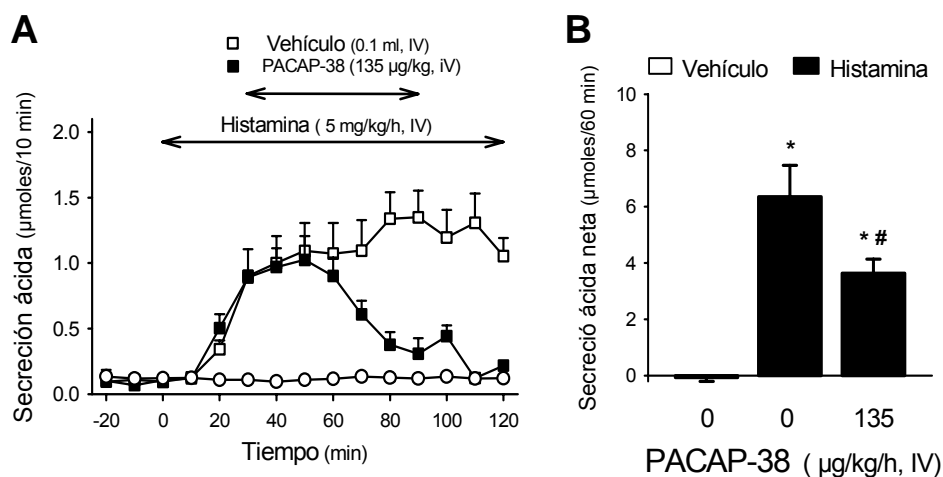


Figura IV.3.7. Efecto del PACAP-38 sobre la secreción ácida gástrica estimulada por histamina en ratones SSTR2 +/+. El protocolo experimental es igual al descrito en la figura IV.3.6, pero en este caso la secreción se estimuló con histamina. A: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo. La gráfica con círculos blancos representa la secreción en animales tratados sólo con vehículo. B: Secreción acumulada neta durante la hora de infusión de PACAP-38 o de vehículo. Los datos representan la media±SEM de 5 animales por grupo. *: P<0.05 vs secreción ácida no estimulada; #: P<0.05 vs histamina + vehículo [F(2,12)=19.852, P<0.05].

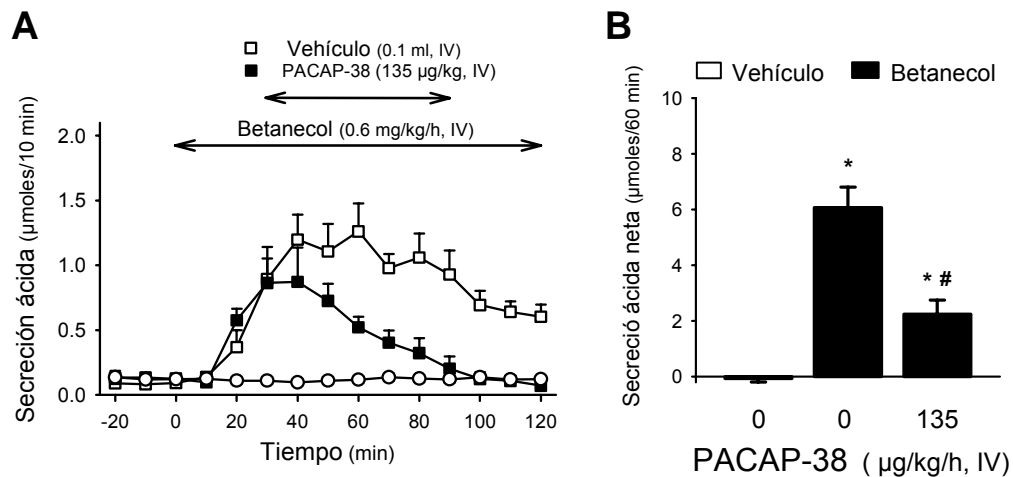


Figura IV.3.8. Efecto del PACAP-38 sobre la secreción ácida gástrica estimulada por betanecol en ratones SSTR2 +/+. El protocolo experimental es igual al descrito en la figura IV.3.6, pero en este caso la secreción se estimuló con betanecol (0.6 mg/kg/h). A: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo. La gráfica con círculos blancos representa la secreción en animales tratados sólo con vehículo. B: Secreción acumulada neta durante los 60 min de infusión de PACAP-38 o de vehículo. Los datos representan la media±SEM de 5 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs secreción ácida no estimulada; #: $P < 0.05$ vs betanecol + vehículo [$F(2,12)=33.788$, $P < 0.001$].

En animales SSTR2 -/- anestesiados con uretano, la administración de PACAP-38 (3-270 µg/kg), administrado en forma de infusiones de 1 h, con dosis acumuladas crecientes, no modificó la elevada tasa de secreción ácida gástrica basal (Tabla IV.3.2), aunque a dosis superiores a 22 µg/kg se observó una tendencia a incrementar la tasa de secreción, sin llegar a ser estadísticamente significativa. Comparada con la tasa basal, el PACAP-38 incrementó la secreción en un $3.2 \pm 18.8\%$, $15.5 \pm 22.8\%$, $40.9 \pm 27.8\%$, $43.8 \pm 33.1\%$ y $20.2 \pm 24.9\%$ a las dosis de 7, 22, 45, 135 y 270 µg/kg, respectivamente.

3.2.4 - Efectos del PACAP-38 sobre la secreción ácida gástrica en ratones SSTR2 +/+ tratados con anticuerpo anti-somatostatina o con el antagonista de los receptores SSTR2, PRL-2903

En animales SSTR2 +/+ anestesiados con uretano la administración del anticuerpo monoclonal anti-somatostatina, CURE S.6 (150 µg/ratón, i.v), estimuló la secreción ácida gástrica basal alcanzándose una fase de meseta a los 30 min, que

correspondió con un incremento de aproximadamente un 400% sobre los niveles basales de secreción (0.29 ± 0.02 $\mu\text{moles}/10$ min; $P < 0.05$ vs basal 0.08 ± 0.01 $\mu\text{moles}/10$ min). Esta fase en meseta se mantuvo estable a lo largo del resto del experimento. En estas condiciones experimentales, la infusión intravenosa de PACAP-38 (135 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$), a los 30 min de la administración del anticuerpo, no modificó la secreción ácida (2.20 ± 0.20 $\mu\text{moles}/60$ min, $n=5$) con respecto a la de animales tratados con vehículo (2.00 ± 0.14 $\mu\text{moles}/60$ min, $n=7$; $P > 0.05$; Fig. IV.3.9).

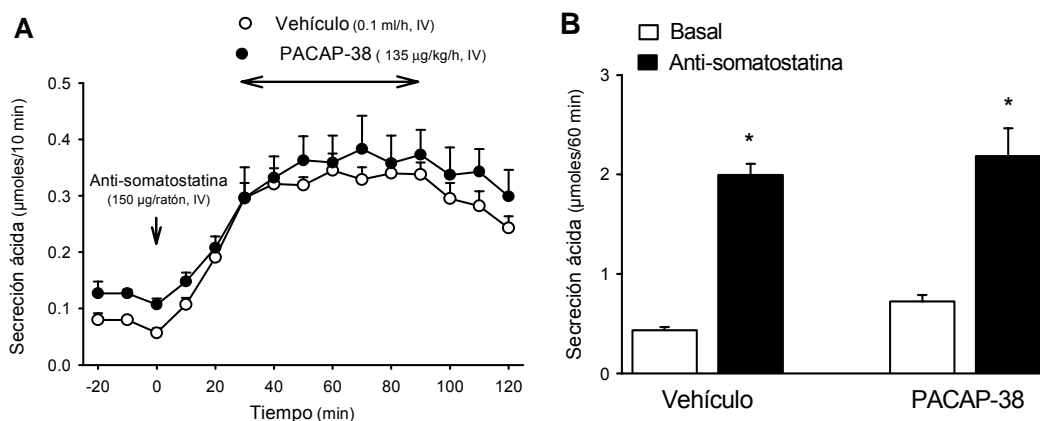


Figura IV.3.9. Efectos del PACAP-38 sobre la secreción ácida gástrica en animales SSTR2 +/+ tratados con el anticuerpo anti-somatostatina CURE S.6. En animales anestesiados con uretano, tras 30 min de periodo basal se administró el anticuerpo monoclonal anti-somatostatina CURE S.6 (150 $\mu\text{g}/\text{ratón}$). A los 30 min se inició la infusión intravenosa de PACAP-38 o vehículo, durante 60 min. La secreción ácida gástrica se determinó a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento. A: Cambios en la secreción ácida gástrica en función del tiempo. B: Valores acumulados de secreción para el periodo basal y el tiempo de infusión de PACAP-38. Los datos representan la media \pm SEM de 5-7 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs secreción basal [$F(3,20)=42.047$, $P < 0.001$].

En ratones SSTR2 +/+, la administración del antagonista de los receptores SSTR2, PRL-2903 (bolus de 1.5 mg/kg + infusión continua de 1.5 $\text{mg}/\text{kg}/\text{h}$, por 2 h), estimuló la secreción ácida gástrica basal alcanzando, a los 20 min de su administración, valores de secreción aproximadamente 14 veces superiores a los observados en condiciones basales (1.46 ± 0.10 $\mu\text{moles}/10$ min; $P < 0.05$ vs basal: 0.10 ± 0.01 $\mu\text{moles}/10$ min). Cuando en estas condiciones, se administró PACAP-38

(135 $\mu\text{g/kg/h}$, 1 h) no se observaron cambios en los efectos estimulantes asociados al PRL-2903 y la tasa de secreción fue similar a la observada en animales tratados con vehículo (PRL-2903 + vehículo: 7.53 ± 0.91 $\mu\text{moles/60 min}$, $n=5$; $P > 0.05$ vs PRL-2903 + PACAP-38: 7.89 ± 0.68 $\mu\text{moles/60 min}$, $n=6$; Fig. IV.3.10).

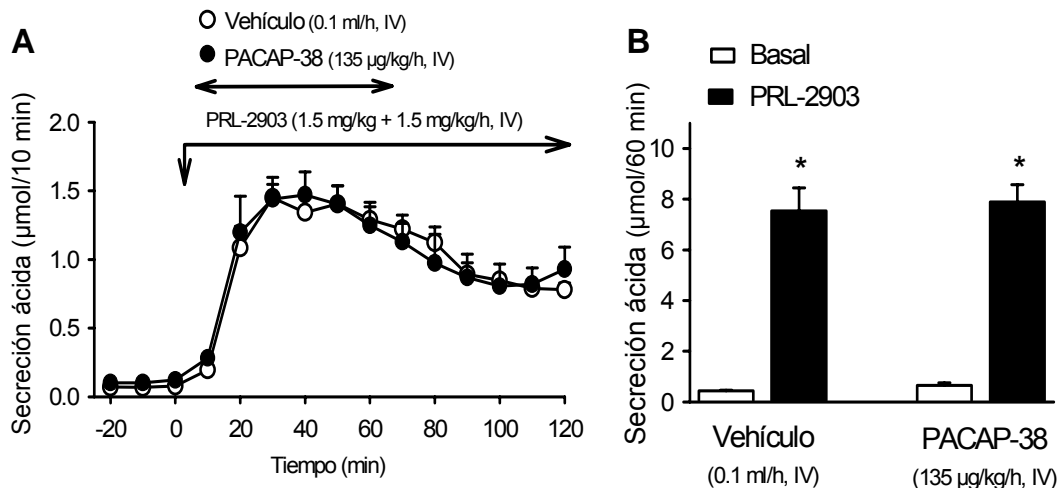


Figura IV.3.10. Efectos de PACAP-38 sobre la secreción ácida gástrica en animales SSTR2 +/+ tratados con el antagonista de los receptores SSTR2, PRL-2903. Tras un periodo basal de 30 min, los animales se trataron con PRL-2903 (bolus de 1.5 mg/kg + infusión de 1.5 mg/kg/h durante 2 h). A los 10 min del comienzo de la infusión de PRL-2903 se administró PACAP-38 o vehículo durante 1 h. La secreción ácida gástrica se determinó a intervalos de 10 min a lo largo de todo el experimento. A: Cambios en la secreción ácida en función del tiempo. B: Valores de secreción ácida acumulada durante el periodo basal o el tiempo de infusión del vehículo o del PACAP-38. Los datos representan la media \pm SEM de 5-6 animales por grupo. *: $P < 0.05$ vs secreción basal [$F(3,18)=41.466$, $P < 0.001$]

3.3 - Discusión

Los resultados obtenidos muestran que, al igual que en la rata, en el ratón la bombesina, administrada periféricamente, inhibe la secreción ácida gástrica estimulada por diferentes secretagogos; mientras que no se observan efectos sobre la secreción basal. Contrastando con esta observación, en estudios previos, realizados en estómago aislado de ratón, la bombesina inhibió de forma dosis-dependiente la secreción ácida basal (Schubert y Hightower, 1989). Estas diferencias pueden ser debidas al modelo experimental empleado, ya que *in vitro* la secreción basal fue superior (5.4 $\mu\text{moles/h}$) a

la observada *in vivo* en animales anestesiados con uretano (aproximadamente 1.0 $\mu\text{mol/h}$), lo que podría enmascarar respuestas de tipo inhibitorio.

