



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

DISEÑO DE UN RADIOINMUNOENSAYO PARA
LA MEDICIÓN DE COLECISTOQUININA EN
TEJIDO CEREBRAL Y LIQUIDO
CEFALORRAQUÍDEO DE RATA

T E S I S

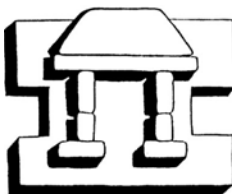
PARA OBTENER EL TITULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA

ROSA ELIZABETH NOGUEZ HERNANDEZ

Director de Tesis: Dr. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA. MÉXICO, 2005.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECEMOS EL APOYO OTORGADO POR
LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS
DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA) UNAM
DONATIVO IN 221805
PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO

Agradecimientos

A mis padres,

Que Dios no pudo escoger de una manera mejor y que sólo él sabe cómo los he extrañado.

Gracias por darme el regalo de la vida,
por haberme formado y guiado como persona,
por la libertad otorgada para permitirme ser quien soy,
por querer, entender y apoyar en todo momento al imperfecto ser que llevo dentro,
y sobre todo por enseñarme que trabajando, no hay nada imposible.

A Vero,

Por tu cariño, apoyo y comprensión, por nunca juzgarme,
por cuidar de mí todo este tiempo
y por que sé que si caigo, estarás ahí para tomar mi mano y levantarme.

A Jorge,

Por el milagro de la vida... agradezco a Dios que continúes aquí.

Al Dr. Miguel Pérez de la Mora

Por su infinita paciencia, por compartir conmigo sus conocimientos,
por brindarme su amistad y por la dirección de este trabajo.

A Edgar y a mi tía Mary,

Por el apoyo brindado y por saber esperar este momento.

A mis amigos,

Berta, Erika, Olivia, Rocío y Luis David,
que por medio de las discusiones y preguntas, me hacen crecer como persona,
mil gracias por tantas risas y momentos inolvidables.

A mis compañeros del laboratorio AL-203 del IFC

Ana, Ale, Naty, Mine, y Chucho por todo el apoyo y la confianza.

A Bertha Segura, Leticia Moreno, Julia Reyes y Jaime Barral,
por los conocimientos que aportaron para mejorar este trabajo.

Dedico este trabajo a mis amados sobrinos:

Cristopher, Michel y Lissette

Por ser la sangre nueva que
con sus sonrisas,
impulsan a seguir en la lucha.

Espero que este pequeño esfuerzo
sirva como un estímulo a su superación
y pido a Dios que las metas
que se tracen en la vida
no les sean duras ni lejanas.

Índice

Introducción	1
1 Descubrimiento de la CCK	3
1.1 Clonación molecular de la CCK	4
2 Metabolismo de la CCK	5
2.1 Biosíntesis	5
2.2 Liberación	7
2.3 Degradación	8
3 Receptores	10
3.1 Distribución de los receptores para la CCK	10
4 Agonistas y antagonistas de los receptores para la CCK	13
4.1 Agonistas	13
4.2 Antagonistas	14
5 Distribución	16
5.1 Principales proyecciones CCKérgicas	17
6 Acciones biológicas de la CCK	19
6.1 Saciedad	20
6.2 Analgesia	21
6.3 Memoria	23
6.4 Mal de Alzheimer	25
6.5 Esquizofrenia	26
6.6 Ansiedad	27
7 Interacción con otros neurotransmisores	30
7.1 Dopamina	31
7.2 Ácido γ -aminobutírico	31
7.3 Serotonina	33
7.4 Aminoácidos excitatorios	34
7.5 Péptidos opioides	34
8 Justificación	36
9 Hipótesis	38
10 Objetivos	39

10.1	Objetivo general	39
10.2	Objetivos particulares	39
11	Metodología	40
11.1	Materiales	40
11.2	Preparación del antígeno	40
11.3	Técnica de acoplamiento	40
11.4	Inmunización	41
11.5	Esquema de inmunización	41
11.6	Evaluación de anticuerpos	41
11.7	Detección de anticuerpos	42
11.8	Experimentos de saturación	42
11.9	Radioinmunoensayo	43
11.10	Especificidad	44
11.11	Extracción de la CCK en tejido	44
12	Resultados	45
12.1	Título	45
12.2	Afinidad	47
12.3	Radioinmunoensayo	48
12.4	Especificidad	50
12.5	Cuantificación de la CCK en material biológico	59
13	Discusión	62
14	Conclusión	66
15	Bibliografía	67

Introducción

Una de las moléculas más interesantes de la neurobiología es, sin lugar a dudas, la colecistoquinina (CCK). Se trata de una familia de mensajeros químicos de alto peso molecular que, además de ser la familia de neuropéptidos más abundante y ampliamente distribuida en el Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos, funciona como una familia de neurotransmisores que están involucrados en la regulación de numerosos procesos fisiológicos y de comportamiento (Rehfeld, 2004).

A partir del descubrimiento de la CCK en el SNC (Vanderhaeghen et.al., 1975), se han realizado una gran cantidad de estudios para determinar el papel funcional que ésta familia juega en el SNC. Dentro de estas investigaciones, la cuantificación de las distintas formas de la CCK es una parte fundamental, ya que para poder establecer con precisión su función, es necesario contar con un método sensible y específico para medirlas.

Como resultado de las numerosas investigaciones realizadas, actualmente se ha establecido que uno de los miembros de esta familia, la CCK-8 sulfatada (CCK-8s, Fig. 1) cumple con los criterios establecidos para ser considerada como un neurotransmisor, tanto en sinapsis centrales como periféricas. Su potente actividad transmisora y su expresión masiva en casi todas las regiones del SNC indican que la CCK-8s desempeña funciones significativas en múltiples procesos cerebrales y se considera que está involucrada principalmente en la regulación de la ansiedad (Wang, et.al., 2005), la saciedad (Volkoff, et.al., 2005), la analgesia (Ossipov, et.al., 2004), el aprendizaje y la memoria (Gulpinar & Yegen, 2004).

Un creciente cuerpo de evidencias han implicado a la CCK-8s en la etiopatogenia de enfermedades psiquiátricas y desórdenes neurológicos que incluyen a la enfermedad de Alzheimer (Löfberg, et.al., 1996), a la esquizofrenia (de Wied & Sigling, 2002), al miedo, al estrés y a la ansiedad (Wang, et.al., 2005; Rotzinger & Vaccarino, 2003).

Asimismo se han encontrado evidencias de interacciones entre la CCK-8s y neurotransmisores clásicos tales como la dopamina (DA) (Rotzinger, et.al., 2002; Hökfelt, et.al., 2002), el ácido γ -amino butírico (GABA) (Pérez de la Mora, et.al., 1993; Lanza & Makoveck, 2000), la serotonina (5-HT) (Voigt, et.al., 1998; Becker, et.al., 1999a), la noradrenalina (NA) (Beinfeld, 1998; Crawley & Corwin, 1994), los aminoácidos excitatorios (EAAs) (Hökfelt, et.al., 2002; You, et.al.,1997) y los péptidos opioides. (Mollereau, et.al., 2005).

A pesar de los avances obtenidos en 25 años tal vez no sea sorprendente en vista de la naturaleza ubicua de la CCK y de los mecanismos tan complejos a través de los cuales actúa, que hoy en día su significado funcional aún esté lejos de entenderse. Es por ello que los investigadores siguen concentrando sus esfuerzos alrededor de ésta tan interesante familia.

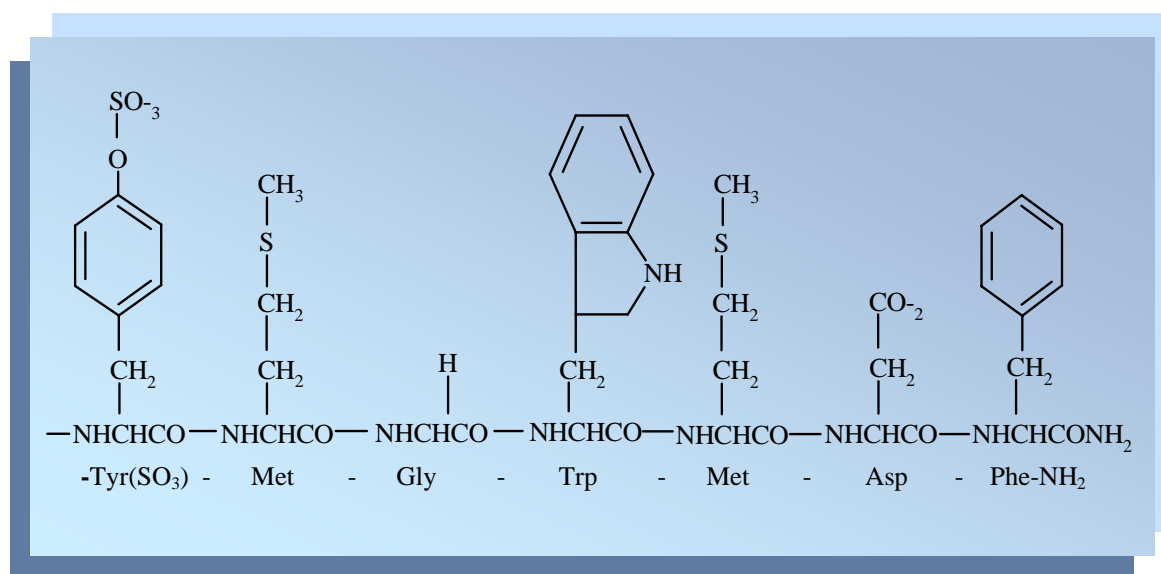


Fig. 1. Esquema de la estructura química de la secuencia amidada del heptapéptido O-sulfatado ($-\text{Tyr}(\text{SO}_3)-\text{Met}-\text{Gly}-\text{Trp}-\text{Met}-\text{Asp}-\text{Phe}-\text{NH}_2$), la cual constituye el sitio activo específico de la CCK.

1 Descubrimiento de la CCK

El descubrimiento de una hormona que eventualmente sería llamada colecistoquinina data de principios del siglo XX. Ivy & Oldberg en 1928, fueron los primeros en describir una sustancia que se liberaba del intestino y producía contracción vesicular. Ellos sugirieron que esta hormona debería llamarse colecistoquinina (“CCK: La que mueve la vesícula biliar”). Harper & Raper en 1943 descubrieron una sustancia proveniente de la mucosa duodenal de cerdos, la cual estimulaba la secreción de enzimas pancreáticas. Ellos llamaron a esta hormona pancreozina (PZ). Originalmente se pensó que la PZ y la CCK eran dos hormonas diferentes, pero después de su purificación y caracterización por Mutt & Jorpes en 1971 se demostró que eran idénticas (Beinfeld, 1998). Posteriormente la CCK se identificó como un péptido de 33 (CCK-33) y 39 (CCK-39) residuos de aminoácidos. Dichos péptidos poseen los mismos 5 aminoácidos carboxilo terminal que la gastrina, un péptido aislado del estómago en 1964 (Rehfeld, 1978a). La gastrina y la CCK provienen de prohormonas separadas, aunque las múltiples similitudes entre ellas sugieren que se originaron de un precursor común en un tiempo evolutivo temprano (Beinfeld, 1998).

La confusión sobre la naturaleza química de la CCK en el sistema nervioso central (SNC) comenzó en 1975, cuando Vanderhaeghen y colaboradores detectaron en el cerebro de varias especies de vertebrados, incluyendo al hombre, un pequeño péptido muy abundante, que poseía una inmunoreactividad parecida a la de la gastrina. Posteriormente basándose su comportamiento cromatográfico, en su actividad biológica y en el análisis de la secuencia de aminoácidos, éste material fue identificado como el octapéptido sulfatado de la colecistoquinina (CCK-8s) (Asp-Tyr(SO₃)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) (Vanderhaeghen, et.al., 1975; Dockray, 1977; Rehfeld, 1978b; Robberech, et. al., 1978).

Hasta 1975 aún se consideraba que los péptidos del SNC y los del intestino eran diferentes. Se pensaba que el cerebro contenía factores de liberación hipotalámicos y

que el intestino tenía hormonas gastrointestinales. El descubrimiento de la abundancia y amplia distribución de la CCK y otros péptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) en el cerebro, junto con la presencia de somatostatina en intestino fue parte de una mini-revolución que llevó a pensar en neuropéptidos biológicamente activos. La presencia en el SNC de lo que se consideraba una hormona gástrica abrió una gran variedad de campos experimentales enfocados principalmente a explicar el significado funcional de la CCK en el cerebro (Beinfeld, 1998).

1.1 Clonación Molecular de la CCK

El conocimiento de la estructura de la CCK aumentó grandemente con la clonación de la secuencia del cDNA para la CCK en la rata. Esto fue seguido en rápida sucesión, por la clonación de los cDNAs de cerdo y humano. El gen humano de la colecistoquinina se encuentra en el cromosoma tres. La unidad de transcripción comprende 7 kb y esta interrumpida por dos intrones. La región del promotor tiene 144 bases de 5' al sitio de inicio de la transcripción.

La CCK tiene una larga historia evolutiva que se remonta hasta la hidra, se piensa que la CCK y la gastrina probablemente evolucionaron a partir de una prohormona ancestral común. La secuencia de CCK-8 está altamente conservada a través de las especies de mamíferos. Estudios posteriores han mostrado que ésta similitud es muy alta en los péptidos biológicamente activos con extensiones aminoterminales variables.

La clonación del gen para CCK en rata ha revelado que el promotor contiene un número de elementos reguladores todos localizados dentro de 100 pares de bases de la caja TATA incluyendo un supuesto elemento básico “cierre de leucina” hélice-asa-hélice, un elemento SP1, y un elemento respuesta combinado para el AMP cíclico y el TPA (acetato-13 tetradecanoilforbol) (Beinfeld, 1998).

2 *Metabolismo de la CCK*

Muchas proteínas biológicamente activas son sintetizadas como grandes precursores que permanecen inactivos hasta que son procesados proteolíticamente en sus sitios de acción. La división de los precursores proteicos para generar péptidos bioactivos, ocurre en sitios específicos de la molécula que involucran uno o más residuos de aminoácidos básicos. Así, su procesamiento implica modificaciones post-translacionales que ocurren habitualmente antes de su secreción y que incluyen división proteolítica de la cadena peptídica, sulfatación de la tirosina, fosforilación de la serina, glicosilación y amidación del extremo carboxilo terminal, así como ciclización de la glutamina N-terminal.

Es importante señalar que la CCK es uno de los péptidos con el más impresionante patrón de procesamiento tisular. Al igual que muchas hormonas y neuropéptidos, los péptidos que constituyen la familia de la CCK, se producen inicialmente como una pre-pro-hormona de alto peso molecular (10 KD), denominada pre-pro-CCK (115 residuos) cuya estructura ha sido propuesta a partir de la secuencia de su mRNA en varias especies de vertebrados, incluyendo al hombre y a partir de la cual se forman los distintos miembros que constituyen a esta familia (Eberlein, et.al. 1992).

2.1 *Biosíntesis*

La biosíntesis de la CCK se lleva a cabo en el contexto de una vía secretora regulada donde las divisiones se llevan a cabo en estricto orden temporal involucrando a más de una enzima, los sitios más accesibles se dividen primero, lo que permite al precursor asumir una conformación diferente y exponer otros sitios (Lacourse, et.al. 1998).

Con base en los productos aislados del cerebro y células endocrinas en cultivo, Vishnuvardhan & Beinfeld (2002), Rehfeld, et.al. (2002) y Beinfeld (2003) han reportado que el modelo más probable para el procesamiento de la pre-pro-CCK a CCK-4 (Fig. 2) involucra los siguientes pasos:

- La pre-pro-CCK (115 residuos) se inserta en el retículo endoplásmico rugoso, donde por acción de una peptidasa señal, se remueve el péptido señal (20 residuos) por el lado amino terminal, separando la Treonina²⁰ de la Glutamina⁺¹ (Fig. 2), la cual es convertida espontáneamente a ácido pirrolidincarboxílico originando una molécula más pequeña llamada pro-CCK (95 residuos).

- La pro-CCK penetra la membrana del aparato de Golgi y asume su estructura tridimensional correcta, viaja al *trans*-Golgi donde tres de sus cuatro residuos de tirosina son sulfatados por una sulfotransferasa específica de tirosina unida a la membrana. La sulfatación de la tirosina en la CCK-8 es importante para su actividad biológica.

