

EFFECTOS DE LA SECRETINA Y COLECISTOQUININA-PANCREOZIMINA EXOGENAS SOBRE LA SECRECIÓN PANCREÁTICA EXOCRINA EN EL POLLO

Ginés Salido M. (Dr Biol), Luis Raggi S.*(MV; DMV), Juan Antonio Madrid P. (Dr Biol)

Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Cáceres, España.

* Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Chile. Casilla 2, Correo 15. Santiago, Chile.

EFFECTS OF EXOGENOUS SECRETIN AND CHOLECYSTOKININ-PANCREOZYMIN ON PANCREATIC EXOCRINE SECRETION IN CHICKEN

The object of this work is to study the effect of exogen administration of secretin and cholecystokinin-pancreozymin, (CCK-PZ) on the flow of pancreatic juice, total protein and amylase activity in the chicken.

Porcine secretin at a dose of 5 U/kg body weight, by rapid intravenous injection, had a clear action stimulating the chicken's pancreatic exocrine secretion flow (increase 155%). No significant changes were observed on total protein concentration, but amylase activity decreased 35%. CCK-PZ from pig intestinal mucosa administered at a dose of 5 U/kg body weight in the same way increased both secretion flow (100%) and amylase activity (107%). Potentiation did not occur when both hormones were administered jointly (5 U of secretin plus 5 U of CCK-PZ/kg body weight). These results may reflect differences in the structural properties of avian versus mammalian secretin and CCK-PZ or simply differences in the metabolic clearance rates of mammalian secretin and CCK-PZ in birds and mammals.

Está bien establecido que, tanto la instilación de ácido clorhídrico en duodeno de pollo como de una solución de peptonas, incrementan el volumen de la secreción pancreática exocrina y su concentración proteica (Kokue, 1972). Asimismo, la inyección intravenosa de dosis graduales de extracto duodenal de pollo produce incrementos crecientes en el flujo de jugo pancreático de aves y mamíferos (Dockray, 1975). Además se ha detectado mediante técnicas inmunorreactivas, la existencia en duodeno de pollo de actividades similares a colecistoquinina ("CCK-simil") (Larsson y Rehfeld, 1977) y "secretina-simil" (Polak y Cols., 1974).

Si bien todos estos hallazgos sugieren tanto la existencia de secretina como de Colecistoquinina-Pancreozimina (CCK-PZ) en el duodeno de esta especie, el papel fisiológico de estas dos hormonas en la regulación de la secreción pancreática exocrina del pollo permanece sin conocerse, persistiendo incluso la controversia acerca de si se-

cretina y CCK-PZ exógenas son o no estimulantes de dicha secreción.

MATERIAL Y METODOS

Para la ejecución del presente trabajo se utilizó siete pollos broiler, de pesos comprendidos entre 2,0 a 2,5 kg. El período de ayuno previo a las intervenciones quirúrgicas se estandarizó en 24 horas, si bien durante este tiempo los animales tuvieron libre acceso al agua.

Las aves fueron anestesiadas intravenosamente con tiobarbital sódico (12-25 mg/kg peso corporal) administrado lenta y progresivamente. La anestesia fue inducida con benzodiazepam (Valium NR) en dosis de 10 mg/kg peso corporal.

Tras llevar a cabo una laparatomía lateral derecha en condiciones asépticas, se localizó el páncreas y el conducto pancreático principal, del que se disecaron aproximadamente 5 mm próximos a su desembocadura en duodeno, con el fin de introducir dos catéteres de Si-

lastic (NR) a través de dos incisiones practicadas en el segmento disecado. Uno de ellos, colocado en sentido duodeno-páncreas, permitiría la recolección del jugo pancreático, y el otro, colocado en sentido opuesto, sería usado para reingresar en duodeno el jugo pancreático no necesario para los análisis.

Ambos catéteres se exteriorizaron mediante transfijión en la pared abdominal derecha. Tras cerrar la incisión abdominal mediante suturación por planos con seda (Braun Nº 0, NR), se cubrió con un vendaje plástico. Tras la intervención quirúrgica, y una vez recuperadas las aves, se les permitió el acceso al agua a las 6 horas y al alimento a las 12 horas.