Por otro lado, numerosos estudios en diferentes especies muestran que la bombesina, administrada periféricamente, inhibe la secreción ácida gástrica estimulada por diferentes secretagogos (Helman y Hirschowitz, 1987; Bado *et al.*, 1989; Martínez *et al.*, 1995). Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos en este estudio, en el que la bombesina inhibió de manera dosis dependiente la secreción ácida gástrica estimulada por los secretagogos pentagastrina, histamina o betanecol. Sin embargo, la potencia antisecretora de la bombesina parece ser diferente en rata y ratón. Así, en estudios realizados en ratas anestesiadas con uretano la bombesina, a dosis de 10 $\mu\text{g/kg/h}$, inhibió en un 50% la secreción ácida estimulada por pentagastrina (Martínez *et al.*, 1995); mientras que la misma dosis sólo inhibió en un 27% la respuesta secretora en el ratón. Estas diferencias podrían estar asociadas a variaciones de tipo especie-específicas. De la misma forma, la actividad antisecretora de la bombesina parece depender también del secretagogo empleado; con una eficacia pentagastrina > betanecol > histamina. Esta diferente potencia relativa de la bombesina inhibiendo la secreción ácida puede estar relacionada con el mecanismo de acción de la misma. La mayor eficacia frente a estimulantes de las células ECL (pentagastrina) que frente a estimulantes directos de la célula parietal (histamina) sugeriría que la bombesina actúa inhibiendo con mayor eficacia vías estimulantes que convergen en las células ECL que aquellas que actúan directamente sobre la célula parietal. Sin embargo, estos resultados no permiten excluir a ninguno de estos dos tipos celulares como dianas para la acción inhibitoria de la bombesina.

Los efectos antisecretores de la bombesina parecen estar mediados a través de la liberación de somatostatina y la activación de receptores SSTR2, como demuestran los resultados obtenidos. En primer lugar, las acciones inhibitorias de la bombesina sobre la secreción ácida estimulada con pentagastrina en animales SSTR2 +/+ fueron similares a las observadas para la somatostatina administrada exógenamente, tal y como se ha descrito anteriormente. En segundo lugar, la inmunoneutralización *in vivo* de la somatostatina endógena con el anticuerpo monoclonal anti-somatostatina, CURE S.6, previno los efectos antisecretores de la bombesina. De forma similar, el bloqueo farmacológico de los receptores SSTR2 con el antagonista selectivo PRL-2903 también previno completamente las acciones inhibitorias de la bombesina. Por último, la bombesina careció de efecto inhibitorio cuando se administró en animales SSTR2 -/- a dosis con efectos antisecretores en animales SSTR2 +/+. Estos resultados aportan un significado funcional a observaciones previas *in vitro* en una preparación de estómago aislado de ratón en la que la bombesina, aplicada exógenamente (Schubert y Hightower, 1989) o liberada endógenamente por estimulación de nervios intramurales (Schubert *et al.*, 1991a), indujo una liberación dosis-dependiente de somatostatina. Estudios posteriores en preparaciones aisladas de fundus y antro de rata han demostrado que la bombesina induce la liberación de somatostatina en ambas áreas gástricas mediante diferentes mecanismos (Schubert *et al.*, 1991b). En el fundus

gástrico, la bombesina libera somatostatina por interacción directa con receptores de bombesina/GRP (Schubert *et al.*, 1991b). De acuerdo con estas observaciones, la presencia de receptores para bombesina/GRP en células D se ha confirmado mediante técnicas autoradiográficas (Nakamura *et al.*, 1988) y por inmunohistoquímica en cultivos primarios de células fúndicas enriquecidos en células D (Schaffer *et al.*, 1997). Sin embargo, a pesar de que en el fundus gástrico hay abundantes fibras nerviosas con inmunoreactividad de tipo GRP, estas fibras sólo establecen contactos con células D muy ocasionalmente (Sjovall *et al.*, 1990); por lo que el mecanismo exacto por el que la bombesina/GRP actúa sobre las células D no está claro. Por el contrario, en el antro, la bombesina modularía la secreción de somatostatina indirectamente, a través de la liberación de gastrina (Schubert *et al.*, 1991b).

Los resultados obtenidos confirman, además, que los efectos inhibitorios de la somatostatina sobre la secreción ácida, asociados a la presencia de bombesina, están mediados por la activación de receptores SSTR2, tal y como se describe previamente en este trabajo. La implicación de los receptores SSTR2 como los mediadores de las respuestas antisecretoras generadas por la bombesina se deduce de dos observaciones. En primer lugar, el efecto inhibitorio de la bombesina se bloqueó completamente por el tratamiento con el antagonista selectivo de los receptores SSTR2, PRL-2903. En segundo lugar, la infusión de bombesina en ratones SSTR2 *-/-*, carentes del receptor de tipo 2 de la somatostatina, a dosis eficaces inhibiendo la secreción en animales de tipo salvaje, no modificó la característica elevada secreción basal observada durante la anestesia con uretano en estos animales.

Estos resultados contrastan con observaciones *in vivo* en la rata en las cuales el mecanismo de acción de la bombesina se desvincula de la somatostatina (Martínez *et al.*, 1995). En el estudio mencionado, la inmunoneutralización de la somatostatina endógena, utilizando el mismo anticuerpo empleado en este estudio, no bloqueó la acción inhibitoria de la bombesina ni sobre la secreción basal en ratas conscientes ni sobre la secreción estimulada con pentagastrina en ratas anestesiadas con uretano (Martínez *et al.*, 1995). A partir de estas observaciones, los autores concluyen que los efectos inhibitorios de la bombesina son independientes de la somatostatina. Estas diferencias entre rata y ratón no están relacionadas a una ineficacia del anticuerpo bloqueando la acción de la somatostatina en la rata, ya que en animales anestesiadas con uretano el tratamiento con el anticuerpo aumentó la secreción basal [por inmunoneutralización de la somatostatina endógena liberada por el anestésico (Yang *et al.*, 1990)], al igual que se observa en este estudio en el ratón, y bloqueó los efectos de la somatostatina exógena, tanto en animales anestesiados como en animales conscientes (Martínez *et al.*, 1995). En su conjunto, estas observaciones sugieren una inmunoneutralización eficaz del péptido en el tejido diana (estómago) así como en la circulación. Por lo tanto, esta variación en el mecanismo de acción de la bombesina podría deberse más bien a diferencias de tipo especie-específicas (rata vs ratón). Sin embargo, hay que destacar que aunque la inmunoneutralización de la somatostatina endógena en el ratón aumentó la secreción ácida gástrica basal dicho incremento fue

aproximadamente 3 veces inferior al alcanzado con el bloqueo farmacológico del receptor SSTR2 con PRL-2903, o con la delección del mismo (animales SSTR2 *-/-*). Por lo tanto, puede asumirse que la inmunoneutralización de la somatostatina endógena no es tan eficaz como otras manipulaciones (farmacológica/genética) bloqueando los efectos del péptido. Así, no se puede excluir que en la rata la liberación de somatostatina endógena inducida por bombesina no tuviese el mismo grado de inmunoneutralización que se logra en el ratón. De la misma forma, tampoco puede excluirse que, en la rata, el bloqueo farmacológico de los receptores SSTR2 pudiese ser más eficiente determinando el papel de estas vías en los efectos antiseoretos de la bombesina.

Además de sus acciones inhibitorias, varios estudios han demostrado que la bombesina puede también estimular la secreción ácida gástrica, dependiendo del régimen de administración y de la especie considerada. Por ejemplo, en el gato se ha observado que la administración intravenosa de bombesina a dosis bajas (81 pmol/kg/h, aproximadamente 0.13 µg/kg/h) estimula la secreción basal (Bado *et al.*, 1989). Estas acciones se han relacionado con la capacidad de la bombesina para actuar directamente sobre células G estimulando la liberación de gastrina y, por lo tanto, estimulando la secreción ácida. Así, en el perro y la especie humana, la infusión de dosis bajas de bombesina o de GRP resulta en un aumento paralelo en los niveles circulantes de gastrina y en la tasa de secreción ácida gástrica (Varner *et al.*, 1981; Walsh *et al.*, 1981; Hirschowitz y Molina, 1983). Sin embargo, aumentos en las dosis de bombesina no se acompañan de incrementos paralelos en la tasa de secreción, y en ocasiones incluso hay una tendencia a la inhibición, a pesar de que los niveles de gastrina se mantienen elevados. Efectos similares se han descrito también en la rata, especie en la cual, en determinados protocolos experimentales, la bombesina puede inducir respuestas estimulantes (Rossowski *et al.*, 1989; Sandvik *et al.*, 1989; Weigert *et al.*, 1996). Estos resultados sugieren que la bombesina/GRP libera no sólo un estimulante de la secreción (gastrina) sino también un factor inhibitorio y que los efectos finales sobre la secreción dependerían de un balance entre las acciones estimulantes y las acciones inhibitorias de estos mediadores. En este estudio, la infusión intravenosa de bombesina no modificó la secreción basal en animales de tipo salvaje lo que puede interpretarse como resultado del balance comentado anteriormente entre acciones inhibitorias y acciones estimulantes. Igualmente, cuando la secreción se estimuló con secretagogos sólo se observaron respuestas de tipo inhibitorio, tal y como se ha comentado anteriormente; lo que puede sugerir un predominio de los mecanismos inhibitorios sobre los estimulantes.

Si efectivamente las respuestas secretoras a la bombesina dependen de un balance entre las acciones estimulantes de la gastrina y las inhibitorias de la somatostatina cabría esperar que la eliminación de los efectos de la somatostatina desenmascarase una respuesta estimulante asociada a la activación de células G. Sin embargo, la eliminación del componente inhibitorio dependiente de somatostatina, o bien con el empleo de animales SSTR2 *-/-* o mediante el bloqueo farmacológico del

receptor SSTR2 con el antagonista selectivo, PRL 2903, en animales de tipo salvaje, no reveló ningún tipo de respuesta hipersecretora asociada a la administración de bombesina. En estas condiciones experimentales, en las que se eliminan los efectos de la somatostatina, los animales alcanzan unos niveles de secreción similares a las respuestas observadas durante la administración de histamina. Esto podría sugerir que en estas condiciones se ha alcanzado la capacidad secretora máxima del estómago y que por lo tanto es imposible observar respuestas estimulantes asociadas a la liberación de gastrina. Sin embargo, durante el tratamiento con el anticuerpo anti-somatostatina, en el que los niveles de secreción ácida alcanzados son significativamente más bajos que con el bloqueo de los receptores SSTR2, la bombesina tampoco estimuló la secreción ácida gástrica. Además, tal y como se ha demostrado anteriormente, en animales SSTR2 *-/-* tanto la pentagastrina como la histamina son capaces de estimular la secreción, a pesar de la elevada tasa de secreción basal observada durante la anestesia con uretano; lo que sugiere que en estos animales no se ha alcanzado aún la capacidad secretora máxima del estómago. Estas observaciones, en su conjunto, sugieren que, en el ratón, la bombesina no modula los mecanismos estimulantes de la secreción ácida gástrica y, por lo tanto, los efectos de este neuropéptido sobre la secreción se deben únicamente a acciones dependientes de la liberación de somatostatina y la consiguiente activación de receptores SSTR2 (Fig. IV.3.11).

Razonamientos similares a los expuestos anteriormente para la bombesina se han empleado para estudiar la posible implicación de la somatostatina en el mecanismo de acción del PACAP. Las acciones del PACAP sobre la secreción ácida gástrica han sido poco estudiadas, y únicamente en la rata. Hasta el momento, los estudios realizados en ratón se han centrado en la caracterización de las acciones del PACAP sobre el control de la función endocrina pancreática (Inagaki *et al.*, 1994, 1996).

Los estudios realizados *in vivo* en la rata sugieren que, administrado periféricamente, el PACAP inhibe la secreción ácida, tanto basal como estimulada, aunque el mecanismo de acción no se conoce con exactitud (Mungan *et al.*, 1992, 1995). Observaciones *in vivo* sugieren un posible efecto directo sobre la célula parietal (Mungan *et al.*, 1995), sin embargo, estudios *in vitro* sugieren que los efectos del PACAP están mediados principalmente a través de la liberación de somatostatina (Li *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos demuestran que, al igual que en la rata, en el ratón, el PACAP, administrado periféricamente, inhibe la secreción ácida gástrica estimulada por diferentes secretagogos, sin modificar la secreción basal. Estudios realizados *in vivo* en ratas concientes muestran que dosis elevadas de PACAP (225 µg/kg) inhiben la secreción ácida basal (Mungan *et al.*, 1995). Sin embargo, en el presente estudio, el PACAP, a dosis de hasta 270 µg/kg no modificó la secreción basal en animales SSTR2 *+/+*. Estas diferencias se podrían deber, una vez más, al modelo experimental empleado; ya que debido a la baja secreción basal observada durante la anestesia con uretano es difícil observar respuestas inhibitorias. Por otro lado, los resultados obtenidos cuando se estudió el efecto del PACAP sobre la secreción estimulada

coinciden, sin embargo, con los obtenidos en la rata. En esta especie, tanto *in vivo* como *in vitro*, el PACAP inhibió la secreción estimulada por diferentes secretagogos (pentagastrina, histamina y carbacol) (Mungan *et al.*, 1992, 1995; Li *et al.*, 2000) con una potencia similar a la observada en este estudio. En el ratón, la potencia del PACAP inhibiendo la secreción estimulada por secretagogos fue pentagastrina > histamina ~ betanecol; lo que coincide con lo observado en ratas conscientes con fístulas gástricas crónicas, pero difiere de lo observado en animales con el píloro ligado, en los que los efectos secretores del carbacol no fueron modificados por el PACAP (Mungan *et al.*, 1992, 1995). En su conjunto, estas observaciones sugieren que, tanto en la rata como en el ratón, el PACAP ejerce sus efectos antiseoretos interfiriendo la acción estimulante de la gastrina sobre las células ECL y, en menor medida, por efecto directo sobre la célula parietal. Apoyando esta doble acción del PACAP se ha demostrado la presencia de receptores funcionales para PACAP en células ECL (Zeng *et al.*, 1996, 1999; Pisegna *et al.*, 2000) y se ha sugerido su existencia en células parietales (Healey *et al.*, 1998).