- En la red del *trans*-Golgi la pro-CCK sulfatada es almacenada en gránulos secretorios con otro material destinado para regular la vía secretora. Las características estructurales de la pro-CCK (o cualquier otro proneuropéptido) que permiten que sea reconocida como material secretorio son desconocidas.

- En los gránulos secretorios una prohormona convertasa remueve 9 residuos de la extensión C-terminal (Ser-Ala-Glu-Glu-Tyr*-Glu-Tyr*-Pro-Ser⁹⁵), originando la secuencia Gly-Arg-Arg (84-86), que constituye el sustrato para la carboxipeptidasa E.

- La carboxipeptidasa E actúa entonces en las vesículas sinápticas dividiendo la secuencia 84-86, generando el extremo terminal R-Phe-Gly.

- La Glicina terminal (84) es convertida en una amida por acción de la PAM (Peptidilglicina α -Amidasa Monooxigenasa), produciendo una extensión carboxilo terminal α amidada (Phe-NH₂), formando entonces la CCK-83 que constituye la forma molecular bioactiva más larga de la CCK.

- La CCK-83 se divide a nivel de la Arg 25 por una endopéptidasa monobásica y se forma la CCK-58, la cual se divide a nivel de varios sitios monobásicos: Arg 44, Arg 50, Lys 61, Ile 72, Arg 75 y Gly 79, para liberar péptidos pequeños carboxiamidados de CCK, entre los que destacan CCK-39, CCK-33, CCK-22, CCK-12, CCK-8 sulfatada y CCK-4.

Las enzimas responsables de las divisiones monobásicas no han sido identificados definitivamente, aunque se ha observado que tres enzimas podrían estar involucradas en el procesamiento de la CCK-33 para producir CCK-8s, una serin proteasa llamada enzima generadora de la CCK-8, la aspartil proteasa 3 comprimida (YAP3) y la PC2 recombinante (Vishnuvardhan & Beinfeld, 2002; Rehfeld, et.al. 2002).

2.2 Liberación

Las formas de la CCK-8s y la CCK-4 recientemente sintetizadas se almacenan en los cuerpos celulares, concentrándose hasta su liberación en vesículas sinápticas de corazón denso, las cuales tienen diámetros grandes que se encuentran alrededor de 100 nm en promedio. Estas vesículas se localizan en zonas lejanas a los sitios de la membrana en donde se secretan los neurotransmisores “clásicos” (Ghijsen, et.al. 2001).

La liberación presináptica de la CCK-8s está regulada por la despolarización de la membrana terminal, en respuesta a la estimulación eléctrica con altas frecuencias y a las concentraciones elevadas de K^+ , que permiten la entrada del ion Ca^{++} a través de canales selectivos dependientes de voltaje. El aumento de la concentración intracelular de Ca^{++} intrasináptico provoca la liberación de la CCK-8s almacenada en las vesículas de corazón denso en sitios de la terminal axónica distantes a la zona activa (Verhage, et.al., 1991; Raiteri, et.al., 1993; Fink, et.al., 1998; You, et.al., 1998), una vez liberada la CCK-8s se difunde por el espacio sináptico hasta alcanzar su sitio receptor localizado en la membrana de la célula postsináptica.

La CCK-8s puede ser liberada de tejido cerebral usando fracciones sinaptosomales o rebanadas de tejido de corteza cerebral de rata, hipocampo, núcleo accumbens, hipotálamo, y cuerpo estriado. La liberación de la CCK-8s en el SNC está sujeta a la modulación por una variedad de neurotransmisores como dopamina (DA), GABA, serotonina, glutamato y opioides, dependiendo de la región que se estudie (Ghijsen, et.al. 2001), y se ha sugerido que la liberación de la CCK-8s puede ser dependiente de la interacción funcional entre diferentes mensajeros extra e intracelulares (Wiesenfeld-Hallin, et.al., 1999).

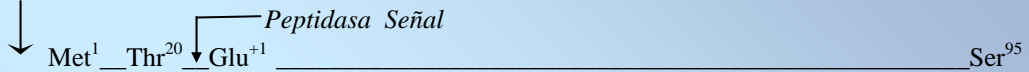
2.3 Degradación

Respecto a la degradación de la CCK-8s se ha demostrado que una sola enzima endopéptidasa es responsable de su inactivación, la enzima corresponde a una serin proteasa de masa molecular relativa (135 000 KD) identificada por su alto grado de homología con la tripeptidil peptidasa II humana (TPPII) (EC3.4.14.10). Esta enzima llena todos los criterios para ser considerada como la neuropeptidasa responsable de la desactivación de la CCK-8s, ya que en dos pasos divide rápidamente, con un alto grado de especificidad, al neuropéptido en fragmentos biológicamente inactivos. Cabe mencionar que la enzima es expresada por neuronas CCKérgicas y que su inhibición permite que la CCK-8s escape a su desactivación (Rose, et.al., 1996; Ganellin, et. al., 2000).

MODELO DE LA SÍNTESIS DE COLECISTOQUININA

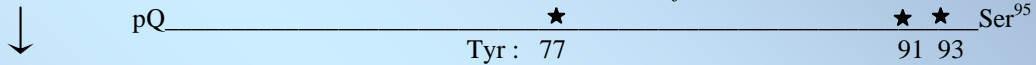
RETÍCULO ENDOPLÁSMICO RUGOSO

PRE-PRO-CCK



TRANS-GOLGI

PRO-CCK



GRÁNULOS SECRETORIOS

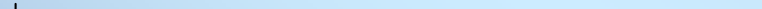
PRO-CCK-SULFATADA



VESÍCULAS SINÁPTICAS

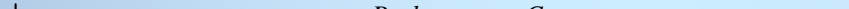


PRO-CCK

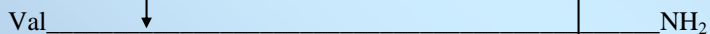


Endopéptidasa monobásica

CCK-8



CCK-58



CCK-39



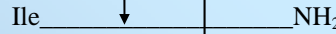
CCK-33



CCK-22



CCK-12



CCK-8



CCK-4



Fig. 2 Modelo de la síntesis de la CCK. La prepro-CCK se inserta en el retículo endoplásmico rugoso, donde una peptidasa remueve el péptido señal de 20 residuos por el lado amino terminal, la Glu⁺¹, se convierte espontáneamente a ácido pirrolidincarboxílico originando a la pro-CCK (95 residuos), que penetra la membrana del aparato de Golgi y asume su estructura tridimensional correcta, viaja al *trans*-Golgi donde tres residuos de tirosina son sulfatados. En la red del *trans*-Golgi la pro-CCK sulfatada se almacena en gránulos secretorios donde una prohormona convertasa remueve la extensión c-terminal, originando la secuencia Gly-Arg-Arg, que es dividida en vesículas sinápticas por una carboxipeptidasa E, generando un extremo terminal R-Phe-Gly. La Glicina terminal se convierte en una amida por acción de la PAM (Peptidilglicina α-Amidasa Monooxigenasa), produciendo una extensión c-terminal α amidada (Phe-NH₂), formando entonces la CCK-83, ésta se divide a nivel de varios sitios monobásicos para liberar péptidos pequeños carboxiamidados de CCK, entre los que destacan CCK-58, CCK-39, CCK-33, CCK-22, CCK-12, CCK-8 sulfatada y CCK-4 todos con actividad bioquímica.

3 Receptores

Durante la década pasada han ocurrido los principales avances en el conocimiento de los receptores para la CCK. Hasta la fecha se han identificado, basándose en su caracterización molecular, diferente perfil farmacológico y especificidad para unirse a diferentes ligandos, dos receptores para la CCK, los receptores periféricos/cerebrales o receptores CCK-A (CCK-1) y los receptores cerebrales o receptores CCK-B (CCK-2), perteneciendo ambos a la clase de receptores que se encuentran acoplados a proteínas-G y que se caracterizan por presentar siete dominios transmembranales (Liddle, 1998; Wank, 1998; Noble & Roques, 1999).

Los dos tipos de receptores muestran una unión saturable, reversible, selectiva y de alta afinidad para la CCK y sus análogos, con constantes de disociación reportadas alrededor de 1 nM (Crawley & Corwin, 1994). Farmacológicamente se distinguen en su capacidad para reconocer diferentes formas de la CCK, pues el receptor CCK-B reconoce con una afinidad muy semejante a las formas pequeñas del péptido como son la CCK-4, la CCK-8 no sulfatada (CCK-8ns) y la CCK-8s, así como a la pentagastrina y a la gastrina; mientras que el receptor CCK-A muestra una afinidad más grande para la CCK-8s y una afinidad 100 veces menor para la CCK-8ns y la CCK-4, además reconoce principalmente a las formas grandes del péptido como la CCK-33 y la CCK-58 (Wank, 1998; Noble & Roques, 1999; Noble, et.al. 2000; Rotzinger & Vaccarino, 2003).

3.1 Distribución de los receptores para la CCK

La distribución de los receptores para la CCK ha sido ampliamente investigada, aparentemente los receptores CCK-A y CCK-B coinciden en algunas regiones tanto en el SNC como en la periferia. Sin embargo, la mayoría de los receptores en el SNC son de tipo “B” mientras que los receptores para CCK tipo “A” se encuentran distribuidos principalmente en órganos periféricos (Noble, et.al., 2000). Estudios de autoradiografía y unión de radioligandos demuestran que el receptor CCK-A se localiza en células

pancreáticas, músculo liso de la vesícula biliar, intestino, células jefe y células D de la mucosa gástrica, esfínter pilórico, esfínter de Oddi, estómago y músculo ileal, así como, en algunas regiones del SNC tales como el núcleo interpeduncular, el núcleo del tracto solitario, el núcleo dorsomedial hipotalámico, el núcleo del rafé dorsal, el núcleo accumbens, el cuerpo estriado, el núcleo supraóptico, el núcleo paraventricular, el núcleo motor dorsal del nervio vago, el núcleo caudado, el putamen, la sustancia nigra *pars compacta*, la amígdala central, el área ventral tegmental, el área postrema, los cuerpos mamilares, la médula espinal y el nervio vago (Tabla 1). Este receptor regula efectos digestivos provocados por el péptido, tales como, la contracción vesicular e intestinal, la secreción de enzimas pancreáticas, los efectos tróficos sobre la mucosa intestinal y gástrica, así como, la regulación del consumo de alimentos (Crawley & Corwin, 1994; Fink, et.al., 1998).

El receptor para CCK tipo “B” se localiza principalmente en el SNC en regiones del telencéfalo tales como la capa plexiforme externa del bulbo olfatorio principal, las capas superficiales, medias y profundas de la neocorteza, la corteza piriforme, el núcleo accumbens, el parasubiculum, el tubérculo olfatorio, el hipocampo, el núcleo caudado, el putamen, el giro dentado, el septo, el globo pálido, la banda diagonal de Broca, y el núcleo amigdalóide.

Este receptor también está presente en regiones del diencefalo que comprenden el núcleo hipotalámico medial preóptico, arcuato y dorsomedial, el núcleo reticular talámico mediodorsal y paraventricular y en la zona incerta y lateral del núcleo habenuar. Se ha reportado su presencia en zonas del mesencefalo como la sustancia nigra, el núcleo parabigeminal, el colículo superior e inferior, el núcleo parabranchial, el núcleo del rafé dorsal y la materia gris periacueductal; así como en regiones del mielencefalo que incluyen al núcleo del tracto solitario y al núcleo olivar superior y pontino superior. Con relación a la distribución del receptor para la CCK tipo B en órganos periféricos se ha encontrado en la médula espinal, el nervio vago, el tracto gastrointestinal, en células jefe y

células D de la mucosa gástrica, en neuronas del plexo mientérico, en células del acinar pancreático, en monocitos y en linfocitos T.

Se cree que este receptor interviene en los efectos provocados por la CCK a nivel central como son la modulación en las funciones controladas por los sistemas GABAérgico, dopaminérgico, serotoninérgico y opioide. La regulación de la alimentación, el control del aprendizaje y la memoria y la etiopatogenia de enfermedades psiquiátricas y desordenes neurológicos. Tabla 1, (Moran & Schwartz, 1994; Beinfeld, 1998; Noble & Roques, 1999; Rotzinger & Vaccarino, 2003).

TABLA 1. Distribución y funciones de los subtipos del receptor para la CCK

	CCK A	CCK B
Distribución	Vesícula biliar, páncreas, píloro, intestino, espina dorsal, nervio vago, estómago y mucosa gástrica.	Cerebro, espina dorsal, estómago y nervio vago.
Funciones	Regula la acción de la CCK sobre la contracción de la vesícula, la secreción de amilasa pancreática, el vaciado gástrico, inhibiendo el hambre, potencia los comportamientos mediados por la dopamina, así como su liberación en núcleo accumbens.	Regula la acción de la CCK sobre el incremento en el disparo neuronal y la mayoría de sus acciones en el sistema nervioso central

(tomado de Noble & Roques, 1999)

4 Agonistas y Antagonistas de los receptores para la CCK

4.1 Agonistas

A través del tiempo se han seguido diferentes estrategias para diseñar agonistas potentes y selectivos de los receptores para la CCK, lo cual ha permitido innumerables avances en el estudio de la farmacología y fisiología de la CCK (Tabla 2). Sin embargo, solo existen pocos compuestos que han sido reportados como agonistas selectivos para el receptor CCK-A; siendo la mayoría de ellos tetrapéptidos, hexapéptidos y derivados de benzodiacepinas.

TABLA 2. Principales agonistas de los receptores para la CCK

CCK-A	CCK-B
CCK-8s	CCK-8ns
ARL-15849	CCK-4
A-71378	CCK-8s
A-70874	BC-264
GW-5823	BC-254
GW-7854	BC-197
	BDNL
	RB-400
	RB-360

(tomado de Noble, et.al., 2000)

Los principales agonistas selectivos para el receptor CCK-A son:

- ◆ CCK-8s
- ◆ A-71378, A-71623 y A-70874 basados en la estructura de CCK-4.
- ◆ ARL-15849, hexapéptido derivado de CCK-8
- ◆ GW-5823 y GW-7854 derivados de benzodiacepinas.

Mientras que para el receptor CCK-B los agonistas específicos son:

- ♦ La CCK-8 sulfatada, la CCK-8 no sulfatada y la CCK-4,
- ♦ BC254, BC197 y péptidos cíclicos,
- ♦ BDNL, BC-264 y BC-197 derivados de la CCK resistentes a peptidasas,
- ♦ RB400 y RB403 derivados de la CCK que se encuentran acoplados a residuos de malonato y succinato (Noble & Roques, 1999).

4.2 Antagonistas

Muchos de los descubrimientos tempranos respecto a los efectos fisiológicos de la CCK fueron impedidos por la carencia de antagonistas selectivos. Actualmente existe una gran variedad de antagonistas de los receptores para la CCK con estructuras químicas variadas, incluyendo péptidos, benzodiazepinas, pirazolidininas y derivados de aminoácidos que tienen excelente selectividad y alta afinidad tanto para el receptor CCK-A como para el receptor CCK-B (Tabla 3) (Woodruff & Hughes, 1991; Noble, et.al., 2000).

TABLA 3. Principales antagonistas de los receptores para la CCK

CCK-A	CCK-B
Lorglumida	L-365,260
Loxiglumida	L-740,093
Devazepide	PD-134,308
SR-27897	PD-135158
Bt ₂ cGMP	PD-134,308
	RP-73870
	SNF8702
	L368,935
	GV150013

(tomado de Noble, et.al., 2000)

De acuerdo con Noble, et.al. (2000), entre los antagonistas de los receptores CCK-A destacan:

- ♦ Derivados de nucleótidos cíclicos como el Bt2cGMP, con alta afinidad para este receptor.
- ♦ Derivados de aminoácidos que poseen la misma afinidad específica al receptor CCK-A que los señalados en la categoría anterior, pero son más potentes y se pueden administrar oralmente, dentro de ésta categoría se encuentran el CR-1409 o lorglumida y el CR-1505 o loxiglumida derivados de ácido glutámico, el TP-680 y el TP-0632 derivados de serina.
- ♦ Derivados de las benzodiazepinas como el L-364,718 (devazepide o MK-329) y el FK-480.
- ♦ Péptidos derivados de la secuencia carboxilo terminal del heptapéptido de la CCK, como el JMV-179, el PD-140,548, el 2-NAP, el IQM-95,333 y por último
- ♦ El SR-27,897 no relacionado a péptidos, benzodiazepinas o derivados de aminoácidos.