Los experimentos fueron realizados, transcurridos 4 días desde la intervención quirúrgica, en animales ayunados durante 24 horas. Para la obtención de jugo pancreático, los pollos fueron alojados en jaulas individuales y la tasa de secreción pancreática se determinó mediante un contador de gotas piezoeléctrico (Drop A-978, E & M, Houston) conectado a un polígrafo (Physiograph, E & M, Houston). El jugo pancreático recolectado fue congelado inmediatamente a -20°C hasta su posterior análisis.

Con el fin de minimizar las influencias derivadas de la existencia en esta especie de oscilaciones circadianas de la secreción pancreática basal (Salido y Cols., 1984) los experimentos comenzaron siempre a las 18:00 horas.

La inyección de hormonas, secretina porcina (Calbiochem A grade, 80-120 unidades clínicas/ml; 1 unidad clínica \approx 4 unidades Crick-Harper-Raper), CCK-PZ porcina (Calbiochem B grade, 10 unidades Ivy/ml; 1 unidad Ivy \approx 1 unidad Crick-Harper-Raper), se realizó a través de un catéter implantado en la vena alar. Ambas hormonas fueron diluidas en solución salina 90%, ligeramente heparinizada antes de su inyección.

La determinación de proteína total presente en el jugo pancreático se realizó utilizando espectrofotometría directa a 280 nm. Las lecturas obtenidas en un espectrofotómetro (UNICAM SP 600 UV) se compararon con una curva patrón de clorhidrato de L-Tirosina, expresándose los valores en μmol de tirosina por ml de jugo pancreático (Murillo y López, 1971). La actividad amilásica fue determinada de acuerdo con el método de Noelting y Bernfeld (1948), expresándose los resultados en unidades de actividad amilásica (UAA).

Se calculó el valor medio y error estándar de la media de las muestras pertenecientes al mismo parámetro. Para el estudio de la diferencia entre

las medias muestrales se empleó el "test" de "t" de Student para parejas de muestras relacionadas entre sí, ya que estos corresponden a una sola serie de individuos, considerándose como nivel de significación $P < 0,05$.

RESULTADOS

La inyección de secretina (5 U/kg) provocó un incremento significativo ($P < 0,02$) en el flujo de jugo pancreático que alcanzó un valor medio durante los 15 minutos que duró la respuesta, de $10,71 \pm 1,80 \mu\text{l}/\text{min}$, siendo los valores previos a la inyección de la hormona de $4,19 \pm 0,58 \mu\text{l}/\text{min}$ (Cuadro 1). Este incremento, que supone un 155% sobre los niveles basales, comenzó a ser significativo entre los 3-6 minutos siguientes a la inyección, alcanzó su máximo en el período comprendido entre 6-9 minutos, para descender rápidamente y volver a los valores previos a la secretina a los 12-15 minutos (Fig. 1).

La CCK-PZ (5 U/kg) también se mostró efectiva incrementando el flujo de secreción ($P < 0,002$), por cuanto el flujo medio en los 15 minutos que duró la respuesta a dicha hormona fue de $6,06 \pm 0,54 \mu\text{l}/\text{min}$, lo que representaría una elevación, con respecto al valor previo a la inyección ($2,90 \pm 0,13 \mu\text{l}/\text{min}$) de aproximadamente un 100% (Cuadro 1). En este caso no se observa un incremento tan marcado en el flujo de secreción como tras la secretina, si bien la duración de la respuesta fue prácticamente idéntica (Fig. 1).

La administración conjunta, en una sola inyección, de secretina y CCK-PZ, indujo una respuesta secretora del 138% con respecto a los valores basales previos a dicha inyección ($4,53 \pm 0,88 \mu\text{l}/\text{min}$), siendo el valor medio del flujo de jugo secretado durante la respuesta de $10,81 \pm 1,34 \mu\text{l}/\text{min}$, y la diferencia entre ambos valores estadísticamente significativa ($P < 0,02$; Cuadro 1). La respuesta siguió un patrón temporal más parecido al obtenido con secretina sola que con CCK-PZ sola (Fig. 1).