De nuevo, los efectos observados en animales SSTR2 *-/-*, mediante el bloqueo farmacológico del receptor SSTR2 o tras la inmunoneutralización de la somatostatina endógena sugieren que las acciones del PACAP son somatostatina- y SSTR2-dependientes. En primer lugar, la somatostatina y el PACAP, administrados por vía intravenosa, inhiben la secreción ácida gástrica estimulada por pentagastrina en animales SSTR2 *+/+*, mientras que ninguno de los dos péptidos modifica la secreción en animales SSTR2 *-/-*. Por otro lado, el anticuerpo anti-somatostatina, CURE S.6, previno completamente las acciones antisecretoras del PACAP, y lo mismo sucedió cuando se empleó el antagonista de los receptores SSTR2, PRL-2903. Estos resultados coinciden con estudios recientes realizados en estómago aislado de rata, en los que la inmunoneutralización de la somatostatina revirtió en un 80% los efectos inhibitorios del PACAP (Li *et al.*, 2000). Sin embargo, discrepan de estudios realizados en ratas conscientes con el píloro ligado, en los cuales un anticuerpo antisomatostatina no bloqueó las acciones inhibitorias del PACAP (Mungan *et al.*, 1995). En dicho estudio, la eficacia del anticuerpo utilizado se demuestra por el cambio, incremento, en los niveles circulantes de gastrina; sin embargo, los autores no muestran cambios en la secreción ácida asociadas a las variaciones hormonales; con lo cual es difícil determinar si el anticuerpo alcanza concentraciones tisulares, tanto en antro como en fundus, suficientes para bloquear de forma efectiva la liberación y el efecto local de la somatostatina. Por otro lado, la ineficacia de la inmunoneutralización frente a los efectos del PACAP es semejante a la observada, también en la rata, cuando la misma técnica se empleó para determinar la implicación de la somatostatina en el mecanismo de acción de la bombesina (Martínez *et al.*, 1995). En su conjunto, estos resultados negativos podrían sugerir la existencia de características especie-específicas que hacen que en la rata, a diferencia del ratón, la inmunoneutralización *in vivo* no sea la técnica más adecuada para la caracterización de este tipo de mecanismos locales de acción.

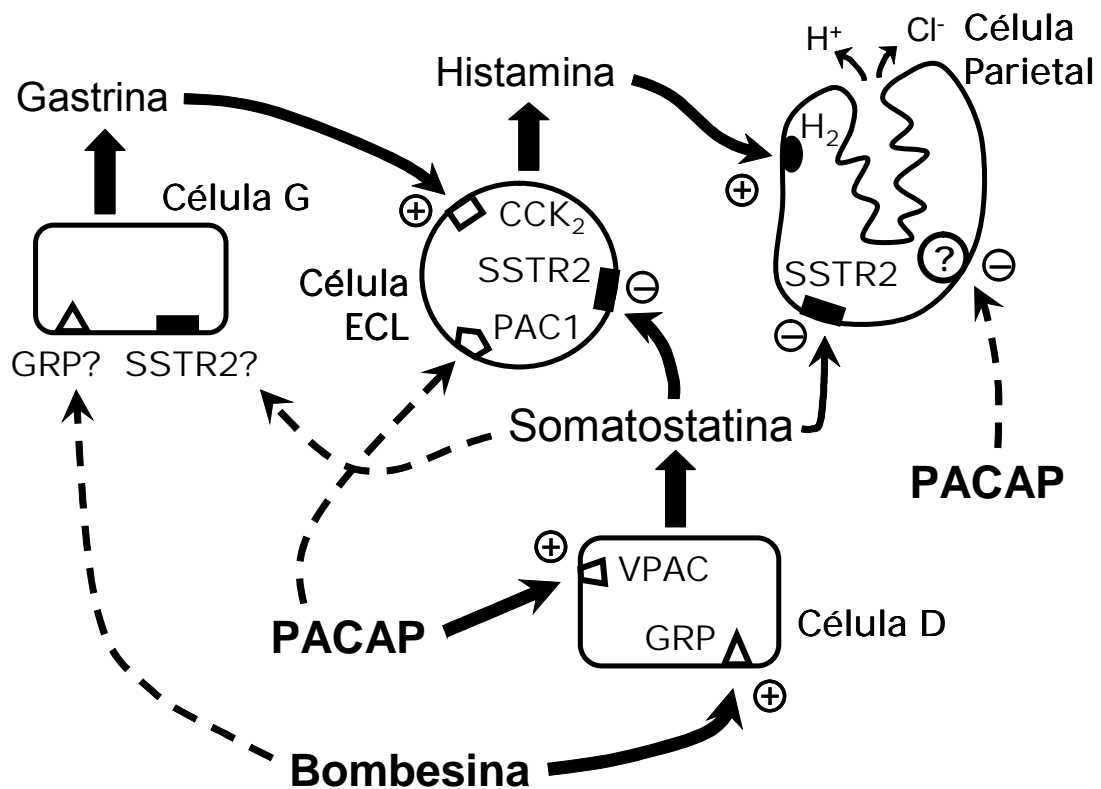


Figura IV.3.11. Modelo representativo del mecanismo de acción de la bombesina y del PACAP en la regulación de la secreción ácida gástrica *in vivo* en el ratón. Tanto la bombesina como el PACAP estimularían la liberación de somatostatina de células D, actuando a través de receptores para GRP y de receptores para PACAP del tipo VPAC, respectivamente. A su vez, la somatostatina actuaría sobre receptores SSTR2 localizados en células ECL, inhibiendo la liberación de histamina, y en células parietales inhibiendo directamente la secreción ácida. Las líneas discontinuas muestran posibles mecanismos de acción de la bombesina, el PACAP y la somatostatina, según se ha descrito para otras especies a partir de estudios tanto *in vivo* como *in vitro*; sin embargo, los resultados obtenidos en estos estudios no apoyan su presencia en el ratón.

Estudios *in vitro* en estómago aislado de rata y en antro porcino sugieren que el PACAP estimula la liberación de somatostatina (Li *et al.*, 2000; Tornøe *et al.*, 2001). Aunque en el presente estudio no se han determinado los niveles de somatostatina, los resultados obtenidos *in vivo* apoyan estas observaciones y aportan un significado funcional a las mismas. De acuerdo con estas observaciones, se ha demostrado que el PACAP estimula de manera dosis dependiente la liberación de somatostatina en cultivos de células D fúndicas de rata, lo que sugiere una acción directa del péptido

sobre las mismas (Zeng *et al.*, 1996, 1999). Además, PACAP y VIP mostraron una eficacia similar estimulando la liberación de somatostatina, lo que sugiere que dicho efecto está mediado a través del receptor común PACAP/VIP, VPAC (Zeng *et al.*, 1999; Zeng y Sachs, 2002). De acuerdo con estas observaciones, estudios *in vitro* han demostrado que el VIP estimula la liberación de somatostatina en preparaciones aisladas de estómago de ratón (Schubert, 1991). Por lo tanto, se podría deducir que, en el ratón, tanto el VIP como el PACAP actúan preferentemente estimulando la liberación de somatostatina a través de un mecanismo que implicaría la activación de un receptor común del tipo VPAC localizado en células D. Aunque en el presente estudio no se han valorado los niveles de somatostatina, los resultados obtenidos están de acuerdo con una acción del PACAP induciendo la liberación de esta hormona.

Estudios *in vitro*, en preparaciones aisladas de estómago y en cultivos celulares primarios enriquecidos en células ECL de rata muestran, además, que el PACAP estimula la liberación de histamina por acción directa sobre células ECL (Zeng *et al.*, 1999, Lindström *et al.*, 2001a, b; Sandvik *et al.*, 2001). Corroborando estas observaciones, estudios moleculares mediante análisis por Western Blot y RT-PCR han demostrado la presencia del receptor de PACAP, PAC1, en células ECL (Zeng *et al.*, 1998, 1996). Estas observaciones sugieren que el PACAP podría estimular la secreción ácida gástrica a través de la liberación de histamina de células ECL. Sin embargo, pocos estudios *in vivo* han podido demostrar un efecto estimulante del PACAP sobre la secreción ácida, y sólo en condiciones en las que se inmunoneutralizó la somatostatina endógena se observaron aumentos en la secreción asociados a la administración del péptido (Zeng *et al.*, 1999; Pisegna *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que el PACAP modularía la secreción ácida gástrica mediante un doble mecanismo dependiente de la liberación de histamina de células ECL y de la liberación de somatostatina de células D. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio discrepan con esta hipótesis. En ningún caso la infusión intravenosa de PACAP estimuló la secreción ácida basal en los animales SSTR2 +/+. Además, cuando en estos animales se eliminaron los mecanismos inhibitorios dependientes de la somatostatina, mediante inmunoneutralización del péptido o por bloqueo farmacológico de los receptores SSTR2, no se observaron respuestas estimulatorias asociadas a la infusión de PACAP. Finalmente, la administración PACAP en ratones SSTR2 -/-, en los cuales las vías inhibitorias dependientes de somatostatina son afuncionales, produjo únicamente un incremento moderado de la secreción ácida, sin alcanzar valores estadísticamente significativos. En estómago aislado de ratón, se ha visto que el VIP, que media sus acciones biológicas por los mismos receptores que el PACAP, produce un aumento leve (~21%) y transitorio (~5 min) de la secreción ácida (Schubert, 1991). Esta respuesta es similar a la observada en animales SSTR2 -/- en los que el PACAP mostró una tendencia a estimular la secreción basal. Sin embargo, ese efecto no se observó cuando se bloqueó el receptor SSTR2 con PRL-2903 o cuando se bloqueó la acción de la somatostatina endógena por inmunoneutralización. La falta de acciones estimulantes del PACAP podría asociarse a un efecto del anestésico sobre las células

ECL. Así, estudios *in vitro* en células ECL aisladas de rata sugieren que el uretano reduce la actividad secretora de las mismas (Norlén *et al.*, 2000). Sin embargo, estudios similares en estómago aislado de rata sugieren que el efecto inhibitorio del uretano sobre la liberación de histamina de las células ECL es negligible comparado con el de otros anestésicos (Cui *et al.*, 2002), lo que indicaría que la falta de respuestas estimulantes no se debe a un efecto del anestésico a nivel de la célula ECL. Por lo tanto, en conjunto, en el ratón y en las condiciones experimentales empleadas en estos estudios, estos resultados no apoyan una acción directa del PACAP sobre células ECL induciendo la liberación de histamina y cuestionan la relevancia fisiológica de las observaciones realizadas *in vitro* en el estómago aislado de ratón (Schubert, 1991).

En resumen, tanto la bombesina como el PACAP inhiben la secreción ácida gástrica estimulada en el ratón, sin que haya evidencias claras de que puedan participar también en respuestas de tipo estimulante. Los efectos observados en animales SSTR2 $-/-$ o mediante el bloqueo farmacológico del receptor SSTR2 o la inmunoneutralización de la somatostatina endógena en animales SSTR2 $+/+$ sugieren que las acciones de ambos péptidos están mediadas a través de la liberación de somatostatina y la consiguiente activación de receptores SSTR2 (Fig. IV.3.11).

Diferentes estudios han establecido un vínculo funcional entre la somatostatina y varios neuropéptidos con actividad biológica antisecretora. Por ejemplo, se ha demostrado que el polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP), el polipéptido asociado al glucagón (GLP), la amilina o la adrenomedulina inhiben la secreción ácida en la rata a través de mecanismos dependientes, total o parcialmente, de la liberación de somatostatina (Briard *et al.*, 1997). Algunas de estas observaciones han sido confirmadas en estudios *in vitro* en estómago aislado de ratón. Así, por ejemplo, empleando este modelo *in vitro* se ha demostrado que la amilina estimula la liberación de somatostatina e inhibe la liberación de histamina (Zaki *et al.*, 2002). Estas observaciones, junto con los resultados obtenidos en estos estudios, sugieren que la célula D podría actuar como una célula diana común para diversos neuropéptidos gastrointestinales que regulan la secreción ácida gástrica. De esta forma, la célula D se comportaría como un centro integrador de señales de tipo inhibitorio, cuya estimulación se traduciría en la liberación de somatostatina y la consiguiente activación de receptores SSTR2 en células ECL y parietales, lo que resultaría en una inhibición de la secreción ácida.

Conclusiones

En conjunto, los resultados obtenidos, demuestran que en el ratón, al igual que se ha demostrado previamente para otras especies, tanto la bombesina como el PACAP actúan periféricamente inhibiendo la secreción ácida gástrica estimulada por diferentes secretagogos; sin que haya evidencias de que participen en respuestas estimulantes. La actividad inhibitoria frente a los secretagogos empleados (gastrina $>$ histamina \geq betanecol) sugiere que ambos péptidos actúan a través de un mecanismo que implica

la inhibición de la liberación de histamina de células ECL, aunque no puede descartarse cierto efecto sobre células parietales.