Para los receptores CCK-B se han descrito las siguientes clases de antagonistas:

- ♦ Derivados de aminoácidos como el YM-022
- ♦ Derivados de las benzodiazepinas como el L-365,260, L-740,093 y CP-212,454.
- ♦ Derivados de la pirazolidinona, como el LY-288,513 que por sus efectos adversos están descontinuados
- ♦ Derivados de ureidoacetamidas como el RP-73870,
- ♦ Dipeptoides que son derivados estructurales del tetrapéptido de la CCK, altamente selectivos para el receptor CCK-B como el PD-134,308 (CI-988), el PD-135,158, el RB210 y el CI-1015

5 *Distribución*

Actualmente la CCK es reconocida como el neuropéptido más abundante en el SNC y en el tracto gastrointestinal. Diversos estudios han mostrado que la CCK-58 y la CCK-33, se encuentran localizadas predominantemente en órganos periféricos pues se han encontrado altas concentraciones de estos péptidos en la mucosa del duodeno y jejunio en humanos, perros y ratas, así como en células endocrinas, en nervios entéricos, en plasma humano e incluso en el sistema reproductor masculino (Crawley & Corwin, 1994).

En el SNC las principales formas descritas corresponden a la CCK-12, la CCK-8 no sulfatada, la CCK-8s y la CCK-4 (Vanderhaeghen, et.al., 1980; Emsom, et.al., 1982). La distribución de la CCK en el SNC es heterogénea, diversos análisis muestran la localización de altas concentraciones (mayor a 4 ng/mg de proteína) de CCK en neuronas de las capas I, II-III, IV, V-VI de la corteza cerebral (temporal y frontal), el caudo-putamen, el claustrum, el hipocampo, el subiculum, el septo y los núcleos amigdaloides cortical, basolateral, central, medioventral y lateral, mientras que en el tubérculo olfatorio, el bulbo olfatorio, el hipotálamo, la materia gris periacueductal, el núcleo talámico y el mesencéfalo ventral, las concentraciones de CCK son de 1-2 ng/mg de proteína. Concentraciones menores a 1 ng/mg de proteína, se han reportado en el núcleo de Edinger-Westphal, el núcleo accumbens, la sustancia nigra *pars compacta*, el globo pálido, el colículo inferior y superior, el núcleo parabranquial, el cerebelo, el puente, la médula oblonga y en las capas II-III, IX y X de la médula espinal (Larsson & Rehfeld, 1979; Dockray, 1980; Beinfeld, 1981; Emson, et.al., 1982; Raitieri, 1993; Crawley & Corwin, 1994). Estudios inmunohistoquímicos han revelado que la inmunoreactividad a CCK se encuentra en cuerpos celulares y fibras de neuronas no piramidales, mientras que la glía no contiene CCK (van Megen, et.al., 1996). La anatomía de las proyecciones CCKérgicas centrales es muy compleja y ha sido sujeta a investigaciones intensivas desde su descubrimiento.

5.1 Principales proyecciones CCKérgicas

Según Beinfeld (1998) las principales proyecciones CCKérgicas que se han identificado en el cerebro de la rata son:

- *Vía mesolímbica y mesocortical.* Las neuronas CCKérgicas en el área ventral tegmental, algunas de las cuales también contienen dopamina y neurotensina, proyectan a subdivisiones específicas del núcleo accumbens, del tubérculo olfatorio y de la corteza prefrontal. Estudios recientes muestran que las células dopaminérgicas y posiblemente CCKérgicas en el área ventral tegmental inervan neuronas colinérgicas del cerebro anterior, las cuales suministran acetilcolina a la corteza y han sido implicadas en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer.

- *Vía nigro-estriatal.* Esta vía comprende las proyecciones que parten de la sustancia nigra al estriado y a la amígdala, donde la CCK se colocaliza con dopamina.

- *Vía cortico-estriatal.* En esta vía se incluyen a las proyecciones que van de la corteza prefrontal al estriado, en las cuales la CCK se colocaliza con GABA.

- *Vía tálamo-cortical y tálamo-estriatal.* Las neuronas CCKérgicas del núcleo ventral lateral y el núcleo geniculado medio, proyectan a sitios de la corteza y del estriado. Algunas de estas neuronas también son VIPérgicas (péptido intestinal vasoactivo).

- *Vía visceral sensitiva ascendente.* Las neuronas CCKérgicas se proyectan del núcleo dorsomedial del núcleo del tracto solitario y del borde externo del área postrema hacia el núcleo parabranchial. De este núcleo un grupo adicional también proyecta fibras al núcleo ventromedial del hipotálamo. Otras neuronas CCKérgicas en el núcleo del tracto solitario proyectan hacia el núcleo accumbens. Las neuronas con CCK en el rafé que no contienen serotonina proyectan al cerebro anterior. Por otro lado la CCK es abundante en células de la retina de algunas especies. Finalmente, las células CCKérgicas en la oliva inferior proyectan al colículo inferior.

– *Vía visual auditiva ascendente.* Las neuronas CCKérgicas del colículo superior proyectan al núcleo geniculado dorsolateral, y de ahí proyectan a la corteza visual. Las neuronas del ganglio trigeminal proyectan a la arteria pial e inervan el iris.

– *Vía hipocampo-septal.* Del hipocampo salen gran número de proyecciones CCKérgicas eferentes hacia el septo lateral, a los cuerpos mamilares, al núcleo anteroventral del tálamo y al subiculum.

– *Vía magnocelular/parvocelular hipotalámica-hipofiseal.* Las neuronas CCKérgicas del núcleo paraventricular y supraóptico, algunas de las cuales también contienen oxitocina y factor liberador de corticotropina (CRF), proyectan a la eminencia media y al lóbulo posterior de la glándula pituitaria.

– *Vía del sistema asociacional intrabulbar olfatorio.* La CCK es el transmisor de las células en “racimo” del bulbo olfatorio, el cual proyecta a la capa plexiforme interna del bulbo ipsilateral.

– *Vía de las proyecciones descendentes a la médula espinal.* Las neuronas CCKérgicas de la materia gris periacueductal, del núcleo de Edinger-Westphal y de la médula ventral proyectan a células de la capa II, III y X de la médula espinal, a neuronas motoras localizadas en la capa IX de la médula espinal cervical, torácica y lumbo-sacral, así como al núcleo motor trigeminal e hipoglosal.

6 Acciones biológicas de la CCK

Durante los últimos 25 años la farmacología y fisiología de la CCK ha sido estudiada en detalle. Como resultado de estos estudios en la periferia se le ha establecido como una hormona gastrointestinal que regula la contracción vesicular e intestinal y la secreción de enzimas pancreáticas. De la misma forma, tiene efectos tróficos sobre la mucosa intestinal y gástrica, y participa en la regulación del consumo de alimentos.

Dentro del SNC la CCK cumple con los criterios establecidos para ser considerada un neurotransmisor:

1. Se localiza en el cerebro exclusivamente en neuronas (Crawley, 1991).
2. Es sintetizada, procesada y almacenada dentro de vesículas en terminales nerviosas y cuerpos celulares (Goltermann, et.al., 1980).
3. Es liberada en forma Ca^{++} dependiente por la estimulación eléctrica y la despolarización con concentraciones elevadas de K^+ o con veratridina. (Verhage, et.al.,1991; Raiteri, et.al., 1993; Fink, et.al., 1998; You, et.al. 1998).
4. Influencia la velocidad de respuesta de otras neuronas del SNC (Beinfeld, 1995; van Megen, et.al., 1996)
5. Tiene agonistas y antagonistas específicos para sus receptores (Woodruff & Hughes, 1991; Noble & Roques, 1999).
6. Es rápidamente degradada después de su liberación (Rose, et.al.,1996; Ganellin, et.al.,2000).

Sin embargo, la determinación de su papel preciso en el SNC no ha sido claramente definido. La CCK está implicada fundamentalmente en la regulación de muchos procesos no solo fisiológicos sino también patológicos. A continuación se revisará el papel de la CCK en algunos de ellos.

6.1 Saciedad

El control del apetito involucra mecanismos complejos que incluyen señales provenientes del tracto gastrointestinal, la liberación de hormonas durante la digestión de los alimentos y la detección de los productos de la digestión. El tracto gastrointestinal posee mecano y quimiorreceptores especializados, los cuales monitorean la actividad fisiológica y envían información al cerebro principalmente por vía vagal. La información aferente constituye una clase de señales de saciedad que forman parte del proceso de control del apetito (Strader & Woods, 2005).

La saciedad es un proceso que inicia desde el principio de una comida y acaba cuando el sujeto cesa de comer (Geary, 2001). El efecto de la CCK sobre este proceso fue reportado por primera vez en 1973 y aún no se ha determinado el mecanismo preciso por medio del cual la CCK induce saciedad.

Algunos estudios realizados sobre la acción de la CCK en el proceso de saciedad han reportado que la CCK-8s se localiza dentro del hipotálamo, el cual funciona como un centro integrativo de regulación de la alimentación, y que cuando es aplicada exógenamente en el hipotálamo ventromedial suprime la ingestión de alimentos y aumenta la actividad de enzimas lipolíticas. Por otro lado el péptido endógeno puede ser liberado del mismo lugar cerebral, por un estímulo fisiológico asociado con la saciedad; se considera que ésta liberación endógena de la CCK contribuye a la inhibición de la alimentación durante la ingesta de los alimentos (Moran & Kinzig, 2004; Volkoff, et.al., 2005).

Se ha encontrado que la CCK ejerce una inhibición sobre la ingestión de alimentos dependiente de la dosis, reduciendo el tamaño de la comida, sin afectar la ingestión de agua y que su potencia para reducir la saciedad disminuye en situaciones como después de una privación muy larga de alimentos, durante el embarazo y la lactancia (Moran & Schwartz, 1994). Se ha observado que sus efectos son bloqueados con el uso de antagonistas para el receptor CCK-A y no con antagonistas para el receptor CCK-B (Crawley & Corwin, 1994) y que el efecto de la CCK sobre la saciedad está relacionado

con la acción de otros neurotransmisores como la serotonina, la dopamina e incluso con algunos otros mensajeros como el factor liberador de corticotropina y el estradiol (Voigt, et. al., 1998; Fink, et.al., 1998; Geary, 2001).

Hasta la fecha la hipótesis más aceptada por los investigadores es que el modo de acción de la CCK-8s en la saciedad es local (neurocrino o paracrino) y que actúa inicialmente sobre receptores CCK-A localizados dentro del abdomen. Dicha acción es mediada por fibras aferentes del nervio vago que penetran en el núcleo del tracto solitario. No es sorprendente entonces que el efecto de la CCK-8s dependa de la integridad del núcleo del tracto solitario y de sus conexiones neurales con el hipotálamo. En su acción son importantes factores tales como la edad, el género y el estado nutricional, (Moran, 2004; Beglinger & Degen, 2004; Strader & Woods, 2005).

6.2 *Analgesia.*

El dolor es la percepción de una sensación aversiva o no placentera que se origina en una región específica del cuerpo y es influenciada por las emociones y el ambiente. La recepción de estas señales se denomina nocicepción y se realiza por la activación de receptores sensoriales especializados (nociceptores) que proporcionan información acerca del daño tisular. El proceso de analgesia se refiere a la supresión de sensaciones dolorosas y es regulado por la acción de los péptidos opioides en el SNC (Jessell & Kelly, 1991).

La participación de la CCK en éste proceso se basa principalmente en la evidencia de que algunas acciones biológicas de la CCK-8s son opuestas a las producidas por los péptidos opioides, sugiriendo que la CCK funciona como un antagonista opioide fisiológico y debido a que numerosos estudios anatómicos reportan que, tanto la CCK-8s y sus receptores están distribuidos de manera paralela con los opioides endógenos y sus receptores, en regiones donde se lleva a cabo el proceso de analgesia, tanto en el cerebro como en la médula espinal (Faris, et. al. 1982).

El mecanismo específico por el cual la CCK está involucrada en el proceso de analgesia regulada por opioides ha sido extensamente investigado. No obstante, aún no ha sido totalmente explicado. Hasta el momento, se ha establecido que la CCK disminuye la analgesia inducida por la administración de opioides, ya que antagoniza la analgesia producida por la morfina y las β -endorfinas, cuando es administrada en la médula espinal; y que no presenta ningún efecto en la analgesia no producida por opioides (Ossipov, et.al., 2004).

Se ha sugerido también que el efecto de la CCK el proceso de analgesia es mediado a través de los receptores CCK-B. Sin embargo, aún no se descarta la participación de los receptores CCK-A en éste proceso, ya que la administración de agonistas de la CCK indica que las acciones de éste péptido en la analgesia son mediadas a través de los receptores CCK-A. No obstante, el uso de antagonistas sugiere que dichas acciones son mediadas por receptores CCK-B (Moran & Schwartz, 1994; Crawley & Corwin, 1994).

También se ha señalado que los antagonistas al receptor de la CCK potencian el efecto de antinocicepción de los opioides endógenos y se ha observado que la CCK no actúa como un antagonista “clásico” que se une al receptor opioide para inhibir su acción, sino que sus efectos se dan por una interacción receptor-receptor entre la CCK y los péptidos opioides (Wiertelack, et.al., 1992).

Respecto a la capacidad de los antagonistas del receptor CCK-B para potenciar el efecto analgésico inducido por la morfina y por los opioides endógenos, es importante mencionar que dichos compuestos son capaces de prevenir el desarrollo de tolerancia a la morfina, por lo que se ha sugerido su uso terapéutico potencial en el tratamiento del dolor crónico (de Araujo Lucas, et.al., 1998; Becker, et.al., 1999b; McCleane, 2004).

6.3 *Memoria*

La CCK está presente en regiones del SNC (estructuras límbicas y áreas corticales), relacionadas o implicadas en el control de los procesos cognoscitivos y de los comportamientos emocionales y motivacionales.

Los procesos de aprendizaje y memoria, además de producir modificaciones en la estructura neuronal y las sinapsis, originan cambios en los niveles moleculares y metabólicos por la alteración de la síntesis y liberación de neurotransmisores y neuropéptidos. Mientras que en la literatura existe un consenso de que la neurotransmisión colinérgica tiene un importante papel en los procesos relacionados con el aprendizaje y la memoria, también está bien establecido que esas funciones están influenciadas por un gran número de moléculas no peptídicas y neuropéptidos entre los que destacan la serotonina, el factor liberador de corticotropina y la CCK (Gulpinar & Yegen, 2004)

De acuerdo a los resultados obtenidos en experimentos realizados con roedores, la CCK aparenta estar relacionada con dichos procesos, ya que se ha observado que su administración exógena o su liberación endógena mejora la memoria en ratones, además de que su administración o la de sus análogos tienden a aumentar la retención de la memoria.

Los mecanismos específicos por los cuales la CCK participa en los procesos de aprendizaje y memoria no resultan ser aún claros. Hasta el momento los resultados obtenidos utilizando varios paradigmas indican que la estimulación del receptor CCK-A con la CCK-8s inyectada periféricamente aumenta o facilita el proceso de memoria y que éste efecto es anulado al cortar el nervio vago, o bien, bloqueando al receptor CCK-A por administración periférica o central de sus antagonistas, los cuales además de evitar éste efecto, son capaces de producir amnesia por sí solos; mientras que la estimulación del receptor CCK-B tiene efectos opuestos ya que la administración central de sus agonistas, como la CCK-4 o el BC-264, produce amnesia y deficiencia en la memoria. El bloqueo de éste receptor anula dichos efectos y sus antagonistas incrementan la memoria, por lo que se

ha sugerido que la activación de los receptores CCK-A mejora el aprendizaje y la memoria, en tanto que la estimulación de los receptores CCK-B los disminuye. Dichos efectos parecen ser mediados por vías neuronales distintas, pues el efecto inducido por la estimulación de los receptores CCK-A, involucra a la transmisión vagal (de la periferia al cerebro). Contrariamente, el efecto producido por la estimulación de los receptores CCK-B es central e involucra al menos al sistema hipocampal (Hadjiivanova, et.al., 2003).