La concentración de proteína total del jugo pancreático no sufrió variaciones por la inyección de secretina ($2,57 \pm 0,43 \mu\text{mol/L-tir/ml}$ y $2,55 \pm 0,36 \mu\text{mol L-tir/ml}$, antes y después de la inyección). Sin embargo, la actividad amilásica experimentó un descenso que, si bien no fue estadísticamente significativo, supone una disminución del 35% ($21,89 \pm 6,42 \text{ UAA/ml}$ y $14,27 \pm 5,56 \text{ UAA/ml}$ antes y después de secretina, respectivamente) (Cuadro 1).

Dado que la concentración de proteína total no se modificó por la administración de secreti-

Cuadro 1. Efectos de la secretina y CCK-PZ sobre el flujo y composición de la secreción pancreática exocrina de pollos no anestesiados.

	Flujo $\mu\text{l}/\text{min}$	Proteína total $\mu\text{mol l-tir}/\text{ml}$	Actividad amilásica UAA/ml
Control	$4,19 \pm 0,58$	$2,57 \pm 0,43$	$21,89 \pm 6,42$
Secretina	$10,71 \pm 1,80$	$2,55 \pm 0,36$	$14,27 \pm 5,56$
NS	$p < 0,02$	—	—
Control	$2,90 \pm 0,31$	$2,50 \pm 0,41$	$10,81 \pm 3,32$
CCK-PZ	$6,06 \pm 0,54$	$2,72 \pm 0,41$	$22,37 \pm 7,40$
NS	$p < 0,002$	—	—
Control	$4,53 \pm 0,88$	$2,31 \pm 0,16$	$14,32 \pm 7,29$
CCK-PZ+	$10,81 \pm 1,34$	$2,40 \pm 0,51$	$16,00 \pm 6,85$
secretina	$p < 0,02$	—	—
NS			

Efectos de la inyección intravenosa de secretina (5 U/kg; n = 7), CCK-PZ (5 U/kg; n = 7) y secretina + CCK-PZ (5 U/kg + 5 U/kg; n = 7) sobre el jugo pancreático del pollo. Valores medios + error estándar de la media. NS = nivel de significación.