Además, los resultados obtenidos utilizando animales modificados genéticamente, una aproximación farmacológica (bloqueo de los receptores SSTR2) y la inmunoneutralización de la somatostatina demuestran que los efectos de ambos péptidos están mediados a través de la liberación de somatostatina y la consiguiente activación de receptores SSTR2. La presencia de receptores para bombesina/GRP y para PACAP en las células D hace plausible la hipótesis de un efecto directo de estos péptidos sobre la célula D estimulando la liberación de somatostatina, que a su vez actuaría localmente sobre receptores SSTR2, localizados en células ECL y también en células parietales, inhibiendo la secreción ácida (Figura IV.3.11).

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que otros neuropéptidos inhibidores de la secreción ácida gástrica, como el GLP, la adrenomedulina o la amilina, tienen mecanismos de acción total o parcialmente dependientes de somatostatina. Estas observaciones junto a los resultados obtenidos en estos estudios permiten hipotetizar qué la célula D podría funcionar como un centro de integración de señales de tipo inhibitorio que serían, con independencia de su origen, traducidas en un mecanismo inhibitorio común, mediado localmente por la somatostatina.

V – DISCUSIÓN GENERAL

En su conjunto, los estudios realizados se han centrado en la caracterización de mecanismos de control de la secreción ácida gástrica en el ratón, *in vivo*, en diferentes situaciones experimentales, incluyendo el empleo tanto de animales normales como de animales con potenciales alteraciones en la función gástrica y sus mecanismos de control, como es el caso de la irritación química con yodoacetamida o la manipulación genética dirigida a interferir factores directamente implicados en la regulación de la función gástrica, en este caso el receptor de tipo 2 de la somatostatina. Estos estudios confirman la utilidad del ratón como un modelo experimental adecuado para el estudio de los mecanismos de control de la secreción ácida, tanto en condiciones normales como fisiopatológicas. En este sentido, los resultados obtenidos corroboran y completan observaciones previas obtenidas tanto en el ratón como en otras especies empleando diferentes modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*.

Los resultados obtenidos confirman el papel esencial que desempeñan la somatostatina y el receptor SSTR2 en el control de la secreción ácida gástrica. Esta conclusión se desprende de las observaciones realizadas en animales anestesiados con uretano y de la manipulación tanto farmacológica como genética de los receptores SSTR2. Por primera vez, se ha determinado de forma sistemática la implicación relativa de los diferentes subtipos de receptores de somatostatina (SSTR1-5), empleando agonistas selectivos para los mismos. Las observaciones realizadas indican que, a pesar de que todos los receptores están presentes en el estómago (Bruno *et al.*, 1993; Prinz *et al.*, 1994; Raulf *et al.*, 1994), únicamente el receptor de tipo 2 desempeña un papel significativo en el control de la secreción ácida gástrica. Esta conclusión se confirma con los resultados obtenidos empleando el antagonista selectivo de los receptores SSTR2, PRL-2903, y animales modificados genéticamente carentes de este receptor. Además, las acciones antisecretoras de la somatostatina junto a los efectos de la inmunoneutralización de la gastrina endógena y el bloqueo de los receptores H2 apoyan la hipótesis de que el receptor SSTR2 media en su totalidad las acciones de la somatostatina endógena inhibiendo la secreción ácida gástrica a través, fundamentalmente, de un efecto sobre células ECL, probablemente bloqueando la acción estimulante de la gastrina endógena sobre las mismas y, por lo tanto, inhibiendo la liberación de histamina. Este mecanismo de acción coincide con el sugerido a partir de estudios *in vitro* en estómago aislado de ratón (Vuyyuru y Shubert, 1997; Komassaka *et al.*, 2002) y con el propuesto en otras especies (Coy y Rossowski, 1995; Rossowski *et al.*, 1994). Es de interés destacar que los animales SSTR2 *-/-* son aparentemente normales en cuanto a su morfología gástrica, tanto macro como microscópica. Estos animales presentan una mucosa aparentemente normal, con una abundancia relativa de células G y de células D similar a la observada en animales de tipo salvaje. Esto contrasta con lo observado en otros modelos genéticos que afectan a la función secretora gástrica en los cuales se describen, de forma general, alteraciones significativas en la morfología de la mucosa (Samuelson y Hinkle, 2003). La aparente normalidad de la mucosa se acompaña de una secreción basal normal y de una respuesta secretora al alimento también normal; mientras que en otros modelos genéticos las alteraciones morfológicas se suelen asociar a cambios funcionales en situación basal (Samuelson y Hinkle, 2003). La normalidad en las funciones secretoras

se acompaña además de una ausencia de variaciones en la tasa de vaciamiento gástrico, lo que sugiere que el receptor SSTR2 no participa en la regulación de funciones motoras, aunque no puede excluirse que en estos animales se den mecanismos compensatorios que normalizen el vaciamiento gástrico en ausencia de este receptor.

Además de la somatostatina, diferentes estudios han demostrado que otros neuropéptidos y hormonas gastrointestinales inhiben la secreción ácida gástrica (Lloyd y Debas, 1994; Lloyd y Walsh, 1994; Hersey y Sachs, 1995). En el presente estudio se demuestra, por primera vez, que la bombesina y el PACAP, al igual que en otras especies, inhiben la secreción ácida gástrica, *in vivo*, en el ratón. Estos resultados confirman observaciones realizadas previamente *in vitro*, y aportan un significado funcional a las mismas (Li *et al.*, 2000; Sandvik *et al.*, 1989). A pesar de ello, no pueden descartarse diferencias en el mecanismo de acción, tanto de la bombesina como del PACAP, con el propuesto en otras especies, fundamentalmente la rata. En este sentido, ninguno de estos dos péptidos parece mediar respuestas de tipo estimulante, incluso en condiciones en las que se eliminó el componente inhibitorio dependiente de la somatostatina. De nuevo, la combinación de técnicas farmacológicas y de inmunoneutralización así como la manipulación genética ha permitido demostrar que la acción inhibitoria de la bombesina y el PACAP no se debe a una acción directa de los péptidos sobre células ECL o parietales sino que se trata más bien de un efecto indirecto mediado por la liberación de somatostatina y la consiguiente activación, en esos tipos celulares, de receptores SSTR2. Estas observaciones, junto a las realizadas para otros neuropéptidos inhibitorios para los que se ha demostrado la implicación en su mecanismo de acción de la liberación local de somatostatina y/o la implicación de receptores SSTR2 (Rossowski *et al.*, 1998; Zaki *et al.*, 2002), permiten elaborar la hipótesis de que la célula D podría funcionar como un centro de integración de señales de tipo inhibitorio. Estas señales estimularían la liberación de somatostatina, la cual, a través de la estimulación de receptores SSTR2, localizados preferentemente en células ECL y parietales, sería el principal mediador inhibitorio. Este mecanismo podría suponer una simplificación en los sistemas biológicos de control de la secreción. Según el mismo, no sería necesario que todos, o la mayoría de los tipos celulares implicados en el control de la secreción expresaran receptores funcionales para todos los potenciales moduladores de la misma. Unos pocos tipos celulares, como se sugiere aquí para las células D, se encargarían de integrar señales de otras áreas del tracto gastrointestinal, e incluso señales de origen extra-digestivo, que transmitirían a las células efectoras, que de esta forma sólo precisan de un número limitado de receptores para responder a un gran espectro de señales biológicas.

La función secretora gástrica puede verse alterada, además de por la manipulación directa de sus mecanismos de control, como se ha visto para animales manipulados genéticamente, en estados patológicos. Así, la gastritis representa una alteración local en la cual los mecanismos inflamatorios parecen ser los responsables primarios de cambios funcionales que afectan, entre otros, a los mecanismos de control de la secreción ácida. Estos cambios tienden tanto a perpetuar el estado inflamatorio (actividad pro-inflamatoria) como a compensarlo (actividad anti-inflamatoria). En el

ratón, la gastritis inducida por irritación química de la mucosa gástrica con yodoacetamida resulta, según los resultados obtenidos en este trabajo, en una alteración significativa de la secreción ácida gástrica y, por lo tanto, puede considerarse como un modelo de interés para estudiar alteraciones fisiopatológicas de la secreción y para la caracterización de dianas de interés terapéutico en el control de la misma. Las alteraciones observadas sugieren dos tipos de cambios paralelos en la función secretora gástrica: i) un incremento en la capacidad secretora gástrica, asociado probablemente a la respuesta inflamatoria, debido a una potencial alteración en los sistemas inhibitorios de control dependientes de somatostatina y/o a un aumento en la eficacia de los sistemas estimulantes; y ii) un descenso en la capacidad secretora asociada a cambios, aumentos, en la síntesis de prostaglandinas. Ambos tipos de respuestas han sido observadas en varios modelos animales de gastritis, tanto de origen infeccioso como no infeccioso (Barnett *et al.*, 2000; Zavros *et al.*, 2002a, b, c). Las observaciones derivadas de modelos animales con infección bacteriana sugieren que en esas condiciones el estómago tiende a maximizar su capacidad secretora para evitar el sobrecrecimiento bacteriano. En estos modelos se ha sugerido que las modificaciones en el sistema inhibitorio dependiente de células D, y por lo tanto de los niveles y liberación de somatostatina gástrica, constituyen el componente principal de esta respuesta (Zavros *et al.*, 2002c). El empleo, en estudios futuros, de animales manipulados genéticamente en los cuales se ha modificado este sistema (como son, por ejemplo, los animales carentes del receptor SSTR2) puede ayudar a determinar la importancia de este mecanismo. En el caso de la gastritis inducida por un irritante químico, como es el modelo usado en este estudio, el aumento en la tasa de secreción tendría un efecto diluyente del irritante en el lumen gástrico, reduciendo su actividad agresiva sobre la mucosa. Por el contrario, los aumentos en la síntesis de prostaglandinas tenderían a minimizar la respuesta secretora gástrica, sobre todo en presencia de secretagogos, para evitar un contenido excesivo de ácido y la lesión de la mucosa por el contacto con el mismo. En conjunto, la coexistencia de estos dos mecanismos antagónicos parece resultar en una tasa elevada de secreción basal y una respuesta aumentada a secretagogos. Sin embargo, el hecho de que las respuestas secretoras observadas puedan aún incrementarse cuando se inhibe la síntesis de prostaglandinas con indometacina, sugiere que la actividad secretora gástrica, aunque aumentada, tiende a mantenerse dentro de unos límites que evitarían que la mucosa se lesionase por la presencia de un exceso de ácido en el lumen gástrico. Además, los resultados obtenidos demuestran que los mastocitos, células que no parecen tener un papel primario en la regulación de la secreción ácida gástrica en condiciones normales, pero que son reclutados durante el proceso inflamatorio, pueden contribuir a las respuestas hipersecretoras gástricas observadas. Esta observación está de acuerdo con datos que implican a los mastocitos en diferentes patologías gastrointestinales. Observaciones recientes vinculan, además, a la somatostatina en las respuestas funcionales asociadas a la activación de mastocitos (Saavedra y Vergara, 2003); de nuevo, el empleo de un modelo animal manipulado genéticamente, como son los ratones SSTR2 *-/-*, puede ser de gran interés para confirmar esta relación funcional.

Aunque la implicación de la somatostatina en las alteraciones secretoras asociadas a la gastritis no se ha estudiado directamente, los resultados obtenidos en otros modelos junto a los cambios secretores observados en este estudio hacen plausible la hipótesis de que cambios en el sistema inhibitorio dependiente de somatostatina pueden ser un componente importante de las alteraciones secretoras asociadas a la gastritis. Una disminución en la actividad de este sistema, tanto en respuesta a señales gástricas como a señales asociadas a otros neuropéptidos con una acción convergente en las células D, como se ha mencionado anteriormente, puede resultar, o al menos ser un componente significativo, en las respuestas hipersecretoras observadas en los animales con gastritis.

Como ya se ha comentado, irrespectivamente del modelo empleado, los resultados obtenidos demuestran, en su conjunto, la validez del ratón como modelo animal en biomedicina para el estudio de los mecanismos de control, tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas, de la secreción ácida gástrica y la caracterización de dianas con potencial interés terapéutico. Los mecanismos de control estudiados muestran una gran semejanza entre el ratón y otras especies de uso más común en investigación, sobre todo la rata. Sin embargo, parecen existir diferencias de tipo especie-específicas que acrecentan el interés de estos modelos. Además, la posibilidad de emplear animales modificados genéticamente, por si mismos o combinados con modelos fisiopatológicos, hace interesante la caracterización de mecanismos básicos de control en esta especie.