Se ha sugerido también la existencia de una liberación tónica de la CCK en ciertas estructuras cerebrales involucradas en procesos de atención y memoria. Así, se ha encontrado que tras la estimulación del receptor CCK-B, con el agonista BC-264 mejora la memoria espacial y los procesos de consolidación sin observarse efectos sobre la adquisición. Por otro lado su inyección incrementa los niveles extracelulares de DA, dihidroxifenilalanina (DOPA) y ácido homovalínico (HVA) en la parte anterior del núcleo accumbens, sugiriendo la participación de los receptores para la DA en los procesos de memoria. Así, la activación de la transmisión dopaminérgica en el núcleo accumbens, podría ser el mecanismo por el cual el agonista BC-264 produce su efecto amnésico sobre el proceso de memoria (Noble & Roques, 1999; Fink, et.al. 1998; Crawley & Corwin, 1994).

Por otra parte, es interesante que el agonista BC-197 induzca un efecto amnésico, pero también uno ansiogénico, por lo que su efecto en el proceso de memoria podría ser relacionado con un efecto secundario de la ansiedad más que en una verdadera interrupción de la memoria (Wall & Messier, 2000).

Los resultados señalados proveen evidencia adicional que muestra la heterogeneidad de los receptores CCK-B y ejemplifican que la estimulación del receptor CCK-B en ratas, dependiendo del agonista usado, puede mediar distintas respuestas de comportamiento.

De la misma forma, un creciente cuerpo de evidencias han implicado a la CCK en la etiopatogenia de enfermedades psiquiátricas como:

6.4 *Enfermedad de Alzheimer*

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo asociado con la edad, caracterizado principalmente por la incapacidad para almacenar nuevas memorias y por la pérdida de la memoria ya almacenada. La enfermedad está asociada con degeneración neuronal en el hipocampo, por la generación de placas amiloides en muchas áreas de la materia gris y por una deficiencia profunda en la neurotransmisión colinérgica (Goldman & Côté, 1991).

La relación entre la CCK y la enfermedad de Alzheimer ha sido sugerida con base en la interacción que tiene éste neuropéptido con los factores característicos de ésta enfermedad pues como ya se ha mencionado la CCK tiene un papel modulador importante en el proceso de la memoria.

Varios grupos de investigadores han estudiado como la concentración de la CCK se ve modificada en la enfermedad de Alzheimer. La impresión general es que el contenido de la CCK permanece sin cambios excepto en casos muy severos donde puede estar disminuido. Sin embargo, ya que los péptidos más pequeños de la CCK son relativamente selectivos para el receptor CCK-B en comparación con las formas grandes, una alteración en el balance entre los diferentes péptidos podría ser importante.

Se ha sugerido a éste respecto que una interacción entre el glutamato y la neurotransmisión CCKérgica podría ser importante. Así, se ha demostrado que la estimulación de los receptores para la CCK con CCK-8s o sus análogos puede proteger a las neuronas corticales contra el efecto tóxico del glutamato y que este efecto es bloqueado con antagonistas selectivos para el receptor CCK-B. Más aún, la CCK puede ser un antagonista fisiológico del glutamato, ya que la CCK-8s reduce la despolarización producida por glutamato a través de la activación de los receptores CCK-B, lo que indica que una reducción en el nivel de la CCK puede estar involucrada en el proceso neurodegenerativo característico de esta enfermedad. No obstante los avances obtenidos sobre el posible papel de la CCK en la enfermedad de Alzheimer es necesario realizar más

investigaciones para establecer claramente la función específica de la CCK en ésta enfermedad (Löfberg, et. al., 1996).

6.5 Esquizofrenia.

La esquizofrenia es una enfermedad asociada con una hiperactividad del sistema dopaminérgico mesolímbico, que normalmente está involucrado en los fenómenos de autoestimulación y motivación, por lo que su estimulación puede producir alucinaciones e ilusiones. En las personas saludables la transmisión dopaminérgica entre las neuronas es regulada cuidadosamente, mientras que en las personas con esquizofrenia, ésta se sale de control desestabilizando la comunicación normal entre las células neurales. Actualmente ésta es la hipótesis etiológica más aceptada para explicar ésta enfermedad.

En relación con esto, la participación de la CCK en la etiopatogenia de la esquizofrenia se origina a partir de la evidencia existente de su colocalización con dopamina, pues se ha demostrado que la CCK y sus receptores están presentes en una gran población de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y del área ventral tegmental, y a pesar de que las interacciones entre la CCK y la dopamina son complejas, existe evidencia suficiente que afirma que la CCK funciona como un modulador de los comportamientos en los que interviene la dopamina. Ya que la hiperactividad dopaminérgica tiene un papel importante en la esquizofrenia, entonces la CCK también lo tiene (Rasmussen, 1994).

En 1995, Virgo y colaboradores encontraron que en pacientes esquizofrénicos existe una disminución de la actividad CCKérgica en la corteza frontal y temporal. Aunado a lo anterior, Schalling, et.al. 1990, citado por Crawley & Corwin, 1994, reporta que la expresión del ARNm de la CCK en células dopaminérgicas del cerebro medio de pacientes esquizofrénicos está aumentada en comparación con pacientes normales. Estas dos situaciones podrían ser una característica de la esquizofrenia y podrían ser relevantes para la etiología o la sintomatología de la enfermedad.

Ya que las acciones de la CCK sobre el sistema dopaminérgico son tanto excitatorias como inhibitorias y son reguladas por los receptores CCK-A y CCK-B respectivamente, existe un gran campo de investigación para esclarecer la participación precisa de la CCK en la etiopatogenia de la esquizofrenia, así como del posible uso potencial de antagonistas a sus receptores como drogas antipsicóticas (Gracey, et.al. 2002).

A pesar de que durante la década pasada se ha implicado a la CCK y a otros neuropéptidos en la patofisiología de la esquizofrenia, son pocos los intentos, que se encuentran reportados en la literatura, para explorar el significado real de estos, así como su potencial terapéutico, (De Wied & Sigling, 2002).

6.6 *Ansiedad.*

La ansiedad desde un punto de vista biológico es una manifestación autonómica, somática y cognoscitiva de un sistema de alarma que en forma adaptativa prepara a un individuo a contener un peligro potencial. Sus componentes somáticos y autonómicos ponen al individuo en condiciones de luchar o de huir. Sus componentes cognoscitivos lo hacen vigilante y consciente de la existencia de peligros potenciales en su entorno tal como pudieran ocurrir en una situación novedosa, o en una situación que entraña castigo o falta de recompensa. Bajo condiciones normales los síntomas de la ansiedad son imperceptibles, pero cuando es intensa, el individuo experimenta una sensación de inquietud y aprehensión que se acompaña de un aumento de la vigilancia del entorno, de dificultad para concentrarse, de un aumento en la tensión muscular y de numerosos síntomas autonómicos entre los que destacan las palpitaciones, la sudoración, la falta de aliento o la presencia de molestias digestivas. En casos extremos, a los síntomas anteriores se añade una sensación de irrealidad y de estar separado de uno mismo, así como de un marcado temor a volverse loco, a desmayarse o incluso a morir. La ansiedad se regula mediante complejos mecanismos que operan dentro del SNC. Cuando estos mecanismos se afectan, la ansiedad se torna excesiva o surge como consecuencia de

estímulos que no representan ningún peligro potencial, o bien, se presenta como síntoma de algunas enfermedades (Pérez de la Mora, 2003).

De los mecanismos que regulan la ansiedad se conoce poco, sin embargo los estudios realizados han mostrado, en primera instancia, que no existe una región única encargada de la integración de la ansiedad, sino que existen numerosos centros nerviosos que participan en su producción y modulación.

Algunas investigaciones señalan que varias regiones cerebrales correspondientes en su mayor parte al sistema límbico, tales como la amígdala, el septo lateral, la corteza cerebral, el hipocampo, el hipotálamo, el núcleo del rafé dorsal, entre otras, regulan en forma coordinada a las distintas manifestaciones de la ansiedad, en estas zonas el GABA, la serotonina, la CCK y la noradrenalina han sido identificadas como neurotransmisores importantes en la ansiedad, promoviendo algunas de ellas acciones ansiogénicas y otras ansiolíticas (van Megen, 1996).

Estudios realizados en este laboratorio han permitido sugerir la existencia en el animal íntegro de importantes interacciones entre las neuronas que liberan GABA (ansiolíticas) y las que liberan CCK (ansiogénicas) para regular éste proceso (Pérez de la Mora, et. al., 1993) .

Específicamente respecto a la CCK se ha demostrado que sus formas pequeñas entre las que se encuentran la CCK-4, la CCK-8s, así como la pentagastrina son capaces de desencadenar ataques de ansiedad y pánico tanto en humanos como en la rata (Bradwejn & Koszycki, 1994). Experimentalmente la administración de estas formas de CCK ha resultado en manifestaciones claras de ansiedad en varios modelos animales. La CCK-4 induce ansiedad, aprehensión, tensión y miedo, además de los síntomas somáticos y cognoscitivos característicos de un ataque de pánico. La naturaleza fenomenológica de los ataques provocados es relativamente estable, excepto por cambios en la duración e intensidad de los síntomas, tales ataques son muy similares o casi idénticos a los ataques no inducidos por droga alguna (Daugé & Léna, 1998; Hebb, et.al., 2003).

No obstante los avances obtenidos de la relación de las distintas formas de la CCK con la ansiedad, aún no es totalmente claro el tipo de receptor para la CCK que está involucrado en sus propiedades ansiogénicas, ya que aunque los antagonistas como el L-365,260, específicos para el receptor CCK-B provocan un antagonismo significativo del efecto ansiogénico de éste péptido, también se han publicado evidencias de que el receptor CCK-A pudiera estar involucrado en el fenómeno pues éstos receptores existen en algunas de las regiones centrales que están involucradas en la ansiedad. Igualmente se han reportado efectos ansiolíticos de antagonistas específicos para el receptor CCK-A (Revel et. al., 1998). Aunado a esto se han encontrado evidencias de que éste mismo receptor pudiera estar mediando la liberación de dopamina inducida por diferentes tipos de estresores en el núcleo accumbens o en la corteza prefrontal (Rotzinger & Vaccarino, 2003; Wang, et.al., 2005). Sin embargo, es importante señalar a este respecto que estudios realizados en este laboratorio indican que si el receptor CCK-A pudiera estar involucrado en la ansiedad no lo está en el aspecto cognoscitivo de la enfermedad, sino en el control autonómico de sus síntomas (Hernández-Gómez, et.al. 2002).

7 *Interacción de la CCK con otros neurotransmisores*

Se ha encontrado evidencia de que la CCK coincide con otros péptidos o con diversos neurotransmisores “clásicos” en algunas regiones del SNC (Tabla 4) y que presentan en ellas interacción mutua.

TABLA 4. Principales neurotransmisores colocalizados con la CCK

Co-transmisor	Región Cerebral
DOPAMINA	Sustancia nigra, Núcleo accumbens y Área ventral tegmental
VIP/GABA	Corteza e Hipocampo
NPY/GABA	Corteza e Hipocampo
VIP	Tálamo
5-HT	Médula
ACETILCOLINA	Espina dorsal
SUSTANCIA P	Médula y Espina dorsal
OXYTOCINA	Hipotálamo
CRF	Hipotálamo
ENCEFÁLINAS	Corteza y Tálamo
CGRP	Espina dorsal
OPIOIDES	Hipotálamo, Ganglio basal y

(tomada de Beinfeld, 1998)

7.1 *Dopamina*

Se ha demostrado que la CCK y la dopamina (DA) se encuentran en muchas neuronas dentro del SNC y también que se colocalizan en neuronas provenientes de cuerpos celulares de las vías dopaminérgicas mesolímbica y nigroestriatal en una gran variedad de especies incluyendo a los primates. Esas neuronas proyectan como ya se señaló antes del área ventral tegmental, al núcleo accumbens, al septo medio y al tubérculo olfatorio y de la sustancia nigra al núcleo caudado. (Moran & Schwartz, 1994).

Respecto a la interacción entre la CCK y la DA se ha reportado que la CCK es un antagonista endógeno de la DA. En la sustancia nigra y en el área ventral tegmental la CCK por si sola actúa como un excitador, pero también potencia la acción inhibitoria de la DA. En el núcleo accumbens, la CCK antagoniza las acciones inhibitorias de la DA. La CCK altera la unión de la DA a su receptor D₂ y antagoniza su efecto electrofisiológico y conductual. Las interacciones en el núcleo accumbens entre la CCK y la DA son diferentes si se comparan sus efectos en el núcleo lateral y anterior con los observados en el núcleo accumbens posterior y medio. Así, la CCK incrementa la liberación de DA del núcleo accumbens posterior y del área ventral tegmental a través de la activación de los receptores CCK-A, mientras que en el núcleo accumbens anterior inhibe la liberación de DA activando a los receptores CCK-B (Beinfeld, 1998; Tanganelli, 2001).

7.2 *Ácido γ -amino butírico*

Se ha demostrado que la CCK-8 se localiza en algunas regiones cerebrales que poseen altas densidades de neuronas GABAérgicas. La CCK-8s coexiste con el ácido γ -amino butírico (GABA) en la corteza cerebral y en la formación hipocampal de la rata, el gato y el mono. Las interacciones existentes entre las neuronas CCKérgicas y las neuronas GABAérgicas en varias regiones cerebrales han sido caracterizadas.

Experimentos realizados en nuestro laboratorio indican que la CCK-8s incrementa la liberación de GABA estimulada eléctricamente y por altas concentraciones

de K^+ en rebanadas de corteza cerebral de rata a través de la activación de sus receptores CCK-B (Pérez de la Mora, et.al., 1993; Ferraro, et.al.1999). Efectos similares se han reportado recientemente, al medir el eflujo de GABA *in vivo*, provocado por la CCK-4 en corteza cerebral de rata (Siniscalchi, et.al., 2003). Un estudio realizado en los principales estratos del hipocampo de la rata ha demostrado que la CCK incrementa la liberación del GABA contenido en interneuronas en más del 60%, actuando directamente sobre la neurona, inhibiendo la conductancia de reposo al K^+ (Miller, et.al., 1997).

En el núcleo accumbens se han descubierto evidencias interesantes que indican que la acción de la CCK-8 sobre la liberación de GABA está relacionada con otros sistemas de neurotransmisores. Así, Ferraro y colaboradores en 1996, encontraron que existe una regulación diferencial de la liberación de GABA provocada por CCK, ya que hay una fuerte influencia excitatoria de la CCK-8 actuando a través de sus receptores CCK-B relacionada con la activación de receptores D_2 para la DA y una regulación inhibitoria mediada por CCK-A, vía la activación de receptores colinérgicos (muscarínicos) locales. Aunado a lo anterior Lanza & Makovec (2000), proponen un modelo de acción de la CCK que involucra a sus receptores CCK-B localizados en neuronas glutamatérgicas, responsables de la liberación de glutamato, el cual, actuando sobre los receptores AMPA/kainato localizados en terminales GABAérgicas presinápticas o bien, sobre receptores NMDA localizados en interneuronas excitatorias desconocidas, generará un incremento en la liberación de GABA.

También se ha encontrado que el GABA inhibe la liberación de la CCK en sinaptosomas de corteza humana, así como en rebanadas de neocórtex y médula espinal de ratas, a través de receptores $GABA_B$ (Gemignani, et.al. 1994). Por otra parte, se ha demostrado que las benzodiazepinas administradas por vía intravenosa antagonizan la excitación provocada por la CCK-8 en neuronas hipocámpales de una manera específica y selectiva y que el baclofén (agonista selectivo al receptor $GABA_B$) disminuye la liberación de CCK-8 en la corteza cerebral (Beinfeld, 1998).

Tomando en cuenta el marco de referencia anterior, es muy probable entonces que exista una interacción negativa entre los sistemas CCKérgico y GABAérgico y que dicha interacción juegue un papel importante en el control de la ansiedad, pues la transmisión GABAérgica posee efectos ansiolíticos en tanto que la CCKérgica los tiene ansiogénicos. Ante esta relación resalta la importancia de establecer los mecanismos neuroquímicos a través de los cuales la CCK influencia el sistema GABAérgico.

7.3 *Serotonina*

La CCK se colocaliza con la serotonina (5-HT) en neuronas de las capas II y III de la neocorteza, en capas profundas de la corteza motora, prelímbica y visual, en regiones olfatorias, en las capas CA1 y CA3 de la formación hipocampal, en interneuronas del borde de la capa celular granular del giro dentado, en el complejo amigdaloides y en la médula espinal (Bloom & Morales, 1998). Se ha encontrado además evidencia farmacológica y neuroquímica de interacciones entre la CCK-8s y la 5-HT tanto en el control de la saciedad como de la ansiedad; ya que se ha demostrado que la anorexia inducida por la CCK-8s es dependiente de 5-HT. Asimismo, se ha descrito que la CCK facilita la liberación de 5-HT en el hipotálamo de rata (Voigt, et.al., 1998).