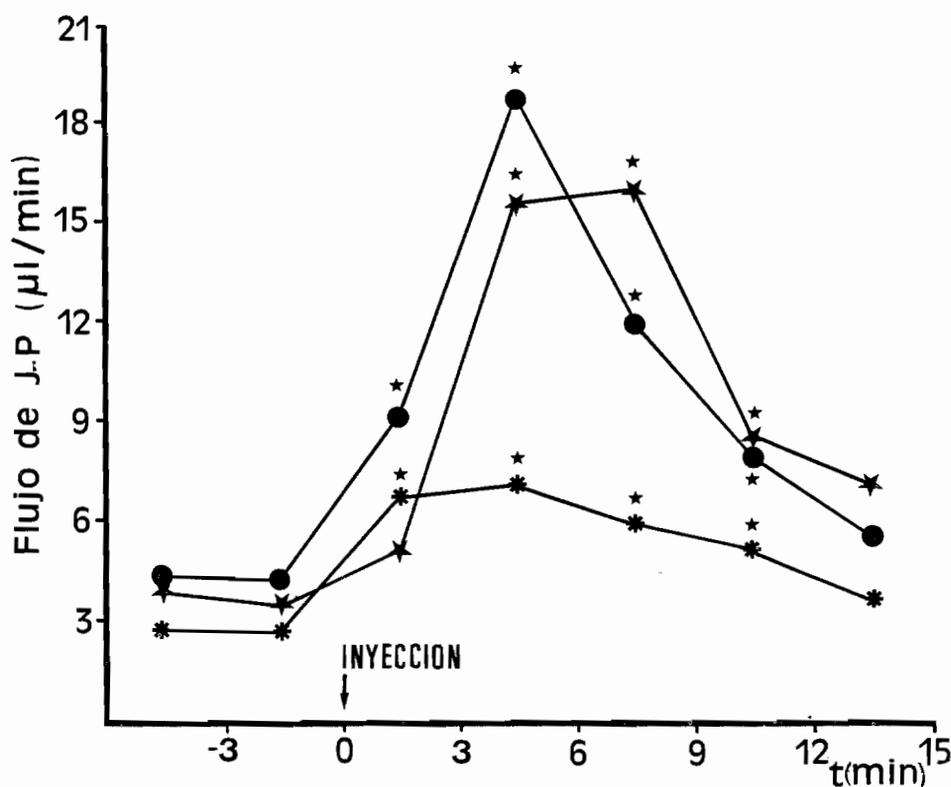


Figura 1. Modificaciones del flujo de jugo pancreático por inyección de secretina (*), CCK-PZ (*) y secretina + CCK-PZ (●); n = 7. Los valores marcados (*) difieren significativamente (al menos $p < 0,05$) de sus respectivos valores previos a la inyección.

na, su producción ($\mu\text{mol L-tir}/\text{min}$) varió significativamente con respecto a los valores previos a la inyección de la hormona de la misma forma que lo hizo el flujo de jugo pancreático (Fig. 2).

La CCK-PZ administrada sola, modificó muy ligeramente la concentración de proteína total del jugo pancreático, y de forma ostensible aunque estadísticamente no significativa, la actividad

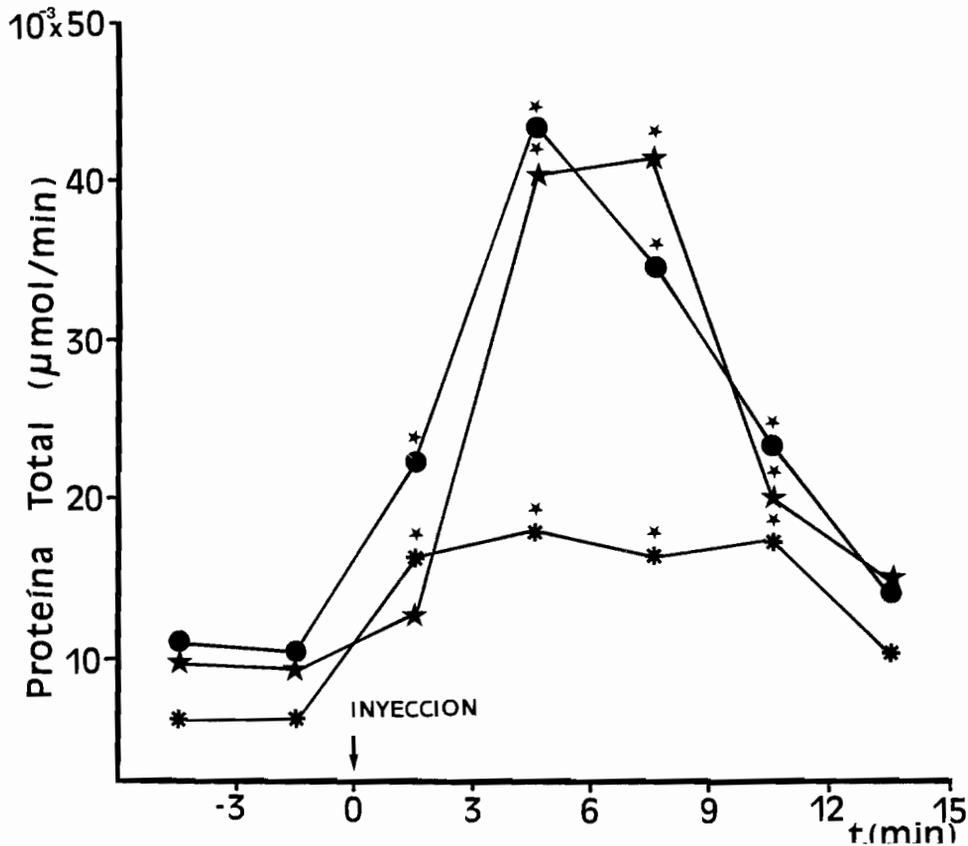


Figura 2. Modificaciones de la producción de proteína total del jugo pancreático por inyección de secretina (*), CCK-PZ (*) y secretina+ CCK-PZ (●); n = 7. Los valores marcados (*) difieren significativamente de sus respectivos valores previos a la inyección (al menos $p < 0,05$).

amilásica de dicho jugo (Cuadro 1). La producción de proteína total sufrió modificaciones análogas a las experimentadas por el flujo de jugo pancreático (Fig. 2).