VI – CONCLUSIONES

- 1^{era} En el ratón, la administración oral del irritante químico yodoacetamida induce una gastritis leve caracterizada por la presencia de un infiltrado inflamatorio difuso, con un incremento en el número de mastocitos en la submucosa, y la ausencia de lesiones aparentes, macro o microscópicas, en la mucosa.
- 2^a La gastritis leve inducida por yodoacetamida altera los mecanismos de control de la secreción ácida gástrica, lo que resulta en una elevada secreción basal y una respuesta hipersecretora a los secretagogos gastrina e histamina, sin afectar significativamente la tasa de vaciamiento gástrico.
- 3^a Durante la gastritis inducida por yodoacetamida, tanto mediadores de origen mastocitario como las prostaglandinas modulan la respuesta secretora gástrica. Mediadores de origen mastocitario incrementan la respuesta secretora, tal y como sugieren los resultados obtenidos en animales tratados con cromoglicato sódico; mientras que las prostaglandinas tienden a compensar estados de hipersecreción minimizando la exposición de la mucosa gástrica al ácido y, por lo tanto, manteniendo su integridad.
- 4^a Los ratones manipulados genéticamente en los cuales se ha eliminado el gen que codifica para el receptor de tipo 2 de la somatostatina son normales en cuanto a su morfología gástrica, y presentan una abundancia relativa de células de tipo D y G en la mucosa similar a la de animales de tipo salvaje. Además, tanto en ayunas como en estado postprandial, la actividad secretora gástrica en animales conscientes es similar a la de ratones de tipo salvaje, lo que sugiere la existencia de mecanismos alternativos que, en condiciones fisiológicas, compensan la falta del receptor SSTR2.
- 5^a La anestesia con uretano pone de manifiesto la carencia del receptor SSTR2 en los animales manipulados genéticamente, resultando en una secreción ácida gástrica basal entre 10 y 15 veces superior a la de los animales de tipo salvaje. Esta elevada secreción basal es totalmente dependiente de la activación de células parietales a través de la vía gastrina-histamina.
- 6^a El uso combinado de ratones carentes del receptor SSTR2, la inmunoneutralización *in vivo* de la gastrina y la somatostatina endógenas y la manipulación farmacológica de los receptores para la somatostatina, ha permitido demostrar que, en el ratón, al igual que en otras especies, los efectos periféricos de la somatostatina sobre la secreción ácida gástrica están mediados, en su totalidad, por receptores SSTR2.
- 7^a La actividad antsecretora de la somatostatina frente a los secretagogos pentagastrina e histamina y la presencia de receptores SSTR2 en células

ECL y en células parietales hace plausible la hipótesis de que la somatostatina regule la secreción ácida gástrica a través de un mecanismo paracrino que implica la inhibición de la liberación de histamina de células ECL y, en menor medida, un efecto inhibitorio directo sobre las células parietales.

- 8^a** En ratones carentes del receptor SSTR2 la tasa de vaciamiento gástrico de una comida sólida nutritiva es similar a la observada en animales de tipo salvaje, indicando que este receptor no participa en la regulación del vaciamiento gástrico o que, en su ausencia, mecanismos compensatorios normalizan el proceso de vaciamiento.
- 9^a** En el ratón, tanto la bombesina como el polipéptido activador de la adenilil ciclasa pituitaria, PACAP, actúan periféricamente inhibiendo la secreción ácida gástrica, sin que haya evidencias de que participen en respuestas estimulantes. La actividad antisecretora frente a los secretagogos gastrina, histamina y betanecol sugiere que ambos péptidos actúan, preferentemente, inhibiendo la liberación de histamina de las células ECL, aunque no puede descartarse cierto efecto sobre la célula parietal.
- 10^a** El uso combinado de animales carentes del receptor SSTR2, la inmunoneutralización *in vivo* de la somatostatina endógena y el bloqueo farmacológico de los receptores SSTR2 demuestran que, en el ratón, los efectos antisecretorios de la bombesina y del PACAP están mediados a través de la liberación de somatostatina y la consiguiente activación de receptores SSTR2.

Conclusión general

Los resultados obtenidos demuestran la validez del ratón para el estudio de los mecanismos de regulación de la función secretora gástrica, tanto en animales normales como en modelos fisiopatológicos o basados en la manipulación genética. El uso de estos modelos puede ser de interés para la caracterización de alteraciones en los mecanismos de control asociados a estados fisiopatológicos así como para la identificación y caracterización de dianas con potencial interés terapéutico para la especie humana.

VII – BIBLIOGRAFÍA

- ABDU F, HICKS GA, HENNIG G, ALLEN JP, GRUNDY D. (2002). Somatostatin sst(2) receptors inhibit peristalsis in the rat and mouse jejunum. *Am. J. Physiol.* 282:G624-G633.
- ABLIN J, SHALEV O, OKON E, KARMEI F, RACHMILEWITZ D.(1999). Deferiprone, an oral iron chelator, ameliorates experimental colitis and gastric ulceration in rats. *Inflamm. Bowel. Dis.* 5:253-261.
- AIHARA T, FUJISHITA T, KATAOKA N, KANATANI K, AMAGASE K, OKABE S, MATSUI M, TAKETO MM, CHEN D. (2002). Role of muscarinic acetylcholine M3- and M1-receptors in gastric acid secretion in mice; studies with receptor knockout mice. *Gastroenterology* 122:A-252.
- ALLEN JP, CANTY AJ, SCHULZ S, HUMPHREY PP, EMSON PC, YOUNG HM. (2002). Identification of cells expressing somatostatin receptor 2 in the gastrointestinal tract of Sstr2 knockout/lacZ knockin mice. *J. Comp. Neurol.* 454:329-340.
- AURANG K, WANG J, LLOYD KC. (1997). Somatostatin inhibition of acid and histamine release by activation of somatostatin receptor subtype 2 receptors in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281:245-252.
- BADO A, LEWIN JM, DUBRASQUET M. (1989). Effects of bombesin on food intake and gastric acid secretion in cats. *Am. J. Physiol.* 256:R181-R186.
- BARNETT K, BELL CJ, MCKNIGHT W, DICAY M, SHARKEY KA, WALLACE JL. (2000). Role of cyclooxygenase-2 in modulating gastric acid secretion in the normal and inflamed rat stomach. *Am. J. Physiol.* 279:G1292-G1297.
- BARRACHINA MD, MARTINEZ V, WANG L, WEI JY, TACHÉ Y. (1997a). Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:10455-10460.
- BARRACHINA MD, MARTÍNEZ V, WEI JY, TACHÉ Y. (1997b). Leptin-induced decrease in food intake is not associated with changes in gastric emptying in lean mice. *Am. J. Physiol.* 272:R1007-R1011.
- BECHI P, AMOROSI A, MAZZANTI A, DEI R, BIANCHI S, MUGNAI L, MASINI E. (1993). Reflux-related gastric mucosal injury is associated with increased mucosal histamine content in humans. *Gastroenterology* 104:1057-1063.
- B EGLINGER C, DREWE J. (1999). Somatostatin and octreotide: physiological background and pharmacological application. *Digestion.* 60:2-8.
- BENT S, FEHLING U, BRAAM U, SCHUNACK W, SCHMUTZLER W. (1991). The influence of H1-, H2- and H3-receptors on the spontaneous and ConA induced histamine release from human adenoïdal mast cells. *Agents Actions* 33:67-70.
- BERTACCINI G, ERSPAMER V, IMPICCIATORE M. (1973). The actions of bombesin on gastric secretion of the dog and the rat. *Br. J. Pharmacol.* 49:437-444.
- BIELEFELDT K, OZAKI N, GEBHART GF. (2002). Mild gastritis alters voltage-sensitive sodium currents in gastric sensory neurons in rats. *Gastroenterology* 122:752-761.
- BLOOM SR, RALPHS DN, BESSER GM, HALL R, COY DH, KASTIN AJ, SCHALLY AV. (1975). Proceedings: Effect of somatostatin on motilin levels and gastric emptying. *Gut* 16:834.
- BRIARD N, DUTOUR A, EPELBAUM J, SAUZE N, SLAMA A, OLIVER C. (1997). Species differences between male rat and ram pituitary somatostatin receptors involved in the inhibition of growth hormone secretion. *Eur. J. Endocrinol.* 137:545-555.
- BRUNO JF, XU Y, SONG J, BERELOWITZ M. (1993). Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinology* 133:2561-2567.
- BRUNS C, RAULF F, HOYER D, SCHLOOS J, LUBBERT H, WECKBECKER G. (1996). Binding properties of somatostatin receptor subtypes. *Metabolism* 45(Supl 1):17-20.
- BUSCAIL L, GOURLET P, CAUVIN A, DE NEEF P, GOSSEN D, ARIMURA A, MIYATA A, COY DH, ROBBERECHT P, CHRISTOPHE J. (1990). Presence of highly selective receptors for PACAP

- (pituitary adenylate cyclase activating peptide) in membranes from the rat pancreatic acinar cell line AR 4-2J. *FEBS Lett.* 262:77-81.
- CABERO JL, LI ZQ, MARDH S. (1991). Gastrin potentiates histamine-stimulated aminopyrine accumulation in isolated rat parietal cells. *Am. J. Physiol.* 261:G621-G627.
- CHANG CS, CHEN GH, KAO CH, WANG SJ, PENG SN, HUANG CK. (1996). The effect of *Helicobacter pylori* infection on gastric emptying of digestible and indigestible solids in patients with nonulcer dyspepsia. *Am. J. Gastroenterol.* 91:474-479.
- CHARALABOS P, FANNY K, KELLY CP, ELIAKIM R, JOSHI MA, O'KEANE CJ, CASTAGLIUOLO I, LAMONT JT, RACHMILEWITZ D. (1993). Ketotifen inhibits *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in rat ileum. *Gastroenterology* 105:701-707.
- CHIBA T, YAMADA T. (1994). Gut somatostatin. En *Gut Peptides*, Walsh JH, Dockray GJ, eds. pp. 123-145. New York: Raven Press.
- CHILOIRO M, RUSSO F, RIEZZO G, LEOCI C, CLEMENTE C, MESSA C, DI LEO A. (2001). Effect of *Helicobacter pylori* infection on gastric emptying and gastrointestinal hormones in dyspeptic and healthy subjects. *Dig. Dis. Sci.* 46:46-53.
- COHEN MM (1987). Role of endogenous prostaglandins in gastric secretion and mucosal defense. *Clin Invest Med.* 10:226-31.
- COLE SL, SCHINDLER M. (2000). Characterisation of somatostatin sst2 receptor splice variants. *J. Physiol. (Paris)* 94:217-237.
- CORLETO VD, WEBER HC, JENSEN RT. (1999). Expression of somatostatin receptor subtypes on guinea pig gastric and colonic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 277:G235-G244.
- COY DH, ROSSOWSKI WJ. (1995). Somatostatin analogues and multiple receptors: possible physiological roles. *Ciba Found. Symp.* 190:240-252.
- CRYER B. (2001). Mucosal defense and repair. Role of prostaglandins in the stomach and duodenum. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 30:877-894
- CUI GL, SANDVIK AK, MUNKVOLD B, WALDUM HL. (2002) Effects of anaesthetic agents on gastrin-stimulated and histamine-stimulated gastric acid secretion in the totally isolated vascularly perfused rat stomach. *Scand. J. Gastroenterol.* 37:750-753.
- DHARMSATHAPHORN K, SHERWIN RS, DOBBINS JW. (1980). Somatostatin inhibits fluid secretion in the rat jejunum. *Gastroenterology* 78:1554-1558.
- DIAL EJ, HALL LR, ROMERO JJ, LECHAGO J, FOX JG, LICHTENBERGER LM. (2000). Altered gastrin regulation in mice infected with *Helicobacter felis*. *Dig. Dis. Sci.* 45:1308-1314.
- DOCKRAY GJ, VAILLANT C, WALSH JH. (1979). The neuronal origin of bombesin-like immunoreactivity in the rat gastrointestinal tract. *Neuroscience* 4:1561-1568.
- DUBOIS A, TARNAWSKI A, NEWELL DG, FIALA N, DABROS W, STACHURA J, KRIVAN H, HEMAN-ACKAH LM. (1991). Gastric injury and invasion of parietal cells by spiral bacteria in rhesus monkeys. Are gastritis and hyperchlorhydria infectious diseases? *Gastroenterology* 100:884-891.
- DUVAL-ARAUJO I, DE MAGAL-AES QUEIROZ DM, MAGNAGO AG, SIMAL CJ, MARINO VS, CARVALHO SD, DA SILVA MACHADO LA, MIRANDA D. (2000). Increased gastric emptying induced by *Helicobacter heilmannii* type 1 infection in rats. *J. Med. Microbiol.* 49:627-634.
- EKBLAD E, EKELUND M, GRAFFNER H, HAKANSON R, SUNDLER F. (1985). Peptide-containing nerve fibers in the stomach wall of rat and mouse. *Gastroenterology* 89:73-85.
- EL-OMAR E, PENMAN I, DORRIAN CA, ARDILL JE, MCCOLL KE. (1993). Eradicating *Helicobacter pylori* infection lowers gastrin mediated acid secretion by two thirds in patients with duodenal ulcer. *Gut* 34:1060-1065.
- EL-OMAR EM, PENMAN ID, ARDILL JE, CHITTAJALLU RS, HOWIE C, MCCOLL KE. (1995). *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterology* 109:681-691.