Respecto a la interacción de la CCK y la 5-HT en el proceso de ansiedad se ha visto que ambas neurotransmisiones tienen características ansiogénicas, ya que la 5-HT potencia la liberación de la CCK a través de sus receptores 5-HT₃ (To & Bagdy, 1999) y el incremento extracelular de 5-HT tiene efectos ansiogénicos. Por otro lado la administración de CCK-8s y CCK-4 aumenta la liberación de 5-HT. Para explicar la interacción entre la CCK y la 5-HT se ha sugerido un modelo de sistemas paralelos interdependientes que tienen que ser activados para llevar a cabo los efectos apropiados (Rex, et.al., 1998).

Recientemente se ha reportado que agonistas al receptor 5-HT_{1A} para 5-HT tienen efectos ansiolíticos en animales y humanos y se ha sugerido que estos receptores podrían mediar sus efectos a través de la liberación de la CCK (Becker et.al. 1999a). En

vista de lo anterior se puede afirmar que es necesario realizar más investigaciones que permitan esclarecer los mecanismos por los cuales la CCK y la 5-HT se relacionan.

7.4 *Aminoácidos excitatorios*

La CCK puede actuar sobre varios sistemas locales o con proyecciones que contengan aminoácidos y/o neuropéptidos como mensajeros neuronales (You, et.al.,1997). Se ha demostrado que la CCK-8s modula la liberación de aminoácidos excitatorios (EAAs), como la dinorfina B, el aspartato y el glutamato vía sus receptores CCK-B en el neocórtex y la corteza, mientras que en la sustancia nigra su efecto se realiza tanto por sus receptores CCK-A como por los CCK-B (Ge, et.al., 1998; You, et.al.,1996; Breukel, et.al.,1997;)

7.5 *Péptidos opioides.*

La interacción de la CCK con los péptidos opioides fue reportada por primera vez en 1982, a partir de esa fecha se ha encontrado que ambos neurotransmisores tienen una distribución paralela en el SNC, con altos niveles en el hipotálamo, los ganglios basales, el tálamo y la médula espinal. Se ha demostrado también que la CCK y las encéfalinas se colocalizan en neuronas individuales en una gran variedad de áreas cerebrales, y que la distribución de receptores para la CCK y los opioides en el cerebro y la médula espinal es muy similar (Moran & Schwartz, 1994). Evidencias recientes indican, como ya se señaló, que la CCK y los opioides tienen papeles opuestos en la modulación de un gran número de procesos, tales como, la ingestión de alimentos, las funciones respiratorias, el tono cardiovascular, la termorregulación, la movilidad intestinal y la locomoción. Asimismo, se ha reportado que la CCK tiene una función muy importante en la modulación de la analgesia regulada por opioides (Noble & Roques, 1999).

Básicamente se ha reportado que la CCK atenúa la analgesia inducida por la administración de opioides. Además se ha observado también que los antagonistas al receptor de la CCK potencian el efecto de antinocicepción de los opioides endógenos. Estas

acciones parecen ser mediadas por una interacción receptor-receptor entre la CCK y los opioides, en la cual se ha sugerido que participan los receptores δ y μ opioides así como los receptores CCK-B. Respecto a los mecanismos farmacológicos de cómo la CCK reduce el efecto opioide, se ha observado que la CCK no se comporta como un antagonista clásico uniéndose al receptor opioide, sino que se une a su receptor reduciendo la afinidad de unión de los ligandos al receptor μ opioide, lo que implica una interacción receptor-receptor que puede ocurrir a diferentes niveles. Fisiológicamente la manera en que los opioides pueden modular la actividad del sistema CCKérgico, aún no se ha establecido. (Wiesenfeld-Hallin, et.al., 1999 Mollereau, et.al., 2005).

8 *Justificación y Antecedentes*

En base a lo estudiado en los capítulos anteriores y considerando la naturaleza ubicua de la CCK en el SNC es posible indicar que dicho péptido tiene un papel significativo en múltiples funciones cerebrales. Sin embargo, los mecanismos por los cuales actúa son complejos y hasta ahora ha sido difícil delinear sus efectos en términos neuroanatómicos, neurofisiológicos y conductuales precisos, por lo tanto, puede entenderse que hoy en día su significado funcional en el SNC sea en muchas instancias aún oscuro y es por ello que se requiere continuar con los esfuerzos en cuanto a su conocimiento.

Considerando la edad evolutiva de la CCK, su potencia biológica y su amplia expresión en el SNC, es una paradoja que nuestro conocimiento acerca de sus funciones normales y patológicas permanezca tan limitado, ya que conocemos solo un poco de su papel tanto en procesos fisiológicos normales como en muchas enfermedades neuropsiquiátricas. Muchos factores contribuyen para explicar esta paradoja, siendo uno de los más importantes el que se refiere en gran parte, a las dificultades técnicas y químicas inherentes para su adecuada cuantificación, especialmente en algunos tejidos y en líquido cerebroespinal.

El radioinmunoensayo (RIA) es una técnica que permite medir cuantitativamente la distribución de péptidos, con alto grado de precisión, sensibilidad y especificidad (Knoche, 1991). Para desarrollar un RIA con estas características es necesario que se utilice un anticuerpo con alto título, alta afinidad y especificidad para el péptido que se desee cuantificar, siendo éste el punto crítico para la realización del RIA (Liddle, 1998).

Durante los últimos 25 años se han llevado a cabo numerosos RIAs y bioensayos para la cuantificación de la CCK y aunque muchos no han tenido la validez suficiente, algunos investigadores como Rehfeld (1973) Vanderhaeghen, et.al. (1980), Beinfeld, et.al. (1981), Cantor & Rehfeld (1985), Maidment, et.al. (1991 y 1997), You, et.al. (1997), Merani, et.al. (1997) y Rehfeld (1998) entre otros, los han desarrollado exitosamente. No obstante, la mayor parte de estos RIAs usan anticuerpos provenientes

del laboratorio de Rehfeld o bien son adquiridos comercialmente, haciendo que la determinación de la CCK en muestras biológicas se torne azarosa o muy costosa, pues queda sujeta a la buena voluntad de los donantes o a lo abultado de los fondos del laboratorio que la practica.

La insuficiencia de resultados cuantitativos confiables ha incrementado nuestra ignorancia acerca del papel funcional de la CCK, por lo que resulta necesario continuar los esfuerzos para desarrollar ensayos sensibles y específicos que permitan su cuantificación adecuada. El objeto del presente trabajo es la obtención de anticuerpos útiles en contra de las formas pequeñas de la CCK, en un intento para establecer un RIA específico para este péptido y así poder estudiar con precisión posibles cambios en su concentración bajo diferentes condiciones experimentales.

9 Hipótesis

Tomando en cuenta la producción exitosa de anticuerpos contra la CCK y su uso en radioinmunoensayos que se ha desarrollado en otros laboratorios es posible producir un anticuerpo específico para la CCK que pueda ser usado bajo diversas condiciones experimentales para la medición de cambios de concentración de los péptidos de bajo peso molecular de la CCK en material biológico por medio de un radioinmunoensayo (RIA), desarrollado en este laboratorio.

10 Objetivos

Los objetivos que se han planteado para realizar este trabajo son los siguientes:

10.1 Objetivo General

- Diseñar un radioinmunoensayo (RIA) específico para medir las formas pequeñas de la CCK en tejido cerebral y líquido cefalorraquídeo de rata.

10.2 Objetivos Particulares

- Obtener anticuerpos en contra de las formas de bajo peso molecular de la CCK.
- Evaluar el título de los anticuerpos obtenidos.
- Determinar la constante de afinidad y la especificidad de los anticuerpos obtenidos.
- Montar un radioinmunoensayo para cuantificar las formas de bajo peso molecular de la CCK en tejido cerebral y líquido cefalorraquídeo de rata.

11 Metodología

Para poder cumplir con los objetivos establecidos en este trabajo, se eligieron los siguientes materiales y métodos

11.1 Materiales

CCK-4 (PM 633.2), tiroglobulina bovina (PM 670), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (PM 191.7), CCK-8 sulfatada (PM 1143.3), gastrina “grande” I humana (PM 3849.2), péptido intestinal vasoactivo (PM 3325.8), gastrina I humana (PM 2098.2), secretina (PM 3039.4), caeruleína (PM 1352.4), albúmina sérica bovina, bacitracina, azida de sodio, proteína A cruda de membranas de *Estafilococo aureus*, proteína A acoplada a Sefarosa CL-4B, carbón revestido con dextrán, que fueron adquiridos de SIGMA-Aldrich. La CCK-33 humana (PM 3945.5) fue comprada al Institute Peptide. El barbital sódico fue obtenido de Merck y la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s con actividad específica original de 2200 Ci/mmol se obtuvo de New England Nuclear (NEN) Research Products.

11.2 Preparación del Antígeno

El antígeno se preparó acoplando la CCK-4 a tiroglobulina bovina (Tg) utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (CDI), en una relación de 212:1:359 para CCK-4:Tg:CDI (Skowsky & Fisher; 1972; Merani, et.al., 1997).

11.3 Técnica de Acoplamiento

El acoplamiento de la CCK-4 con la tiroglobulina se realizó según lo descrito por Skowsky & Fisher (1972). En breve, 15.79 μmol de la CCK-4 se disolvieron en 1.5 ml de agua desionizada, pH 7.0 - 7.4, junto con 74.73 μmol de Tg bovina, a ésta solución se agregó, gota a gota y con agitación, 26.6 μmol de CDI disuelta en 1.5 ml de agua desionizada. La mezcla se dejó durante 18 h a temperatura ambiente. Una parte de la mezcla se usó inmediatamente para la inmunización y el resto se almacenó a 0° C para su uso posterior.

11.4 Inmunización

Se inmunizaron tres conejos machos blancos de Nueva Zelanda, de 6 Kg. de peso corporal por inyección subcutánea múltiple de CCK-4 acoplada a tiroglobulina

en distintas partes de la espalda del animal. La CCK-4 acoplada a tiroglobulina fue emulsificada 1:1 (vol/vol) con adyuvante completo de Freund por aspiración y expulsión repetida. El volumen final inyectado fue de 0.3 ml conteniendo 0.7895 μmol de la CCK-4 acoplada a Tg.

11.5 Esquema de inmunización

Se realizaron 10 inmunizaciones con 15 días de intervalo, 10 días después de la décima inmunización los animales fueron sangrados por la vena de la oreja para evaluar el título de anticuerpos. A los animales que presentaron anticuerpos se les aplicaron inyecciones de refuerzo con intervalos variables, diez días después de cada refuerzo los conejos fueron sangrados por la vena de la oreja para evaluar el título de sus anticuerpos. La sangre obtenida se centrifugó a 4° C durante 15 min. a 5000 rpm para separar el suero y este fue congelado a -5° C en pequeñas porciones. Los animales cuyos sueros no tuvieron títulos adecuados fueron sacrificados.

11.6 Caracterización de los anticuerpos

El suero obtenido fue caracterizado en tres aspectos:

1) *Título*. Se determinó como la dilución de suero capaz de unir, en equilibrio, entre el 25-35% de 1.5 fmol de la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s añadida (Rehfeld, 1998).

2) *Afinidad de unión*. Se determinó de la K_D (constante de disociación) a partir de una curva de Scatchard.

3) *Especificidad*. Se determinó como la concentración de CCK-4, CCK-8s, CCK-33, gastrina, gastrina “grande” I humana, caeruleína, secretina y el péptido intestinal vasoactivo que inhibe al 50% la unión del marcador al anticuerpo (EC50).

11.7 Detección de los anticuerpos (título)

El ensayo para la detección de anticuerpos presentes en los sueros se realizó con base en el método reportado por Rehfeld (1998), con las siguientes modificaciones: Se utilizaron microtubos Eppendorf estándar desechables (1.5 ml),

empleando buffer Veronal 0.04 M, pH 8.4, conteniendo 4 g/l de albúmina sérica bovina (BSA), 0.6 g/l de bacitracina y 0.1% de azida de sodio. Como marcador o trazador (“tracer”) se usaron 1.5 fmol de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s. La mezcla de incubación contenía 50 µl de suero diluido (10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000, 30000, 100000 en el buffer del ensayo) y 50 µl de solución buffer-marcador (2000-3000 cpm). Las soluciones se mezclaron y se incubaron por 72 h a 4° C. El marcador unido al anticuerpo y el marcador libre se separaron por adición de 500 µl de una suspensión de Proteína A cruda de membranas de *Estafilococo aureus*, o con 100 µl de un gel de Proteína A acoplada a Sefarosa CL-4B e hidratada con buffer Veronal. Tras la adición de la preparación de Proteína A, los tubos permanecieron 2 h a 0°C más 30 min. a temperatura ambiente y luego fueron centrifugados en frío durante 3 min. en una microfuga Beckman. La radiactividad presente tanto en el sobrenadante (marcador libre, L) como en el sedimento (complejos anticuerpo-BH-[¹²⁵I]-CCK-8s, U) se midió en un contador Auto-Gamma (Cobra II Packard). El título se determinó como: U/U+L(100).

11.8 Experimentos de Saturación (afinidad)

El ensayo para determinar la constante de afinidad de los anticuerpos obtenidos se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Bylund and Yamamura (1990), con las siguientes modificaciones: el ensayo se realizó en microtubos Eppendorf estándar desechables (1.5 ml), usando buffer Veronal 0.02 M, pH 8.4, conteniendo 2 g/l de BSA y 0.3 g/l de bacitracina. Se prepararon seis concentraciones sucesivas de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s en el buffer del ensayo, de las cuales se tomaron muestras de 50µl para ser incubadas con 50 µl de suero diluido 1:30000 en el buffer del ensayo, durante 24 h a 4°C. La unión inespecífica se determinó con 50 µl de marcador y 50 µl de buffer del ensayo en ausencia de anticuerpo. El marcador unido al anticuerpo y el marcador libre se separaron por adición de 50 µl de una solución de carbón revestido con dextrán al 1% en buffer fosfatos 0.02 M, pH 7.4. Tras la adición de la suspensión de carbón, los tubos se agitaron fuertemente durante 3 min. y luego fueron centrifugados en frío por 2 min. en una microfuga Beckman. La radiactividad presente tanto en el sobrenadante (complejos anticuerpo-BH-[¹²⁵I]-CCK-8s) como en el sedimento (marcador libre) se midió en un contador Auto-Gamma (Cobra II Packard). La radiactividad asociada a los complejos inmunes y la no asociada para cada concentración de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s se

analizó para obtener la K_D (constante de disociación) por medio de un análisis de Scatchard, que es un método para linealizar datos obtenidos de experimentos de saturación que nos permite determinar constantes de unión.

11.9 Radioinmunoensayo

El diseño de los radioinmunoensayos se basó en el método establecido por You, et.al., 1997 y por Rehfeld, 1998, con las siguientes modificaciones: el radioinmunoensayo se realizó en microtubos Eppendorf estándar desechables (1.5 ml), usando buffer Veronal 0.02 M, pH 8.4, conteniendo 2 g/l de BSA y 0.3 g/l de bacitracina. Como marcador se usaron 1.5 fmol de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s. La mezcla de incubación contenía 50 µl de suero diluido (1:30000, en el buffer del ensayo), 100 µl de estándar (CCK-8s) o muestra y 50 µl de solución buffer-tracer (2000-3000 cpm). Las soluciones se mezclaron y se incubaron por 72 h a 4° C. El marcador unido al anticuerpo y el marcador libre se separaron por adición de 50 µl de una solución de carbón revestido con dextrán al 1% en buffer de fosfatos 0.02 M pH 7.4. Tras la adición de la suspensión de carbón, los tubos se agitaron fuertemente durante 3 min. y luego fueron centrifugados en frío 3 min. en una microfuga Beckman. La radiactividad presente en el sobrenadante (complejos anticuerpo-BH-[¹²⁵I]-CCK-8s) se midió en un contador Auto-Gamma (Cobra II Packard) y el sedimento (marcador libre) fue desechado

11.10 Especificidad

Para determinar la especificidad de los anticuerpos antiCCK contenidos en el suero 49-5 se realizaron radioinmunoensayos utilizando microtubos Eppendorf estándar desechables (1.5 ml), usando buffer Veronal 0.02 M, pH 8.4, conteniendo 2 g/l de BSA y 0.3 g/l de bacitracina. Como marcador se usaron 1.5 fmol de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s. La mezcla de incubación contenía 50 µl de suero diluido (1:30000, en el buffer del ensayo), 100 µl del péptido estándar a probar (CCK-4, CCK-8s, CCK-33, gastrina,

secretina, péptido intestinal vasoactivo, caeruleína y gastrina “grande” I humana) y 50 µl de solución buffer-tracer (2000-3000 cpm). Las soluciones se mezclaron y se incubaron por 72 h a 4° C. El marcador unido al anticuerpo y el marcador libre se separaron por adición de 50 µl de una solución de carbón revestido con dextrán al 1% en buffer de fosfatos 0.02 M pH 7.4. Tras la adición de la suspensión de carbón, los tubos se agitaron fuertemente durante 3 min. y luego fueron centrifugados en frío 3 min. en una microfuga Beckman. La radiactividad presente en el sobrenadante (complejos anticuerpo-BH-[¹²⁵I]-CCK-8s) se midió en un contador Auto-Gamma (Cobra II Packard) y el sedimento (marcador libre) fue desechado.