Administradas conjuntamente a las dosis antes indicadas, ambas hormonas inducen, tanto en la concentración de proteína total como en la actividad amilásica del jugo pancreático secretado, modificaciones con respecto a los niveles previos a su inyección, que podemos considerar como intermedias entre los efectos producidos sobre dichos componentes de forma individual por las citadas hormonas (Cuadro 1).

En la figura 3, que representa las variaciones sufridas por la producción de amilasa en las tres situaciones experimentales estudiadas, se puede observar que los incrementos más significativos con respecto a los niveles basales previos se producen tras la administración de CCK-PZ, y en mayor grado tras la inyección conjunta de ambas hormonas. Los cambios ocasionados por la se-

cretina sólo difieren de los valores previos a la inyección en el período comprendido entre los 3-9 minutos.

DISCUSION

Los experimentos realizados muestran que la inyección intravenosa de 5 U/kg de secretina porcina incrementa el flujo de jugo pancreático sin modificar su concentración de proteína total en pollos no anestesiados. Estos resultados que confirman los obtenidos por Kokue (1972), son contrarios a los descritos por Angelucci y Cols., (1970). Según estos autores, la infusión intravenosa de dosis crecientes de secretina porcina no modifica el flujo de secreción pancreática del pollo anestesiado; ello les hizo sugerir que la secreción pancreática en esta especie no está regulada por hormonas "secretina-simil". Tampoco Caple y Cols. (1978) encuentran respuesta secretora en pollos no anestesiados, tras

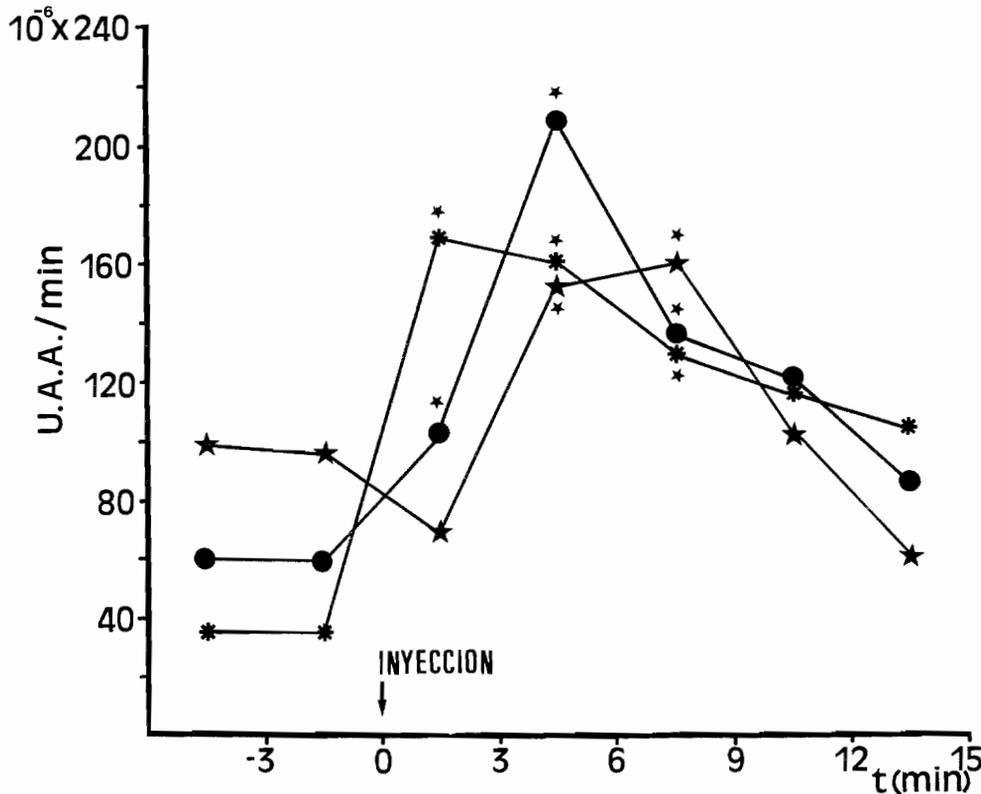


Figura 3. Modificaciones de la producción de amilasa del jugo pancreático por inyección de secretina (★), CCK-PZ (●) y secretina+ CCK-PZ (●); n = 7. Los valores marcados (*) difieren significativamente de sus respectivos valores previos a la inyección (al menos $p < 0,05$).

la inyección intravenosa de 35 U/kg de secretina porcina.