- FLEMSTROM G. (1986).Gastroduodenal mucosal secretion of bicarbonate and mucus. Physiologic control and stimulation by prostaglandins. *Am. J. Med.* 18:18-22.
- FOX JG, DEWHIRST FE, SHEN Z, FENG Y, TAYLOR NS, PASTER BJ, ERICSON RL, LAU CN, CORREA P, ARAYA JC, ROA I. (1998). Helicobacter species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterology* 114:755-763.
- FRIIS-HANSEN L, SUNDLER F, LI Y, GILLESPIE PJ, SAUNDERS TL, GREENSON JK, OWYANG C, REHFELD JF, SAMUELSON LC. (1998). Impaired gastric acid secretion in gastrin-deficient mice. *Am. J. Physiol.* 274:G561-G568.
- FU S, RAMANUJAM KS, WONG A, FANTRY GT, DRACHENBERG CB, JAMES SP, MELTZER SJ, WILSON KT. (1999). Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in Helicobacter pylori gastritis. *Gastroenterology* 116:1319-1329.
- FUESSL HS, CAROLAN G, WILLIAMS G, BLOOM SR. (1987). Effect of a long-acting somatostatin analogue (SMS 201-995) on postprandial gastric emptying of 99mTc-tin colloid and mouth-to-caecum transit time in man. *Digestion* 36:101-107.
- FUNG LC, GREENBERG GR. (1997). Characterization of somatostatin receptor subtypes mediating inhibition of nutrient-stimulated gastric acid and gastrin in dogs. *Regul. Pept.* 68:197-203.
- GLAVIN GB, SZABO S. (1992). Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *FASEB J.* 6:825-831.
- GOODMAN RH, ARON DC, ROOS BA. (1983). Rat pre-prosomatostatin. Structure and processing by microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* 258:5570-5573.
- GRETZER B, EHRLICH K, MARICIC N, LAMBRECHT N, RESPONDEK M, PESKAR BM. (1998). Selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and their influence on the protective effect of a mild irritant in the rat stomach. *Br. J. Pharmacol.* 123:927-935.
- GRETZER B, MARICIC N, RESPONDEK M, SCHULIGOI R, PESKAR BM. (2001). Effects of specific inhibition of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 in the rat stomach with normal mucosa and after acid challenge. *Br. J. Pharmacol.* 132:1565-1573.
- GRIDER JR. (2003). Reciprocal activity of longitudinal and circular muscle during intestinal peristaltic reflex. *Am. J. Physiol.* 284:G768-G775.
- GYR KE, MEIER R. (1993). Pharmacodynamic effects of Sandostatin in the gastrointestinal tract *Digestion* 54(Suppl 1):14-19.
- HAKANSON R, SUNDLER F. (1987). Localisation of gastric histamine: immunocytochemical observations. *Med. Biol.* 65:1-7.
- HAKANSON R, SUNDLER F. (1991). Histamine-producing cells in the stomach and their role in the regulation of acid secretion. *Scand. J. Gastroenterol.* 180:88-94.
- HALL R, SNOW M, SCANLON M, MORA B, GOMEZ-PAN A. (1978). Pituitary effects of somatostatin. *Metabolism* 9:1257-1262.
- HANNIBAL J, EKBLAD E, MULDER H, SUNDLER F, FAHRENKRUG J. (1998). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the gastrointestinal tract of the rat: distribution and effects of capsaicin or denervation. *Cell Tissue Res.* 291:65-79.
- HANNON JP, NUNN C, STOLZ B, BRUNS C, WECKBECKER G, LEWIS I, TROXLER T, HURTH K, HOYER D. (2002). Drug design at peptide receptors: somatostatin receptor ligands. *J. Mol. Neurosci.* 18:15-27.
- HARMAR T, LUTZ E. (1994). Multiple receptors for PACAP and VIP. *Trends Pharmacol. Sci.* 15:97-99.
- HARRIS AG. (1994). Somatostatin and somatostatin analogues: pharmacokinetics and pharmacodynamic effects. *Gut* 35:S1-S4.
- HASLER WL, SOUDAH HC, OWYANG C. (1993). A somatostatin analogue inhibits afferent pathways mediating perception of rectal distention. *Gastroenterology* 104:1390-1397.

- HEALEY ZV, BLISS P, EDWARDS J, AREBI N, BEALES IL, CALAM J. (1998). Effect of PACAP-27 on ¹⁴C-aminopyrine accumulation in isolated rabbit parietal cells. *Peptides* 19:1111-1114.
- HEINTGES T, LUTHEN R, NIEDERAU C. (1994). Inhibition of exocrine pancreatic secretion by somatostatin and its analogues. *Digestion* 55:1-9.
- HELMAN CA, HIRSCHOWITZ BI. (1987). Divergent effects of bombesin and bethanechol on stimulated gastric secretion in duodenal ulcer and in normal men. *Gastroenterology* 92:1926-1933.
- HERSEY SJ, SACHS G. (1995). Gastric acid secretion. *Physiol. Rev.* 75:155-189.
- HILDEBRAND P, LEHMANN FS, KETTERER S, CHRIST AD, STINGELIN T, BELTINGER J, GIBBONS AH, COY DH, CALAM J, LARSEN F, BEGLINGER C. (2001). Regulation of gastric function by endogenous gastrin releasing peptide in humans: studies with a specific gastrin releasing peptide receptor antagonist. *Gut* 49:23-28.
- HIRSCHOWITZ BI, MOLINA E. (1983). Relation of gastric acid and pepsin secretion to serum gastrin levels in dogs given bombesin and gastrin-17. *Am. J. Physiol.* 244:G546-G551.
- HOLST JJ, JORGENSEN PN, RASMUSSEN TN, SCHMIDT P. (1992). Somatostatin restraint of gastrin secretion in pigs revealed by monoclonal antibody immunoneutralization. *Am. J. Physiol.* 263:G908-G912.
- INAGAKI N, KUROMI H, SEINO S. (1996). PACAP/VIP receptors in pancreatic beta-cells: their roles in insulin secretion. *Ann. NY Acad. Sci.* 805:44-51.
- INAGAKI N, YOSHIDA H, MIZUTA M, MIZUNO N, FUJII Y, GONOI T, MIYAZAKI J, SEINO S. (1994). Cloning and functional characterization of a third pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor subtype expressed in insulin-secreting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:2679-2683.
- IZBEKI F, WITTMANN T, JANCSO G, CSATI S, LONOVICS J. (2002). Inhibition of gastric emptying and small intestinal transit by ethanol is mediated by capsaicin-sensitive afferent nerves. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 365:17-21.
- JOHANSSON C, EFENDIC S, WISEN O, UVNAS-WALLENSTEN K, LUFT R. (1978). Effects of short-time somatostatin infusion on the gastric and intestinal propulsion in humans. *Scand. J. Gastroenterology.* 13:481-483
- KALIA N, BARDHAN KD, REED MW, JACOB S, BROWN. (2000). Mast cell stabilization prevents ethanol-induced rat gastric mucosal injury: mechanisms of protection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15:133-41
- KARNES WE, MAXWELL V, SYTNIK B, CHEW P, WALSH JH. (1989). Prolonged inhibition of meal-stimulated acid secretion and gastrin release following single subcutaneous administration of octreotide (SMS 201-995) in man. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 3:527-538.
- KAWAKUBO K, COY DH, WALSH JH, TACHÉ Y. (1999). Urethane-induced somatostatin mediated inhibition of gastric acid: reversal by the somatostatin 2 receptor antagonist, PRL-2903. *Life Sci.* 65:L115-L120.
- KIMURA C, OHKUBO S, OGI K, HOSOYA M, ITOH Y, ONDA H, MIYATA A, JIANG L, DAHL RR, STIBBS HH. (1990). A novel peptide which stimulates adenylate cyclase: molecular cloning and characterization of the ovine and human cDNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166:81-89.
- KOBAYASHI T, TONAI S, ISHIHARA Y, KOGA R, OKABE S, WATANABE T. (2000). Abnormal functional and morphological regulation of the gastric mucosa in histamine H2 receptor-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 105:1741-1749.
- KOMASAKA M, HORIE S, WATANABE K, MURAYAMA T. (2002). Antisecretory effect of somatostatin on gastric acid via inhibition of histamine release in isolated mouse stomach. *Eur. J. Pharmacol.* 452:235-243.
- KOPIN AS, LEE YM, MCBRIDE EW, MILLER LJ, LU M, LIN HY, KOLAKOWSKI LF JR, BEINBORN M. (1992). Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:3605-3609.

- KOSKENPATO J, KORPPI-TOMMOLA T, KAIREMO K, FARKKILA M. (2000). Long-term follow-up study of gastric emptying and *Helicobacter pylori* eradication among patients with functional dyspepsia. *Dig. Dis. Sci.* 45:1763-1768.
- KOVACS TO, LLOYD KC, WONG H, WALSH JH. (1995). Inhibition of bombesin-stimulated acid secretion by immunoneutralization of gastrin in dogs. *Am. J. Physiol.* 268:G54-G58.
- KOVACS TO, WALSH JH, MAXWELL V, WONG HC, AZUMA T, KATT E. (1989). Gastrin is a major mediator of the gastric phase of acid secretion in dogs: proof by monoclonal antibody neutralization. *Gastroenterology* 97:1406-1413.
- KOVES K, ARIMURA A, VIGH S, SOMOGYVARI-VIGH A, MILLER J. (1993). Immunohistochemical localization of PACAP in the ovine digestive system. *Peptides* 14:449-55.
- KREMPELS K, HUNYADY B, O'CARROLL AM, MEZEY E. (1997). Distribution of somatostatin receptor messenger RNAs in the rat gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 112:1948-1960.
- KUSUMOTO Y, IWANAGA T, ITO S, FUJITA T. (1979). Juxtaposition of somatostatin cell and parietal cell in the dog stomach. *Arch. Histol. Jpn.* 42:459-465.
- LANGHANS N, RINDI G, CHIU M, REHFELD JF, ARDMAN B, BEINBORN M, KOPIN AS. (1997). Abnormal gastric histology and decreased acid production in colecystokinin-B/gastrin receptor-deficient mice. *Gastroenterology* 112:280-286.
- LARSSON LI, GOLTERMANN N, DE MAGISTRIS L, REHFELD JF, SCHWARTZ TW. (1979). Somatostatin cell processes as pathways for paracrine secretion. *Science* 205:1393-1395.
- LÄUFFER JM, MODLIN IM, HINOUE T, KIDD M, ZHANG T, SCHMID SW, TANG LH. (1999). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates gastric enterochromaffin-like cell proliferation in rats. *Gastroenterology* 116:623-635.
- LEVINE RA, SCHWARTZEL EH. (1984). Effect of indomethacin on basal and histamine stimulated human gastric acid secretion. *Gut* 25:718-22.
- LI P, CHANG TM, COY D, CHEY WY. (2000). Inhibition of gastric acid secretion in rat stomach by PACAP is mediated by secretin, somatostatin, and PGE(2). *Am. J. Physiol.* 278:G121-G127.
- LINDSTRÖM E, BJORKQVIST M, HAKANSON R. (1999). Pharmacological analysis of CCK2 receptor antagonists using isolated rat stomach ECL cells. *Br. J. Pharmacol.* 127:530-536.
- LINDSTRÖM E, ELIASSON L, BJORKQVIST M, HAKANSON R. (2001a) Gastrin and the neuropeptide PACAP evoke secretion from rat stomach histamine-containing (ECL) cells by stimulating influx of Ca²⁺ through different Ca²⁺ channels. *J. Physiol.* 535:663-677.
- LINDSTRÖM E, CHEN D, NORLEN P, ANDERSSON K, HAKANSON R. (2001b). Control of gastric acid secretion: the gastrin-ECL cell-parietal cell axis. *Comp. Biochem. Physiol. A* 128:505-514.
- LLOYD KC, AMIRMOZZAMI S, FRIEDIK F, CHEW P, WALSH JH. (1997). Somatostatin inhibits gastrin release and acid secretion by activating sst2 in dogs. *Am. J. Physiol.* 272:G1481-G1488.
- LLOYD KC, DEBAS HT. (1994). Peripheral regulation of gastric acid secretion. En *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (3era Ed.), Johnson LR, Alpers DH, Christensen J, Jacobson ED y Walsh JH eds. Pp 1185-1225. Raven Press: New York.
- LLOYD KC, RAYBOULD HE, WALSH JH. (1992). Cholecystokinin inhibits gastric acid secretion through type "A" cholecystokinin receptors and somatostatin in rats. *Am. J. Physiol.* 263:G287-G292.
- LLOYD KCK, WALSH J. (1994). Gastric secretion. En *Gut Peptides*, Walsh JH, Dockray GJ eds. pp 633-654. Raven Press: New York.
- LLOYD KC, WANG J, AURANG K, GRONHED P, COY DH, WALSH JH. (1995). Activation of somatostatin receptor subtype 2 inhibits acid secretion in rats. *Am. J. Physiol.* 268:G102-G106.
- LUFT R, EFENDIC S, HOKFELT T, JOHANSSON O, ARIMURA A. (1974). Immunohistochemical evidence for the localization of somatostatin-like immunoreactivity in a cell population of the pancreatic islets. *Med. Biol.* 52:428-30.