11.11 Extracción de la CCK de tejido

Para llevar a cabo la extracción de la CCK de tejido se tomó como base el método reportado por Marley & Rehfeld (1984) con las siguientes modificaciones: se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de 180-220 g de peso, proporcionadas por el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, las cuales fueron decapitadas para extraer los cerebros que se colocaron en agua destilada a 4°C. Se disectó la corteza cerebral y se obtuvo el peso del tejido húmedo. Las cortezas se colocaron en 10 ml de agua destilada/g tejido y se homogenizaron en un sonicador durante 5 min. a alta velocidad. El homogenizado se hirvió durante 10 min. y se centrifugó por 20 min. a 3000 rpm. El sobrenadante se resuspendió en 1 ml de NaCl 0.15 M conteniendo 0.2% de BSA, alícuotas de 25 a 100 µl diluidas en buffer Veronal fueron usados para la medición de su contenido en CCK por RIA.

12 Resultados

12.1 Producción y título de anticuerpos

El título de anticuerpos en los sueros obtenidos en el primer sangrado tras 10 inmunizaciones se muestra en la Tabla 5. Aunque en los sueros de todos los conejos se encontraron anticuerpos antiCCK, el porcentaje de unión del marcador radiactivo BH-^[125I]-CCK-8s al anticuerpo con los diferentes títulos (dilución), indica baja producción de anticuerpos en los sueros 47-1 y 50-1 obtenidos en el primer sangrado. Por tal motivo los conejos 47 y 50 cuyos sueros no fueron adecuados se sacrificaron. El conejo restante (49) continuó siendo inmunizado de acuerdo al esquema señalado y el título de anticuerpos después de cada refuerzo, se evaluó como se señaló anteriormente.

TABLA 5. Título de anticuerpos antiCCK en sueros obtenidos de conejos inmunizados con CCK-4 acoplada a Tg bovina.

SUERO	TITULO DE LOS ANTICUERPOS						
	100	300	1000	3000	10000	30000	100000
47-1		X					
50-1			X				
49-1					X		
49-2					X		
49-3						X	
49-4							X
49-5							X

El título de anticuerpos antiCCK indica la dilución del suero capaz de unir entre 25 a 35% del marcador BH-^[125I]-CCK-8 usado.

Como puede observarse en la Tabla 5, el título de anticuerpos en este conejo se fue incrementando después de cada refuerzo, siendo el suero 49-5 el más alto, pues en el se encontró una cantidad significativa de anticuerpos a diluciones tan altas como 100 000 veces, El contenido de anticuerpos del suero 49-5 se comparó con el contenido de anticuerpos de un suero comercial (SIGMA-Aldrich Fine Chemicals). Como se observa en la Fig. 3 el contenido de ambos sueros es similar no encontrándose diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) con la prueba estadística t-Student pareada.

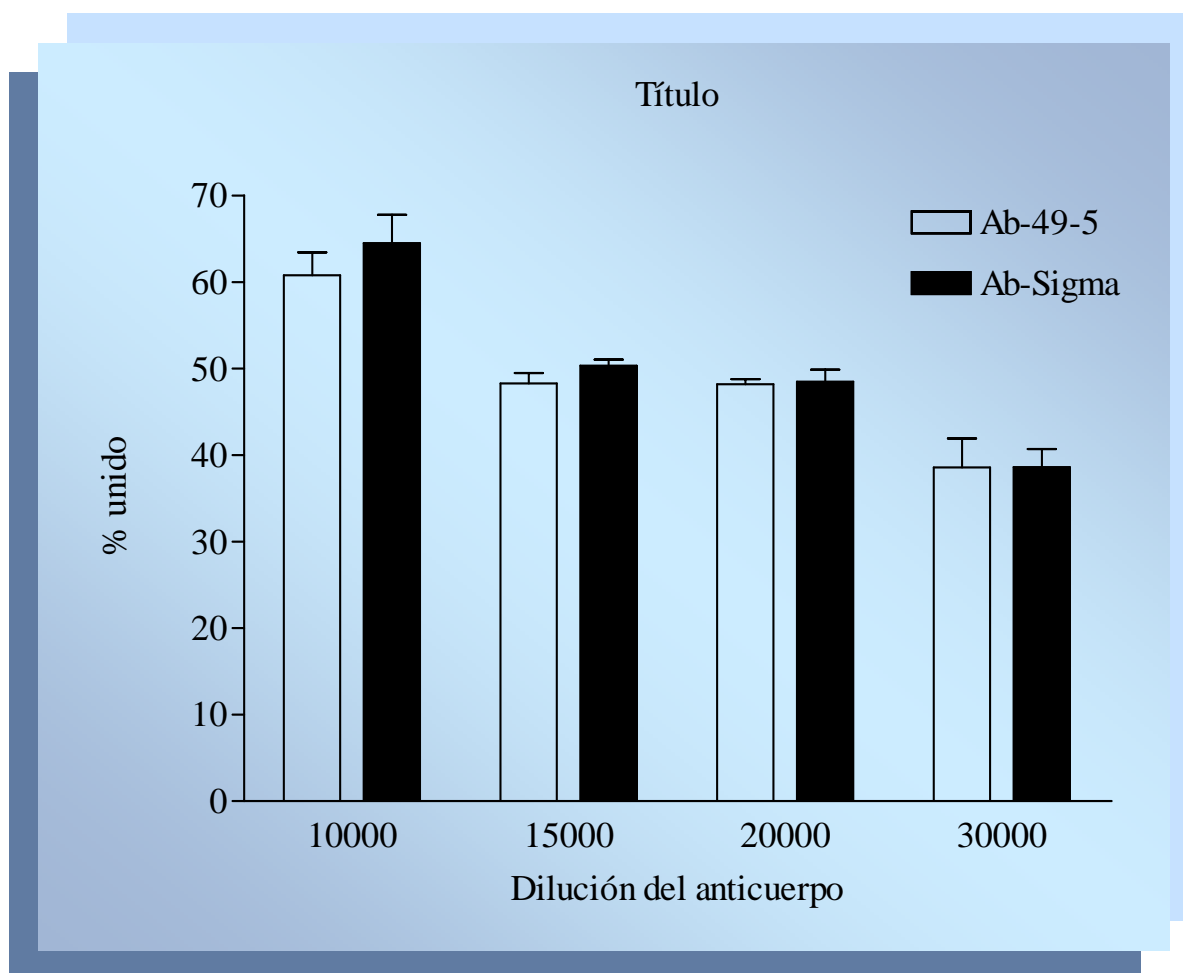


Fig. 3 Porcentaje de unión de la BH-[125I]-CCK-8s a los sueros 49-5 y Ab-Sigma diluidos 1:10000, 1:15000, 1:20000 y 1:30000; 50 μ l de suero fueron incubados con BH-[¹²⁵I]-CCK-8s durante 72 h. Al final de la incubación el péptido radiactivo libre fue separado del unido al anticuerpo por la adición de 500 μ l de una suspensión de Proteína A cruda de membranas de *Estafilococo aureus* o con 100 μ l de un gel de Proteína A-Sefarosa CL-4B y centrifugado en frío. La radiactividad fue contada tanto en el sobrenadante como en el pellet de Proteína A que contiene los complejos anticuerpo-BH-[¹²⁵I]-CCK-8s. En las ordenadas se muestra el porcentaje unido y en las abscisas la dilución del suero. El título está definido como la dilución del suero que une entre el 25 -35% de 1.5 fmol de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s en equilibrio (Rehfeld, 1998).

11.1 Afinidad

La afinidad de los anticuerpos, presentes en el suero 49-5 por la CCK se determinó como la constante de disociación (K_D) obtenida a partir de un análisis de Scatchard de la reacción de la CCK-8s con el anticuerpo. La K_D obtenida fue de 33.1 ± 9.0 pM de la CCK con una R^2 de 0.9917 (Fig. 4).

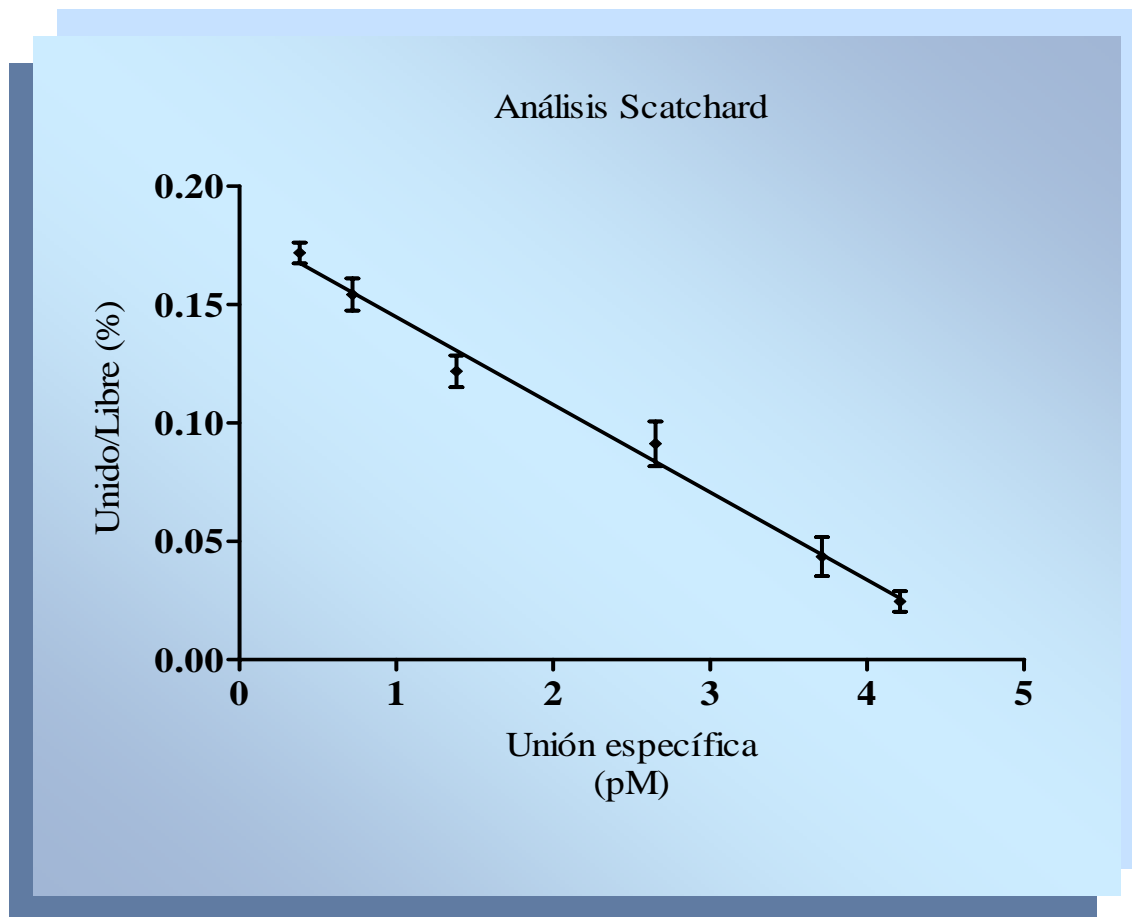


Fig. 4 Gráfica del análisis Scatchard. 50 μ l de suero (título 1:30,000) fueron incubados con 50 μ l de seis concentraciones sucesivas de BH-[125 I]-CCK-8s durante 24 h a 4°C. El marcador unido al anticuerpo fue separado del marcador libre por la adición de 50 μ l de una suspensión de carbón activado revestido con dextrán al 1% en buffer fosfatos 0.02M y centrifugado en frío. La radiactividad asociada a los complejos inmunes y la no asociada para cada concentración de BH-[125 I]-CCK-8s se analizó para obtener la K_D (constante de disociación) por medio de un análisis de Scatchard. En las ordenadas se muestra el porcentaje de BH-[125 I]-CCK-8s unido al anticuerpo y en las abcisas la unión específica (cpm). Los datos son la media de la unión específica de BH-[125 I]-CCK-8s al anticuerpo, n = 4.

11.2 Radioinmunoensayo

El rango de concentraciones útiles (0.122 a 90 pM de la CCK) para ser usados en la curva estándar de un radioinmunoensayo dirigido a detectar CCK-8s y/o CCK-4 en material biológico se muestra en la Fig. 5. El límite del ensayo fue de 0.278 pg. El coeficiente de variación que se determinó a partir de la desviación estándar obtenida para cada caso fue para la variación interensayo de 16.33% tomando en cuenta siete radioinmunoensayos independientes, mientras que para la variación intraensayo fue de 8.101% considerando un experimento por sextuplicado.

El porcentaje de unión de la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s utilizada como marcador a los anticuerpos contenidos en el suero 49-5 en ausencia de la CCK fue de 47.49 ± 1.62 % con una dilución de anticuerpo de 1:30 000. La unión inespecífica del marcador BH-[¹²⁵I]-CCK-8s se calculó alrededor de 16.77 ± 1.14 %.

El RIA montado con el suero 49-5 producido en este laboratorio se comparó con el realizado con un suero comercial (SIGMA-Aldrich Fine Chemicals). Como se observa en la Fig. 5 la curva de desplazamiento de la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s por diferentes concentraciones de la CCK-8s no radiactiva es similar con ambos anticuerpos no encontrándose diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) con la prueba estadística t-Student.