La contradicción existente entre nuestros resultados y los obtenidos por estos autores puede tener su origen en el diseño experimental seguido por ellos, dado que según fue puesto de manifiesto hace algunos años (Heatley y Cols., 1965; Hulan y Cols., 1972), la canulación directa del conducto pancreático del pollo entraña la formación de tapones mucosos que pueden obstruir temporalmente el conducto, con las consiguientes anomalías en la cuantificación de la tasa de secreción. Estas limitaciones del método se pueden superar comenzando los experimentos una vez transcurridos 3 a 5 días desde la implantación de las cánulas, tiempo necesario para que el flujo basal de secreción se mantenga en sus límites de normalidad (Salido y Cols., 1981).

Si bien, en nuestros experimentos, el páncreas de pollo es capaz de responder a una inyección de secretina, coincidimos con otros investigado-

res (Kokue y Hayama, 1976; Dimaline y Dockray, 1979) en señalar la poca sensibilidad del páncreas de las aves a la secretina exógena, si la comparamos con la mostrada por otras especies como la oveja, en la que con dosis sensiblemente inferiores a las utilizadas en este trabajo (0,02 U/kg de secretina y 1 U/kg de CCK-PZ) se producen incrementos del flujo de 100% y 50%, respectivamente (Zamora y Cols., 1979). Este hecho puede reflejar diferencias en las propiedades biológicas y estructurales de la secretina de aves y mamíferos (Dockray, 1973; Dockray, 1977) y/o diferencias en la velocidad de catabolización de la secretina porcina en aves y mamíferos. Los resultados obtenidos por nosotros, administrando 5 U/kg de CCK-PZ porcina, son similares a los descritos por Kokue (1972), si bien en nuestro caso esta hormona se muestra más eficaz incrementando la actividad amilásica que la concentración proteica. Al igual como se ha postulado para la secretina, recientes estudios han refleja-

do diferencias estructurales entre CCK-PZ porcina y de pollo, que pueden tener gran importancia biológica (Vigna, 1984).

Por último y a diferencia de lo que ocurre en mamíferos (Way y Grossman, 1970; Beglinger y Cols., 1984), no hemos observado potenciación de las acciones de la CCZ-PZ y secretina al administrarla conjuntamente. Tampoco Dimaline y Dockray (1979) han encontrado diferencias significativas en el flujo ni en la secreción proteica del páncreas de pavo, en respuesta a una infusión de secretina aviar y CCK8 (octapéptido terminal de CCK) respecto a la obtenida con CCK8 sola. La definitiva purificación y determinación de la secretina y CCK de pollo, y su posterior bioensayo, podrían sin duda contribuir a esclarecer el controvertido control hormonal de la secreción pancreática en las aves.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de la administración exógena de secretina y CCK-PZ sobre el flujo de jugo pancreático y su composición, media en términos de proteína total y actividad amilásica, en el pollo.

La secretina porcina en dosis de 5 U/kg peso corporal, en inyección intravenosa rápida, tuvo una clara acción estimulando el flujo de secreción pancreática exocrina en el pollo (incremento de 155%). No se observaron cambios en la concentración de proteína total, pero la actividad amilásica disminuyó en un 35%. La CCK-PZ de mucosa intestinal porcina administrada en dosis de 5 U/kg peso corporal en la misma forma, incrementó tanto el flujo de secreción (100%) como la actividad amilásica (107%). No se observó potenciación cuando ambas hormonas fueron administradas conjuntamente (5 U de secretina más 5 U de CCK-PZ/kg de peso corporal). Estos resultados pueden reflejar diferencias en las propiedades estructurales de la secretina de aves frente a la de mamíferos o simplemente diferencias en las velocidades de aclaramiento metabólico de la secretina y CCK-PZ de mamíferos en aves y mamíferos.