- MAKHLOUF GM, SCHUBERT ML. (1990). Gastric somatostatin: a paracrine regulator of acid secretion. *Metabolism* 39 (Suppl 2):138-142.
- MANES G, MALFERTHEINER P. (1999). Relationship of Helicobacter pylori infection with gastrointestinal motility. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.* 31:705-712.
- MARKI F (1981). Effect of somatostatin on intestinal absorption of nutrients the rat. *Regul. Pept.* 2:371-381.
- MARTÍNEZ V. (2002). Somatostatin receptors and the regulation of gastric function. En *Gut-brain peptides in the new millennium*,. Taché Y, Goto Y, Ohning G, Yamada T eds. pp. 167-178. CURE Foundation: Los Angeles.
- MARTÍNEZ V, BARRACHINA MD, OHNING G, TACHÉ Y. (2002). Cephalic phase of acid secretion involves activation of medullary TRH receptor subtype 1 in rats. *Am. J. Physiol.* 283:G1310-G1319.
- MARTÍNEZ V, CURI AP, TORKIAN B, SCHAEFFER JM, WILKINSON HA, WALSH JH, TACHÉ Y. (1998). High basal gastric acid secretion in somatostatin receptor subtype 2 knockout mice. *Gastroenterology* 114:1125-1132.
- MARTÍNEZ V, RIVIER J, COY D, TACHÉ Y. (2000). Intracisternal injection of somatostatin receptor 5-preferring agonists induces a vagal cholinergic stimulation of gastric emptying in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293:1099-1105.
- MARTÍNEZ V, TACHÉ Y. (2000). Bombesin and the brain-gut axis. *Peptides* 21:1617-1625.
- MARTÍNEZ V, YANG H, WONG HC, WALSH JH, TACHÉ Y. (1995). Somatostatin antibody does not influence bombesin-induced inhibition of gastric acid secretion in rats. *Peptides* 15:1-6.
- MIAMPAMBA M, GERMANO PM, ARLI S, WONG HH, SCOTT D, TACHÉ Y, PISEGNA JR. (2002). Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and PACAP type 1 receptor in the rat gastric and colonic myenteric neurons. *Regul. Pept.* 105:145-154.
- MITRA SW, MEZEY E, HUNYADY B, CHAMBERLAIN L, HAYES E, FOOR F, WANG Y, HONBRUNN A, SCHAEFFER JM. (1999). Colocalization of somatostatin receptor sst5 and insulin in rat pancreatic beta-cells. *Endocrinology.* 140:3790-3796.
- MIYATA A, ARIMURA A, DAHL RR, MINAMINO N, UEHARA A, JIANG L, CULLER MD, COY DH. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164:567-574
- MUNGAN Z, HAMMER RA, AKARCA US, KOMAKI G, ERTAN A, ARIMURA A. (1995). Effect of PACAP on gastric acid secretion in rats. *Peptides* 16:1051-1056.
- MUNGAN Z, OZMEN V, ERTAN A, ARIMURA A. (1992). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-27 (PACAP-27) inhibits pentagastrin-stimulated gastric acid secretion in conscious rats. *Regul. Pept.* 38:199-206.
- NAKAJIMA S, KRISHNAN B, OTA H, SEGURA AM, HATTORI T, GRAHAM DY, GENTA RM. (1997). Mast cell involvement in gastritis with or without Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology* 113:746-754
- NAKAMURA M, ODA M, KANEKO K, AKAIWA Y, TSUKADA N, KOMATSU H, TSUCHIYA M. (1988). Autoradiographic demonstration of gastrin-releasing peptide-binding sites in the rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 94:968-976.
- NORLEN P, KITANO M, LINDSTROM E, HAKANSON R. (2000). Anaesthetic agents inhibit gastrin-stimulated but not basal histamine release from rat stomach ECL cells. *Br. J. Pharmacol.* 130:725-730.
- OGI K, KIMURA C, ONDA H, ARIMURA A, FUJINO M. (1990). Molecular cloning and characterization of cDNA for the precursor of rat pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173:1271-1279.

- OHKUBO T, SHIBATA M, INOUE M, KAYA H, TAKAHASHI H. (1994). Autoregulation of histamine release via the histamine H3 receptor on mast cells in the rat skin. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 328:307-314.
- OHNING GV, SONG M, WONG HC, WU SV, WALSH JH. (1998). Immunolocalization of gastrin-dependent histidine decarboxylase activity in rat gastric mucosa during feeding. *Am. J. Physiol.* 275:G660-G667.
- OHNING GV, WONG HC, LLOYD KC, WALSH JH. (1996). Gastrin mediates the gastric mucosal proliferative response to feeding. *Am. J. Physiol.* 271:G470-G476.
- OHNING GV, WONG HC, WALSH JH. (1994). Differential kinetics for immunoneutralization of circulating gastrin by gastrin monoclonal antibody and its Fab1 fragment in rats. *Peptides* 15:417-423.
- OKAMOTO E, HARUMA K, HATA J, TANI H, SUMII K, KAJIYAMA G. (1997). Effects of octreotide, a somatostatin analogue, on gastric function evaluated by real-time ultrasonography. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11:177-84.
- OZAKI N, BIELEFELDT K, SENGUPTA JN, GEBHART GF. (2002). Models of gastric hyperalgesia in the rat. *Am. J. Physiol.* 283:G666-G676.
- OZAWA M, AONO M, MIZUTA K, MORIGA M, OKUMA M. (1997). Central administration of PACAP stimulates gastric secretion mediated through the vagal pathway in anesthetized rats. *Dig. Dis. Sci.* 42:2552-2559.
- PARK J, CHIBA T, YAMADA T. (1987). Mechanisms for direct inhibition of canine gastric parietal cells by somatostatin. *J. Biol. Chem.* 262:14190-14196.
- PARK J, CHIBA T, YOKOTANI K, DELVALLE J, YAMADA T. (1989). Somatostatin receptors on canine fundic D-cells: evidence for autocrine regulation of gastric somatostatin. *Am. J. Physiol.* 257:G235-G241.
- PATEL YC. (1999). Somatostatin and its receptor family. *Front. Neuroendocrinol.* 20:157-198.
- PATEL YC, GREENWOOD M, KENT G, PANETTA R, SRIKANT CB. (1993). Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSTR2: tissue selective distribution and cAMP regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192:288-294.
- PFEIFFER A, ROCHLITZ H, NOELKE B, TACKE R, MOSER U, MUTSCHLER E, LAMBRECHT G. (1990). Muscarinic receptors mediating acid secretion in isolated rat gastric parietal cells are of M3 type. *Gastroenterology* 98: 218-222.
- PISEGNA JR, OHNING GV, ATHMANN C, ZENG N, WALSH JH, SACHS G. (2000). Role of PACAP1 receptor in regulation of ECL cells and gastric acid secretion by pituitary adenylate cyclase activating peptide. *Ann. NY Acad. Sci.* 921:233-241.
- PLEBANI M, BASSO D, BUSATTO G, BRIGATO L, BATTISTEL M, RUGGE M. (1995). Gastrin stimulates gastric mast cells in rabbits. *Res. Exp. Med.* 15:365-371.
- PRINZ C, SACHS G, WALSH JH, COY DH, WU SV. (1994). The somatostatin receptor subtype on rat enterochromaffin like cells. *Gastroenterology* 107:1067-1074.
- PRINZ C, ZANNER R, GERHARD M, MAHR S, NEUMAYER N, HOHNE-ZELL B, GRATZL M. (1999). The mechanism of histamine secretion from gastric enterochromaffin-like cells. *Am. J. Physiol.* 277:C845-C855.
- RAULF F, PEREZ J, HOYER D, BRUNS C. (1994). Differential expression of five somatostatin receptor subtypes, SSTR1-5, in the CNS and peripheral tissue. *Digestion* 55 (suppl 3):46-53.
- REISINE T, BELL GI. (1995). Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocr. Rev.* 16:427-442.
- REUBI JC. (1992). Somatostatin receptors in the gastrointestinal tract in health and disease. *Yale J. Biol. Med.* 65:493-503.
- ROBERT A, EBERLE D, KAPLOWITZ N. (1984). Role of glutathione in gastric mucosal cytoprotection. *Am. J. Physiol.* 247:G296-G304.

- ROCHE S, GUSDINAR T, BALI JP, MAGOUS R. (1991). "Gastrin" and "CCK" receptors on histamine- and somatostatin-containing cells from rabbit fundic mucosa-II. Characterization by means of selective antagonists(L-364,718 and L-365,260). *Biochem. Pharmacol.* 42:771-776.
- ROHRER SP, BIRZIN ET, MOSLEY RT, BERK SC, HUTCHINS SM, SHEN DM, XIONG Y, HAYES EC, PARMAR RM, FOOR F, MITRA SW, DEGRADO SJ, SHU M, KLOPP JM, CAI SJ, BLAKE A, CHAN WW, PASTERNAK A, YANG L, PATCHETT AA, SMITH RG, CHAPMAN KT, SCHAEFFER JM. (1998). Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science* 282:737-740.
- ROMANO M, RAZANDI M, RAZA A, SZABO S, IVEY J. (1992). Cysteamine protects gastric epithelial cell monolayers against drug induced damage: evidence for direct cellular protection by sulphhydryl compounds. *Gut* 33:30-38
- ROSSOWSKI WJ, CHENG BL, JIANG NY, COY DH. (1998). Examination of somatostatin involvement in the inhibitory action of GIP, GLP-1, amylin and adrenomedullin on gastric acid release using a new SRIF antagonist analogue. *Br. J. Pharmacol.* 125:1081-1087.
- ROSSOWSKI WJ, GU Z-F, AKARCA US, JENSEN RT, COY DH. (1994). Characterization of somatostatin receptor subtypes controlling rat gastric acid and pancreatic amylase release. *Peptides* 15:1421-1424.
- ROSSOWSKI WJ, MURPHY WA, JIANG NY, YEGINSU O, ERTAN A, COY DH. (1989). Effects of a novel bombesin antagonist analogue on bombesin-stimulated gastric acid secretion and growth hormone release in the pentobarbital-anesthetized rat. *Scand. J. Gastroenterol.* 24:121-128.
- SAAVEDRA Y, VERGARA P. (2003). Somatostatin inhibits intestinal mucosal mast cell degranulation in normal conditions and during mast cell hyperplasia. *Regul. Pept.* 111:67-75.
- SAMUELSON LC, HINKLE KL. (2003). Insights into the regulation of gastric Acid secretion through analysis of genetically engineered mice. *Annu. Rev. Physiol.* 65:383-400.
- SANDOR A, KIDD M, LAWTON GP, MIU K, TANG LH, MODLIN IM. (1996). Neurohormonal modulation of rat enterochromaffin-like cell histamine secretion. *Gastroenterology* 110:1084-1092.
- SANDVIK AK, BRENNAN E, SUNDAN A, HOLST JJ, WALDUM HI. (1997). Bombesin inhibits histamine release from the rat oxyntic mucosa by a somatostatin-dependent mechanism. *Scand. J. Gastroenterol.* 32: 427-432.
- SANDVIK AK, CUI G, BAKKE I, MUNKVOLD B, WALDUM HL. (2001). PACAP stimulates gastric acid secretion in the rat by inducing histamine release. *Am. J. Physiol.* 281:G997-G1003.
- SANDVIK AK, HOLST JJ, WALDUM HL. (1989). The effect of gastrin-releasing peptide on acid secretion and the release of gastrin, somatostatin, and histamine in the totally isolated, vascularly perfused rat stomach. *Scand. J. Gastroenterol.* 24:9-15.
- SCHAFFER K, HERRMUTH H, MUELLER J, COY DH, WONG HC, WALSH JH, CLASSEN M, SCHUSDZIARRA V, SCHEPP W. (1997). Bombesin-like peptides stimulate somatostatin release from rat fundic D cells in primary culture. *Am. J. Physiol.* 273:G686-G695.
- SCHINDLER M, HUMPHREY PP. (1999). Differential distribution of somatostatin sst2 receptor splice variants in rat gastric mucosa. *Cell Tissue Res.* 297:163-168.
- SCHINDLER M, KIDD EJ, CARRUTHERS AM, WYATT MA, JARVIE EM, SELLERS LA, FENIUK W, HUMPHREY PP. (1998). Molecular cloning and functional characterization of a rat somatostatin sst2(b) receptor splice variant. *Br. J. Pharmacol.* 125:209-217.
- SCHUBERT ML. (1991). The effect of vasoactive intestinal polypeptide on gastric acid secretion is predominantly mediated by somatostatin. *Gastroenterology* 100:1195-200.
- SCHUBERT ML, EDWARDS NF, ARIMURA A, MAKHLOUF GM. (1987). Paracrine regulation of gastric acid secretion by fundic somatostatin. *Am. J. Physiol.* 252:G485-G490.