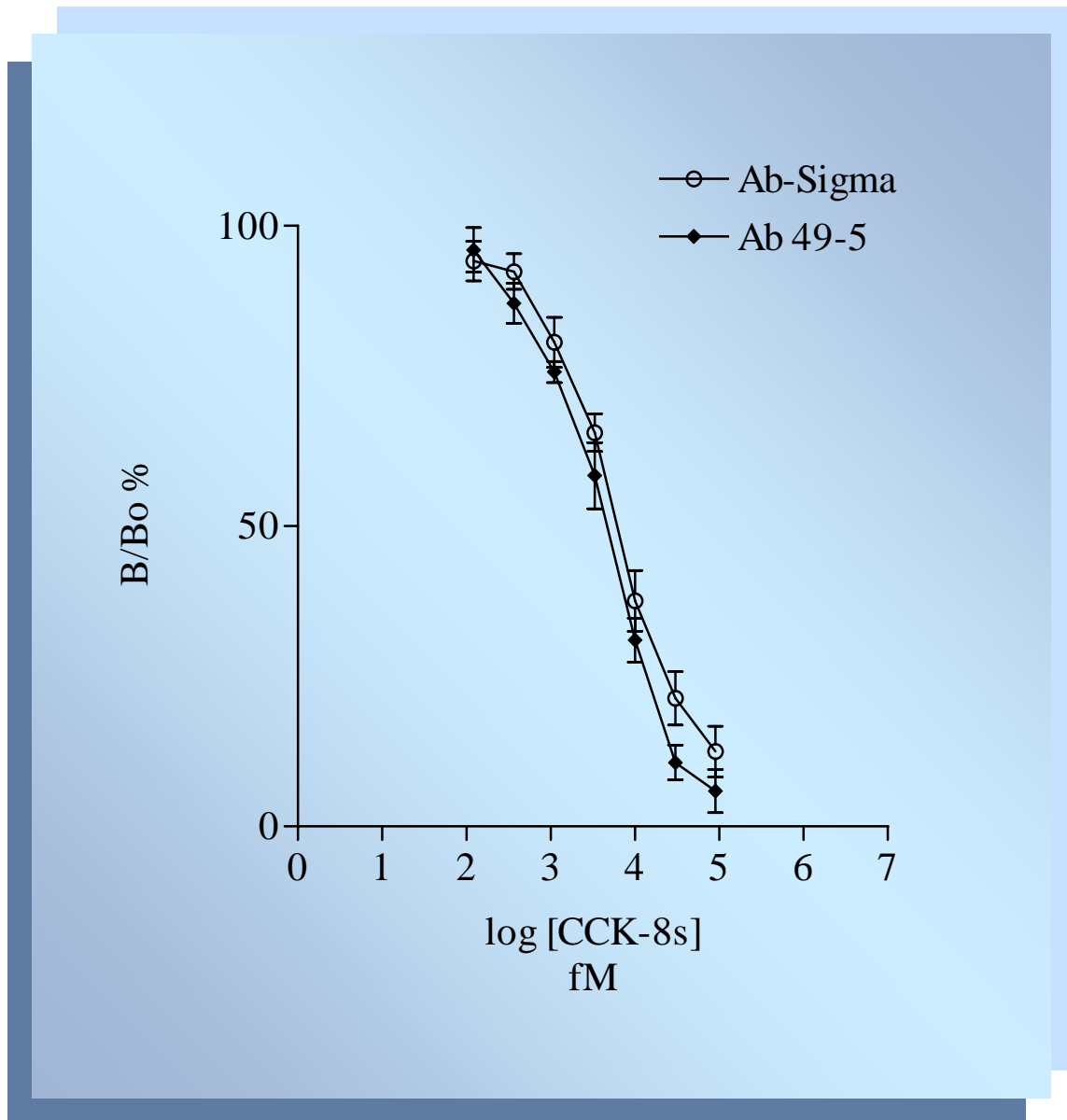


Fig. 5 Curva de desplazamiento de la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s por CCK-8s no radiactiva. 50 μ l de suero (título 1:30,000) fueron incubados con BH-[¹²⁵I]-CCK-8s y concentraciones crecientes de CCK-8s fría durante 72 h. Al final de la incubación el péptido radiactivo libre se separó del unido al anticuerpo por la adición de 50 μ l de una suspensión de carbón activado revestido con dextrán al 1% en buffer fosfatos 0.02M y centrifugado en frío. La radiactividad fue contada en el sobrenadante que contiene a los complejos anticuerpo-BH-[¹²⁵I]-CCK-8s. En las ordenadas se muestra el porcentaje de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s unido al anticuerpo y en las abscisas el logaritmo de la concentración fM de CCK-8s usada como desplazador, n = 3.

11.3 Especificidad

La especificidad obtenida para los anticuerpos presentes en el suero 49-5 se definió sobre la base de su reactividad con otros péptidos relacionados con la CCK. Los resultados indican que los anticuerpos contenidos en el suero 49-5 obtenido en este laboratorio, no fueron capaces de diferenciar a la CCK-8s de la CCK-4, pues reconocen a ambos péptidos con una potencia similar. Como se puede observar en la Tabla. 6 la EC50 obtenida en las curvas de desplazamiento con CCK-8s no radiactiva fue de 1.226 ± 0.11 pM, mientras que la de CCK-4 fue de 1.047 ± 0.15 pM, indicando ser ligeramente más específico para la CCK-4. Incluso el rango de la curva estándar para éste péptido se estableció de 0.013 a 90 pM (Fig. 7), mientras que para la CCK-8s y el resto de los péptidos relacionados con la CCK fue de 0.122 a 90 pM. (Fig. 6).

TABLA 6. Unión de la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s a el suero 49-5 en presencia de péptidos relacionados con la CCK.

Péptidos	EC50 pM
CCK-8S	1.226 ± 0.1109
CCK-4	1.047 ± 0.1533
CCK-33	0
Caeruleína	0
Gastrina	0
Gastrina “grande” I humana	0
Secretina	0
Peptido intestinal vasoactivo	0

Es interesante señalar que nuestro anticuerpo no reconoció a la caeruleína que solo difiere de la CCK-8s por tener sustituido el residuo de metionina⁷⁸ por treonina en su secuencia C- terminal y tampoco a las formas de alto peso molecular de la CCK (CCK-33, Fig. 8; caeruleína Fig. 9). Asimismo, con ninguno de los péptidos relacionados con la CCK usados en este trabajo (gastrina, Fig. 10; gastrina “grande” I humana, Fig. 11;

secretina, Fig. 12 y péptido intestinal vasoactivo, Fig. 13) se observó alguna reacción. Los datos de las EC50 para cada péptido usado se pueden observar en la Tabla 6.

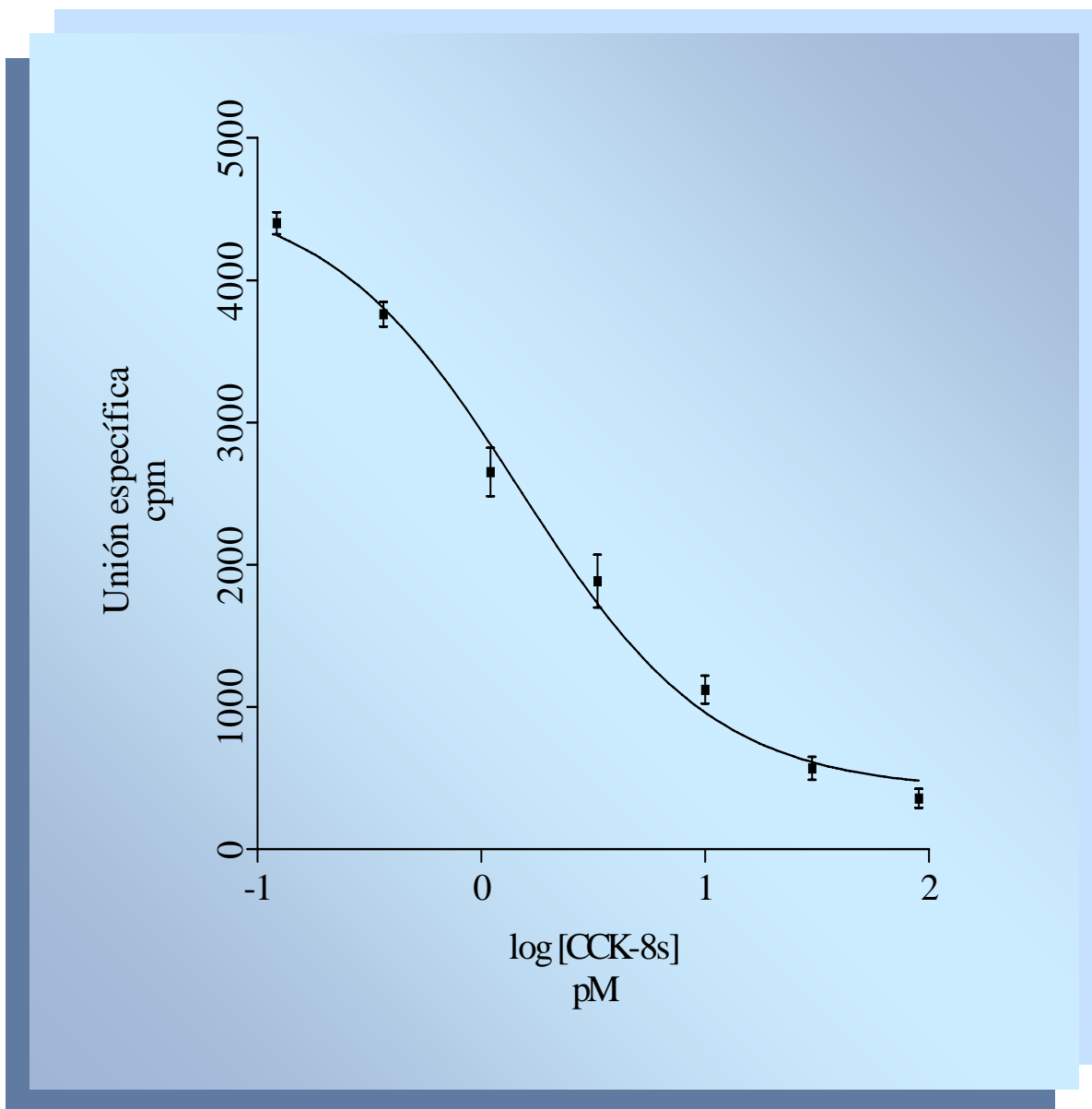


Fig. 6 Curva de desplazamiento de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s a su anticuerpo por CCK-8s no radiactiva. Utilizando los anticuerpos obtenidos y el radioinmunoensayo implementado fue posible detectar a la CCK dentro de un rango de concentración de 0.122 a 90 pM. Los datos son la media \pm SEM de la unión específica de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s unida al anticuerpo, n= 6. Para detalles experimentales ver la Fig. 5.

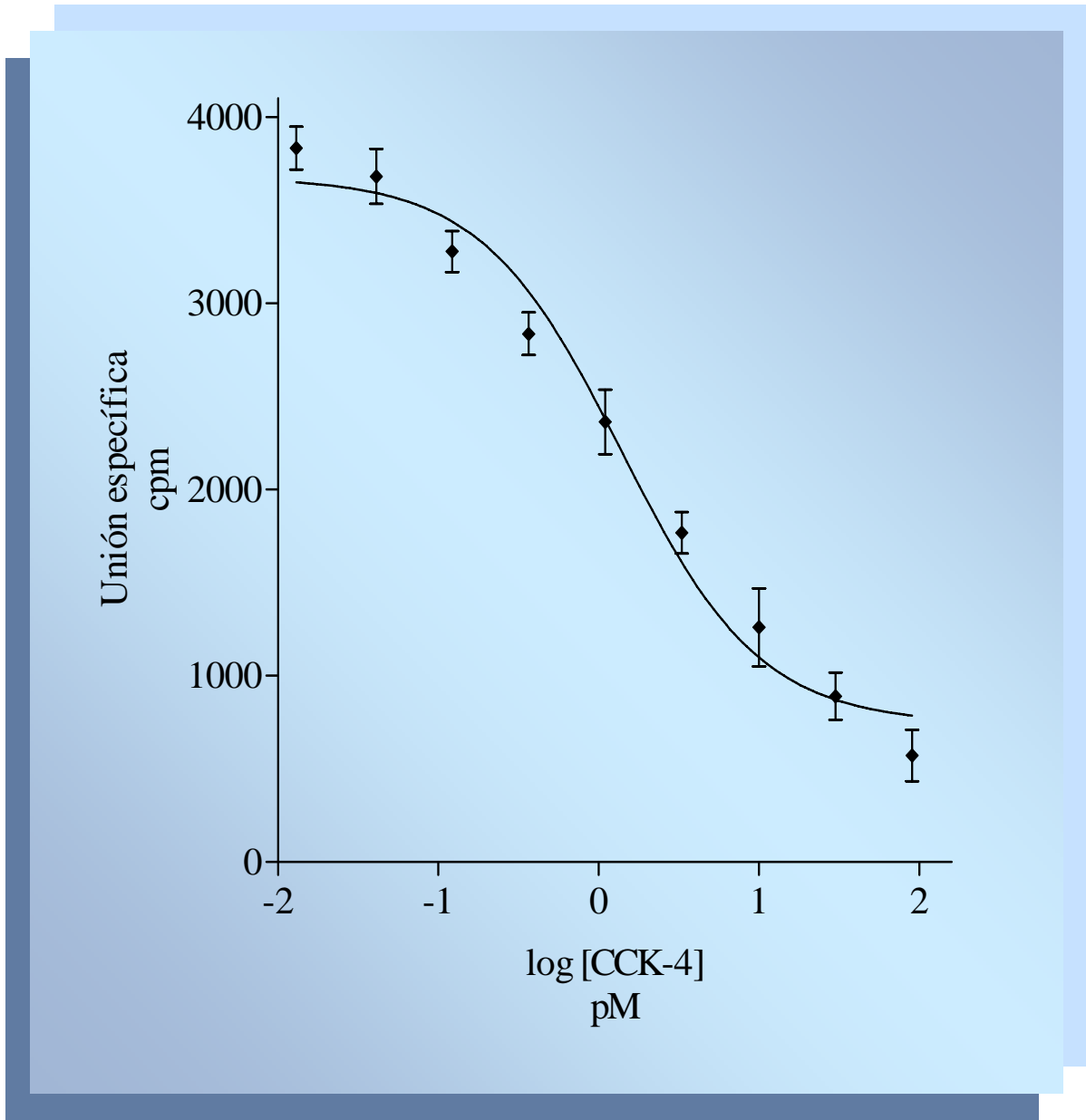


Fig. 7 Curva de desplazamiento de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s por CCK-4 no radiactiva. Nótese que la CCK-4 fue capaz de desplazar eficientemente a la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s unida a su anticuerpo, n = 4. Para detalles experimentales ver la Fig. 5.

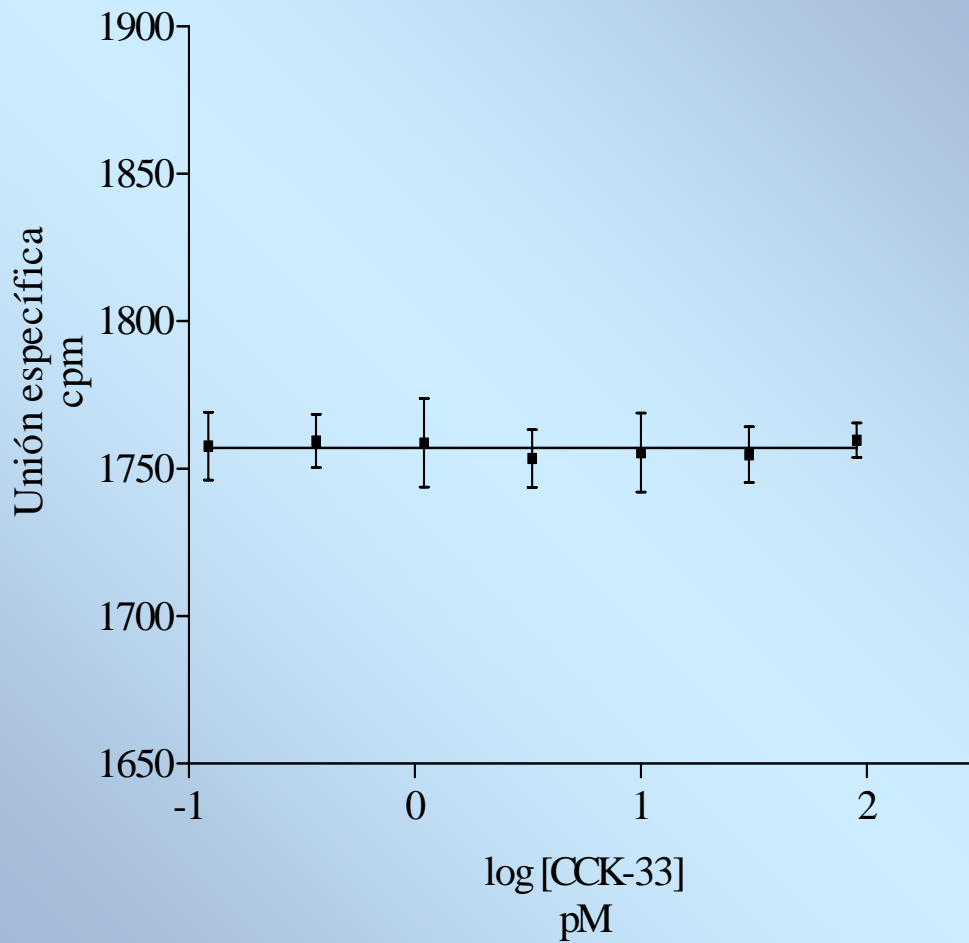


Fig. 8 Curva de desplazamiento de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s por CCK-33 no radiactiva. Nótese que la CCK-33 no fue capaz de desplazar eficientemente a la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s de su unión con el anticuerpo usado en este radioinmunoensayo, n = 4. Para detalles experimentales ver la Fig. 5.