REFERENCIAS

- ANGELUCCI, L., M. BALDIERI, G. LINARI, The action of caerulein on pancreatic and biliary secretions of the chicken. *Eur. J. Pharmacol.* 11: 217-232, 1970.
- BEGLINGER, C, M.I. GROSSMAN, T.E. SOLOMON. Interaction between stimulants of exocrine pancreatic secretion in dogs. *Am. J. Physiol.* 246 : G173-G179, 1984.
- CAPLE, I.W., C.G. HALPIN, T. HEATH. Bile and pancreatic secretion in chickens: The effects of bile salts, feeding and acid. *Comp. Biochem. Physiol.* 61A: 653-659, 1978.
- DIMALINE, R., G.J. DOCKRAY. Potent stimulation of the avian exocrine pancreas by porcine and chicken vasoactive intestinal peptide. *J. Physiol.*, 29: 153-163, 1979.
- DOCKRAY, G.J. Vasoactive intestinal peptide: secretin like action of the avian pancreas. *Experientia*, 29: 1510-1511, 1973.
- DOCKRAY, G.J. Comparison of the actions of porcine secretin and extracts of chicken duodenum on pancreatic exocrine secretion in cat and turkey. *J. Physiol.*, 244: 625-637, 1975.
- DOCKRAY, G.J., Molecular evolution of gut hormones: Application of comparative studies on the regulation of digestion. *Gastroenterology* 72: 344-358, 1977.
- HEATLEY, N.G., F. MCELHENY, S. LEPKOVSKY. Measurement of the rate of flow of pancreatic secretion in the anaesthetized chicken. *Comp. Biochem. Physiol.*, 16: 29-36, 1965.
- HULAN, H.W., G. MOREAU, F.H. BIRD. A method for cannulating the main pancreatic juice. *Pult. Sc.* 51: 531-536, 1972.
- KOKUE, E. A study on the pancreatic secretion in chicken. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture & Technology.* 16: 1-26, 1972.
- KOKUE, E., T. HAYAMA. The exogenous secretin in chicken: Minor physiological role in exocrine pancreatic secretion. *Jap. J. Physiol.* 26: 1-8, 1976.
- LARSSON, L.I., J.F. REHFELD, Evidence for a common evolutionary origin of gastrin and cholecystokinin. *Nature*, 269: 335-338, 1977.
- MURILLO, A., M.A. LOPEZ. Contribution to the hormonal control of pancreatic secretion in the rabbit. *Rev. Esp. Fisiol.*, 27: 131-138, 1971.
- NOELTING, G., P. BERNFELD. Sur les enzymes amylolytiques III. La B-amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d'a-amylase. *Helv. Chim. Acta.*, 31: 286-290, 1948.
- POLAK, J.M., A.G.E. PEARSE, C. ADAMS, J.C. GAUD. Immunohistochemical and ultrastructural studies on the endocrine polypeptide (APUD) cells of the avian gastrointestinal tract. *Experientia*, 30: 564-567, 1974.
- SALIDO, G.M., A. ESTELLER, M.A. LOPEZ. Nueva técnica experimental para el estudio de la secreción pancreática exocrina en el pollo anestesiado. *Ars Pharm.* 22: 375-385, 1981.
- SALIDO, G.M., J.A. MADRID, E.A. MARTIN, A. ESTELLER, M.A. LOPEZ. Circadian rhythmicity in the "basal" pancreatic secretion of the domestic fowl. *Chronobiol. Internac.* 1: 173-176, 1984.
- VIGNA, S.R. Radioreceptor and biological characterization of cholecystokinin and gastrin in the chicken. *Am. J. Physiol.* 246: G296-G304, 1984.
- WAY, L.W., M.I. GROSSMAN. Pancreatic stimulation by duodenal acid and exogeneous hormones in conscious cats. *Am. J. Physiol.*, 219: 449-454, 1970.
- ZAMORA, S., G.M. SALIDO, A. ESTELLER, M.A. LOPEZ. Influencias hormonales y nerviosas sobre las secreciones biliar y pancreática en la oveja anestesiada. *Actas XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas.* 1979, pp. 187.

Aceptado para su publicación 18 Marzo 1986.