- SCHUBERT ML, EDWARDS NF, MAKHLOUF GM. (1988). Regulation of gastric somatostatin secretion in the mouse by luminal acidity: a local feedback mechanism. *Gastroenterology* 94:317-322.
- SCHUBERT ML, HIGHTOWER J. (1989). Inhibition of acid secretion by bombesin is partly mediated by release of fundic somatostatin. *Gastroenterology* 97:561-567.
- SCHUBERT ML, HIGHTOWER J, COY DH, MAKHLOUF GM. (1991a). Regulation of acid secretion by bombesin/GRP neurons of the gastric fundus. *Am. J. Physiol.* 260:G156-G160.
- SCHUBERT ML, JONG MJ, MAKHLOUF GM. (1991b). Bombesin/GRP-stimulated somatostatin secretion is mediated by gastrin in the antrum and intrinsic neurons in the fundus. *Am. J. Physiol.* 261:G885-G889.
- SCHUBERT ML, MAKHLOUF GM. (1992). Neural, hormonal, and paracrine regulation of gastrin and acid secretion. *Yale J. Biol. Med.* 65:553-560.
- SCHWARTZ GJ, NETTERVILLE LA, MCHUGH PR, MORAN TH. (1991). Gastric loads potentiate inhibition of food intake produced by a cholecystokinin analogue. *Am. J. Physiol.* 261:R1141-R1146
- SEAL A, YAMADA T, DEBAS H, HOLLINSHEAD J, OSADCHEY B, APONTE G, WALSH J. (1982). Somatostatin-14 and -28: clearance and potency on gastric function in dogs. *Am. J. Physiol.* 243:G97-G102.
- SIEHLER S, SEUWEN K, HOYER D. (1998). 125I][Tyr³]octreotide labels human somatostatin sst2 and sst5 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 348:311-320.
- SJOVALL M, EKBLAD E, LUNDELL L, SUNDLER F. (1990). Gastrin-releasing peptide: neuronal distribution and spatial relation to endocrine cells in the human upper gut. *Regul. Pept.* 28:47-55.
- SMEDH U, KAPLAN JM, BJORKSTRAND E, UVNAS-MOBERG K. (1999). Dual effects of somatostatin analog octreotide on gastric emptying during and after intragastric fill. *Am. J. Physiol.* 277:R1291-R1296
- SÖDERHOLM JD, YANG P-C, CEPONIS P, VOHRA A, RIDDELL R, SHERMAN PM, PERDUE MH. (2002). Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* 123:1099-1108.
- SQUIRES PE, MELOCHE RM, BUCHAN AM. (1999). Bombesin-evoked gastrin release and calcium signaling in human antral G cells in culture. *Am. J. Physiol.* 276:G227-G237.
- STERNINI C, WONG H, WU SV, DE GIORGIO R, YANG M, REEVE J JR, BRECHA NC, WALSH JH. (1997). Somatostatin 2A receptor is expressed by enteric neurons, and by interstitial cells of Cajal and enterochromaffin-like cells of the gastrointestinal tract. *J. Comp. Neurol.* 386:396-408.
- STROWSKI MZ, PARMAR RM, BLAKE AD, SCHAEFFER JM (2000). Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology.* 141:111-117.
- SUGANO K, PARK J, SOLL AH, YAMADA T. (1987). Stimulation of gastrin release by bombesin and canine gastrin-releasing peptides. Studies with isolated canine G cells in primary culture. *J. Clin. Invest.* 79: 935-942.
- TACHÉ Y, RAYBOULD H, WEI JY. (1991). Central and peripheral actions of calcitonin gene-related peptide on gastric secretory and motor function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 298:183-198.
- TAKAHASHI S, FUJITA T, YAMAMOTO A. (2000). Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced acute gastric injury in *Helicobacter pylori* gastritis in Mongolian gerbils. *Eur. J. Pharmacol.* 406:461-468.
- TAKASHIMA M, FURUTA T, HANAI H, SUGIMURA H, KANEKO E. (2001). Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in mongolian gerbils. *Gut* 48:765-773.
- TEITELBAUM DH, O'DORISIO TM, PERKINS WE, GAGINELLA TS. (1984). Somatostatin modulation of peptide-induced acetylcholine release in guinea pig ileum. *Am. J. Physiol.* 246:G509-G514.

- THARP MD, THIRLBY R, SULLIVAN TJ. (1984). Gastrin induces histamine release from human cutaneous mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 74:159-165.
- TORKIAN B, MARTÍNEZ V, WALSH JH, TACHÉ Y. (1998). Model to study gastric acid secretion in mice: Effect of secretagogues and inhibitors on basal gastric acid secretion. *Gastroenterology* 114:A1185.
- TORNOE K, HANNIBAL J, GEORG B, SCHMIDT PT, HILSTED L, FAHRENKRUG J, HOLST JJ. (2001). PACAP 1-38 as neurotransmitter in the porcine antrum. *Regul. Pept.* 15:109-21.
- VANE JR, BOTTING RM. (1998). Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *Int. J. Tissue React.* 20:3-15.
- VARNER AA, MODLIN IM, WALSH JH. (1981). High potency of bombesin for stimulation of human gastrin release and gastric acid secretion. *Regul. Pept.* 1:289-296.
- VAUDRY D, GONZALEZ BJ, BASILLE M, YON L, FOURNIER A, VAUDRY H. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52:269-324.
- VON DER OHE MR, CAMILLERI M, THOMFORDE GM, KLEE GG. (1995). Differential regional effects of octreotide on human gastrointestinal motor function. *Gut* 36:743-748.
- VUYYURU L, SCHUBERT ML, HARRINGTON L, ARIMURA A, MAKHLOUF GM. (1995). Dual inhibitory pathways link antral somatostatin and histamine secretion in human, dog, and rat stomach. *Gastroenterology* 109:1566-1574.
- VUYYURU L, SCHUBERT ML. (1997). Histamine, acting via H₃ receptors, inhibits somatostatin and stimulates acid secretion in isolated mouse stomach. *Gastroenterology* 113:1545-1552.
- WAGNER KA, NANDI J, KING RL, LEVINE RA. (1995). Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on ulcerogenesis and gastric secretion in pylorus-ligated rat. *Dig. Dis. Sci.* 40:134-140.
- WALSH JH, KOVACS TOG, MAXWELL V, CUTTITTA F. (1988). Bombesin-like peptides as regulators of gastric function. *Ann. NY Acad. Sci.* 547:217-224.
- WALSH JH, MAXWELL V, FERRARI J, VARNER AA. (1981). Bombesin stimulates human gastric function by gastrin-dependent and independent mechanisms. *Peptides* 2:193-198.
- WATANABE T, MASUO Y, MATSUMOTO H, SUZUKI N, OHTAKI T, MASUDA Y, KITADA C, TSUDA M, FUJINO M. (1992). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide provokes cultured rat chromaffin cells to secrete adrenaline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2:403-411.
- WEIGERT N, LI YY, LIPPL F, COY DH, CLASSEN M, SCHUSDZIARRI V. (1996). Role of endogenous bombesin-peptides during vagal stimulation of gastric acid secretion in the rat. *Neuropeptides* 30:521-527.
- WHITTLE BJR. (1993). Modulation by prostanoids of the release of inflammatory mediators from mast cells: involvement in mucosal protection? *Gastroenterology* 104:314-316.
- WILKES JM, KAJIMURA M, SCOTT DR, HERSEY SJ, SACHS G. (1991). Muscarinic responses of gastric parietal cells. *J. Membr. Biol.* 122:97-101.
- WONG HC, WALSH JH, YANG H, TACHÉ Y, BUCHAN AM. (1990). A monoclonal antibody to somatostatin with potent in vivo immunoneutralizing activity. *Peptides* 11:707-712.
- WYATT MA, JARVIE E, FENIUK W, HUMPHREY PP. (1996). Somatostatin sst2 receptor-mediated inhibition of parietal cell function in rat isolated gastric mucosa. *Br. J. Pharmacol.* 119:905-910.
- XIAO F, FURUTA T, TAKASHIMA M, SHIRAI N, HANAI H. (2001). Effects of cyclooxygenase-2 inhibitor on gastric acid secretion in Helicobacter pylori-infected C57BL/6 mice. *Scand. J. Gastroenterol.* 36:577-583
- YAMATODANI A, MAEYAMA K, WATANABE T, WADA H, KITAMURA Y. (1982). Tissue distribution of histamine in a mutant mouse deficient in mast cells: clear evidence for the presence of non-mast-cell histamine. *Biochem. Pharmacol.* 31:305-309.

- YANG H, WONG H, WU V, WALSH JH, TACHÉ Y. (1990). Somatostatin monoclonal antibody immunoneutralization increases gastrin and gastric acid secretion in urethane-anesthetized rats. *Gastroenterology* 99:659-665.
- YANG L, BERK SC, ROHRER SP, MOSLEY RT, GUO L, UNDERWOOD DJ, ARISON BH, BIRZIN ET, HAYES EC, MITRA SW, PARMAR RM, CHENG K, WU TJ, BUTLER BS, FOOR F, PASTERNAK A, PAN Y, SILVA M, FREIDINGER RM, SMITH RG, CHAPMAN K, SCHAEFFER JM, PATCHETT AA. (1998). Synthesis and biological activities of potent peptidomimetics selective for somatostatin receptor subtype 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:10836-10841.
- YAU WM, LINGLE PF, YOUTHER ML. (1983). Modulation of cholinergic neurotransmitter release from myenteric plexus by somatostatin. *Peptides* 4:49-53.
- YONEDA M, TACHÉ Y. (1993). Vagal regulation of gastric prostaglandin E2 release by central TRH in rats. *Am. J. Physiol.* 264:G231-G236
- YU LC, PERDUE MH. (2001). Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. *Immunol. Rev.* 179:61-73
- ZAKI M, HARRINGTON L, MCCUEN R, COY DH, ARIMURA A, SCHUBERT ML. (1996). Somatostatin receptor subtype 2 mediates inhibition of gastrin and histamine secretion from human, dog, and rat antrum. *Gastroenterology* 111:919-924.
- ZAKI M, KODURU S, MCCUEN R, VUYYURU L, SCHUBERT ML. (2002). Amylin, released from the gastric fundus, stimulates somatostatin and thus inhibits histamine and acid secretion in mice. *Gastroenterology* 123:247-255.
- ZAVROS Y, RIEDER G, FERGUSON A, MERCHANT JL. (2002a). Gastritis and hypergastrinemia due to *Acinetobacter lwoffii* in mice. *Infect. Immun.* 70:2630-2639.
- ZAVROS Y, RIEDER G, FERGUSON A, SAMUELSON LC, MERCHANT JL. (2002c). Hypergastrinemia in response to gastric inflammation suppresses somatostatin. *Am. J. Physiol.* 282:G175-G183.
- ZAVROS Y, RIEDER G, FERGUSON A, SAMUELSON LC, MERCHANT JL. (2002b). Genetic or chemical hypochlorhydria is associated with inflammation that modulates parietal and G-cell populations in mice. *Gastroenterology* 122:119-133.
- ZENG N, ATHMANN C, KANG T, LYU RM, WALSH JH, OHNING GV, SACHS G, PISEGNA JR. (1999). PACAP type I receptor activation regulates ECL cells and gastric acid secretion. *J. Clin. Invest.* 104:1383-91.
- ZENG N, BAYLE DB, WALSH JH, KANG T, SACHS G. (1996b). Localization of PACAP Receptors on rat fundic ECL and D cells. *Gastroenterology* 110:A1136
- ZENG N, KANG T, LYU RM, WONG H, WEN Y, WALSH JH, SACHS G, PISEGNA JR. (1998). The pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type 1 receptor (PAC1-R) is expressed on gastric ECL cells: evidence by immunocytochemistry and RT-PCR. *Ann. NY Acad. Sci.* 865:147-56.
- ZENG N, SACHS G. (2002). Neural regulation of gastric endocrine cells. En *Gut-brain peptides in the new millennium*,. Taché Y, Goto Y, Ohning G, Yamada T eds. pp. 55-68. CURE Foundation: Los Angeles.
- ZENG N, WALSH JH, KANG T, HELANDER KG, HELANDER HF, SACHS G. (1996a). Selective ligand-induced intracellular calcium changes in a population of rat isolated gastric endocrine cells. *Gastroenterology* 10:1835-1846.
- ZHENG H, BAILEY A, JIANG MH, HONDA K, CHEN HY, TRUMBAUER ME, VAN DER PLOEG LH, SCHAEFFER JM, LENG G, SMITH RG. (1997). Somatostatin receptor subtype 2 knockout mice are refractory to growth hormone-negative feedback on arcuate neurons. *Mol. Endocrinol.* 11:1709-1717.
- ZIMMERMAN RP, GATES TS, MANTYH CR, VIGNA SR, WELTON ML, PASSARO EP JR, MANTYH PW. (1989). Vasoactive intestinal polypeptide receptor binding sites in the human gastrointestinal tract: localization by autoradiography. *Neuroscience* 31:771-83.

VIII – ANEXO

1- Artículos

Piqueras L, Corpa JM, Martínez J, Martínez V. (2003). Gastric hypersecretion associated to iodoacetamide-induced mild gastritis in mice. *N-S Arch. Pharmacol.* 367:140-150.

Piqueras L, Taché Y, Martínez V. (2003). Somatostatin receptor type 2 mediates bombesin-induced inhibition of gastric acid secretion in mice. *J. Physiol.(Lond.)*. 549: 889-901.

2- Resúmenes (comunicaciones a congresos)

Piqueras L, Martínez V. (2002). Bombesin-induced inhibition of gastric acid secretion is mediated by somatostatin: Evidence from somatostatin receptor type 2 knockout mice. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 24 (Suppl. A): 73.

XXIV Congreso de la Sociedad Española de Farmacología, Toledo, Septiembre 2002.

Piqueras L, Villagrasa V, Martínez V. (2002). Gastrointestinal secretory and motor alterations associated to iodoacetamide-induced gastric inflammation in mice. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 24 (Suppl. A): 130.

XXIV Congreso de la Sociedad Española de Farmacología, Toledo, Septiembre 2002.

Piqueras L, Martínez V. (2003). Role of somatostatin receptor subtypes on the control of gastric acid secretion in mice. *J. Physiol (Lond.)* 548P:1P-2P.

XXXII Congress of The Spanish Physiological Society. Tenerife, Febrero 2003.

Piqueras L, Martínez V. (2003). Gastric hipersecretion associated to iodoacetamide induced mild gastritis in mice. *Gastroenterology* 124 (sppl 1): A-443.

Digestive Diseases Week - Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, Orlando, Florida, USA, Mayo 2003.

Piqueras L, Taché Y, Martínez V. (2003). Bombesin Induced inhibition of gastric acid secretion is mediated by somatostatin: Evidence in SSTR2 knockout mice. *Gastroenterology* 124 (sppl 1): A-141.

Digestive Diseases Week - Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, Orlando, Florida, USA, Mayo 2003.

Piqueras L, Taché Y, Martínez V. (2003). Somatostatin receptor type 2 (SSTR2) knockout and antagonist blocked PACAP-induced inhibition of gastric acid secretion in mice. *Gastroenterology* 124 (sppl 1): A-608.

Digestive Diseases Week - Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, Orlando, Florida, USA, Mayo 2003.