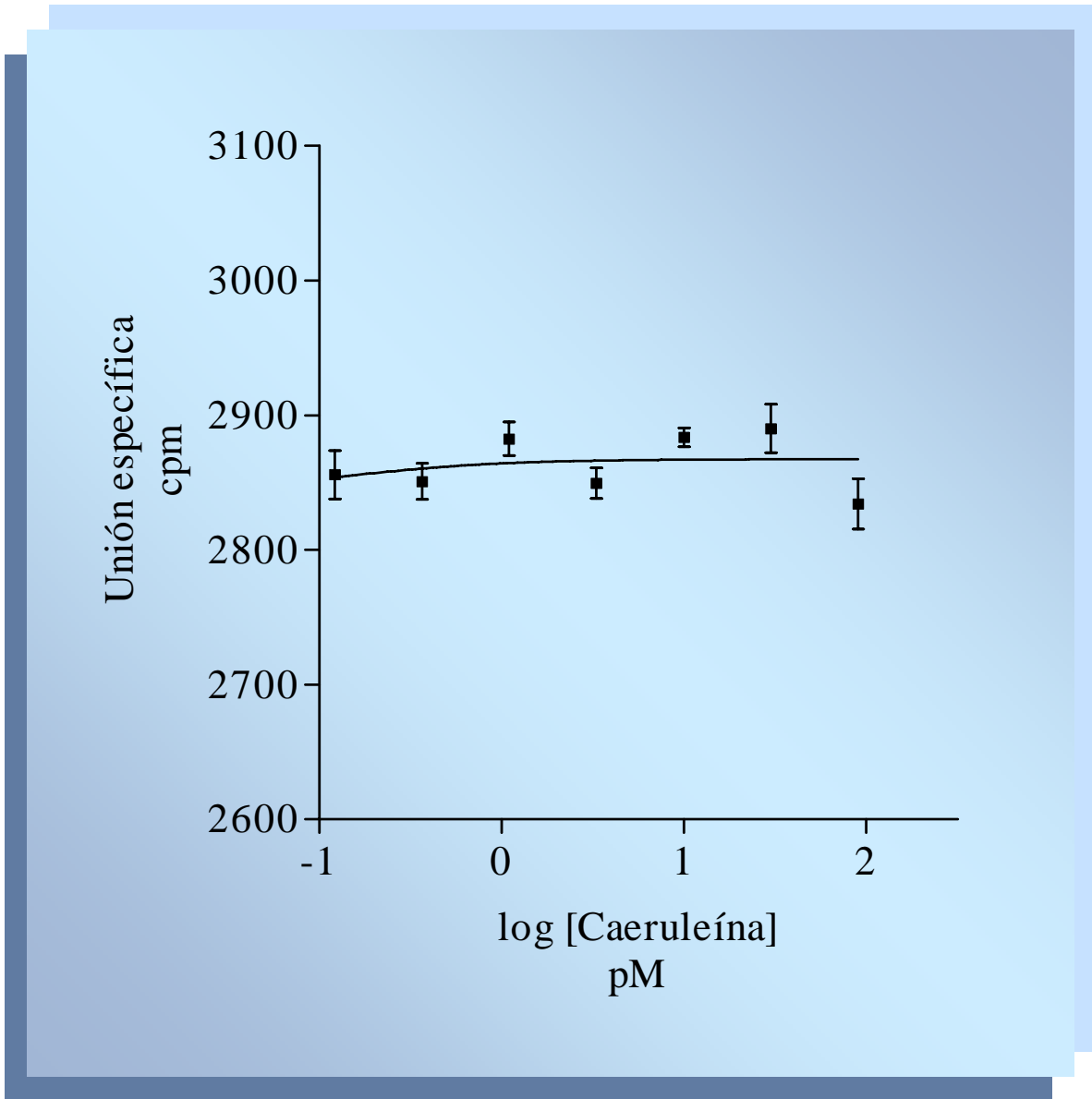


Fig. 9 Curva de desplazamiento de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s por caeruleína no radiactiva. Nótese que la caeruleína no fue capaz de desplazar eficientemente a la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s de su unión con el anticuerpo usado en este radioinmunoensayo, n = 4. Para detalles experimentales ver la Fig. 5.

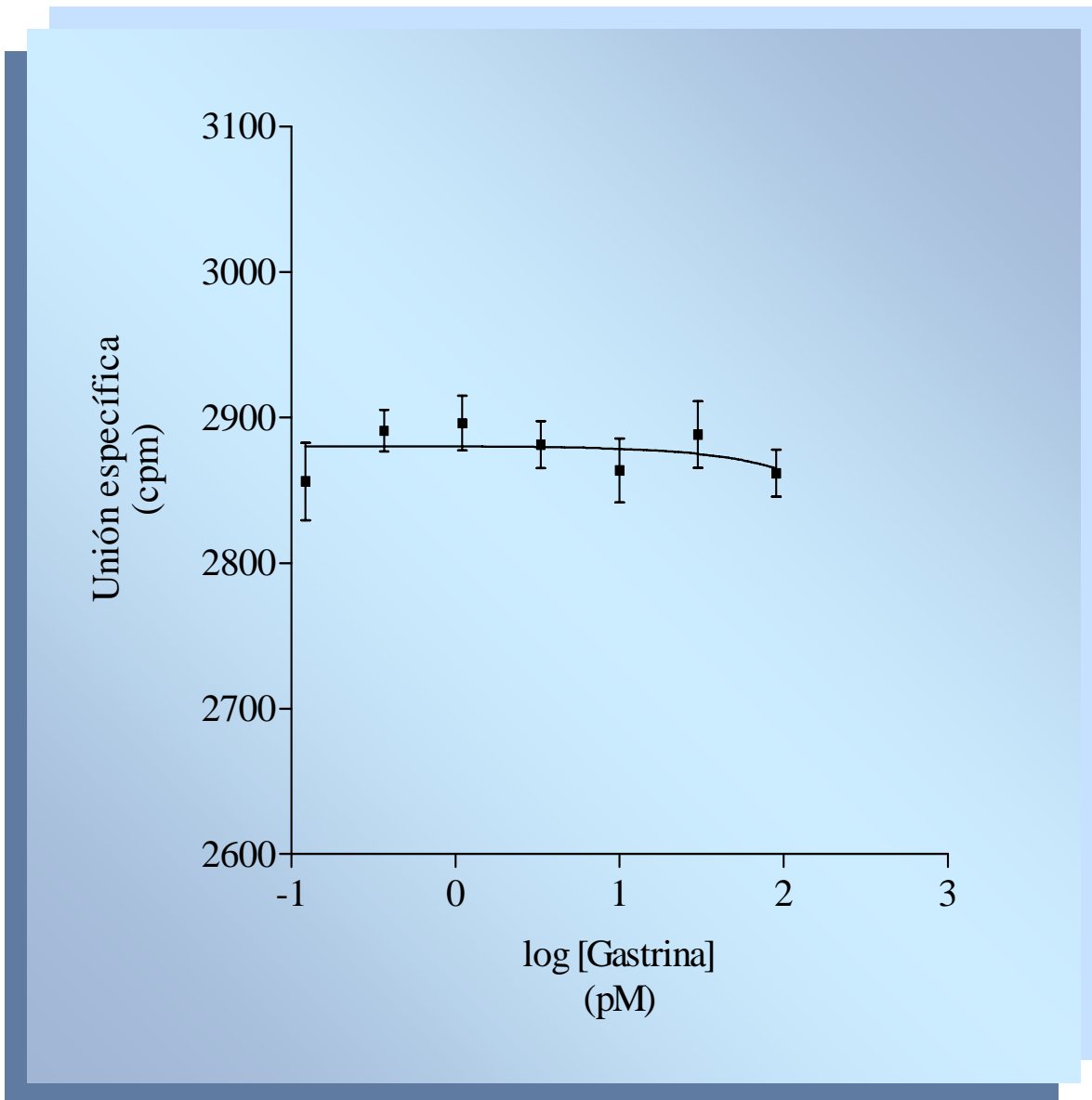


Fig. 10 Curva de desplazamiento de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s por gastrina no radiactiva. Nótese que la gastrina no fue capaz de desplazar eficientemente a la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s de su unión con el anticuerpo usado en este radioinmunoensayo, n = 4. Para detalles experimentales ver la Fig. 5.

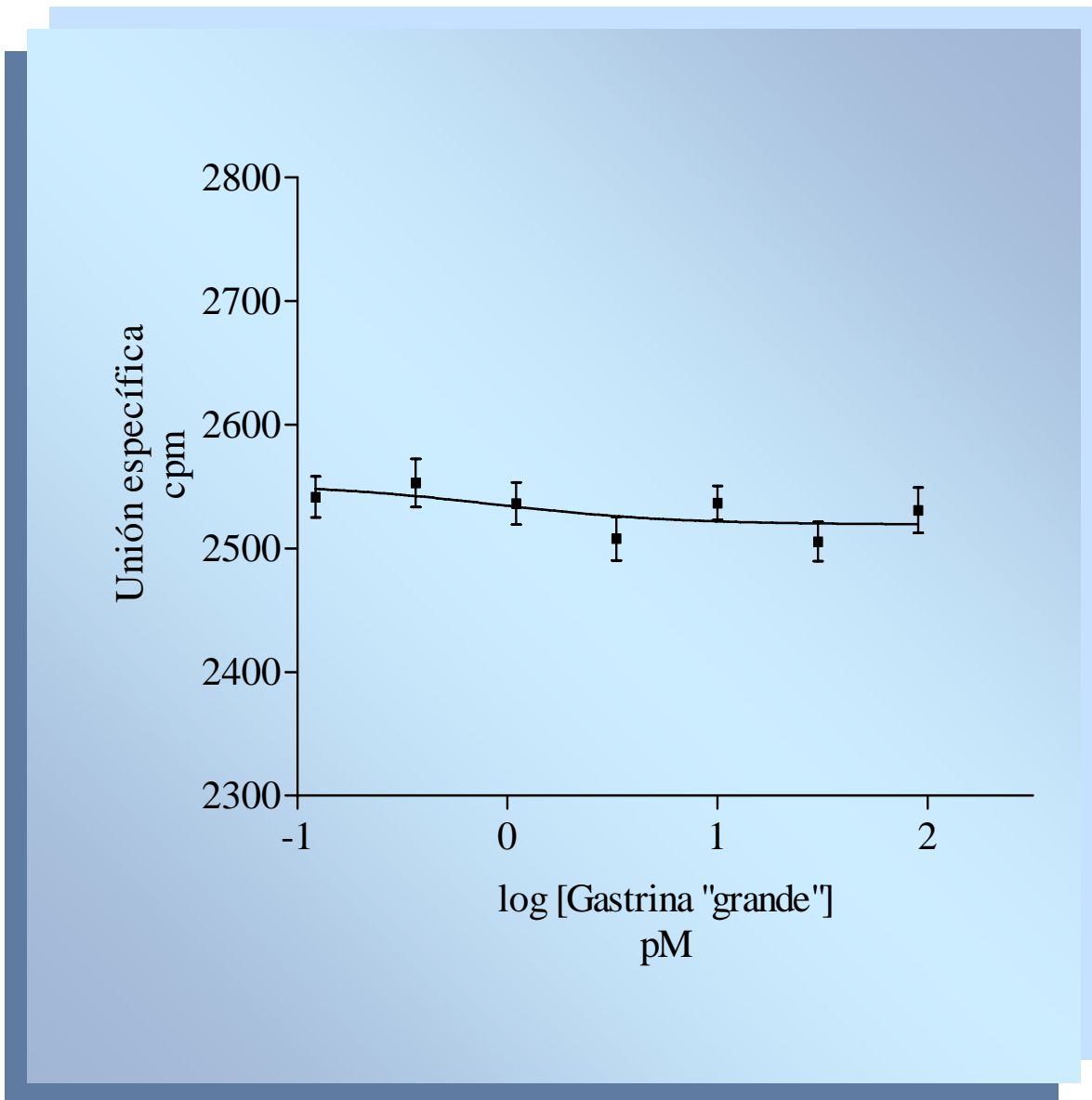


Fig. 11 Curva de desplazamiento de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s por gastrina “grande” no radiactiva. Nótese que la gastrina “grande” no fue capaz de desplazar eficientemente a la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s de su unión con el anticuerpo usado en este radioinmunoensayo, n = 4. Para detalles experimentales ver la Fig. 5.

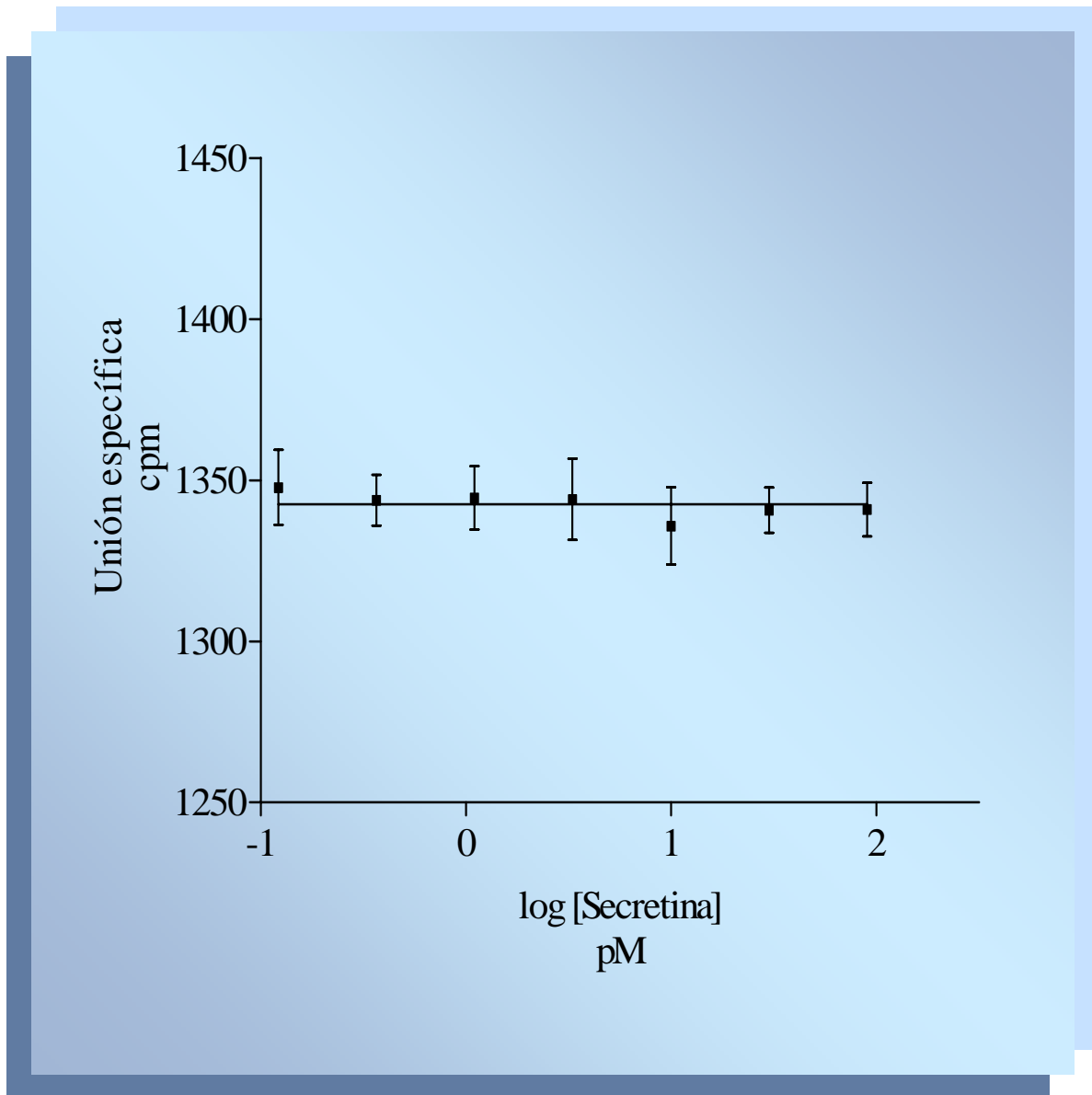


Fig. 12 Curva de desplazamiento de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s por secretina no radiactiva. Nótese que la secretina no fue capaz de desplazar eficientemente a la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s de su unión con el anticuerpo usado en este radioinmunoensayo, n=4. Para detalles experimentales ver la Fig. 5.

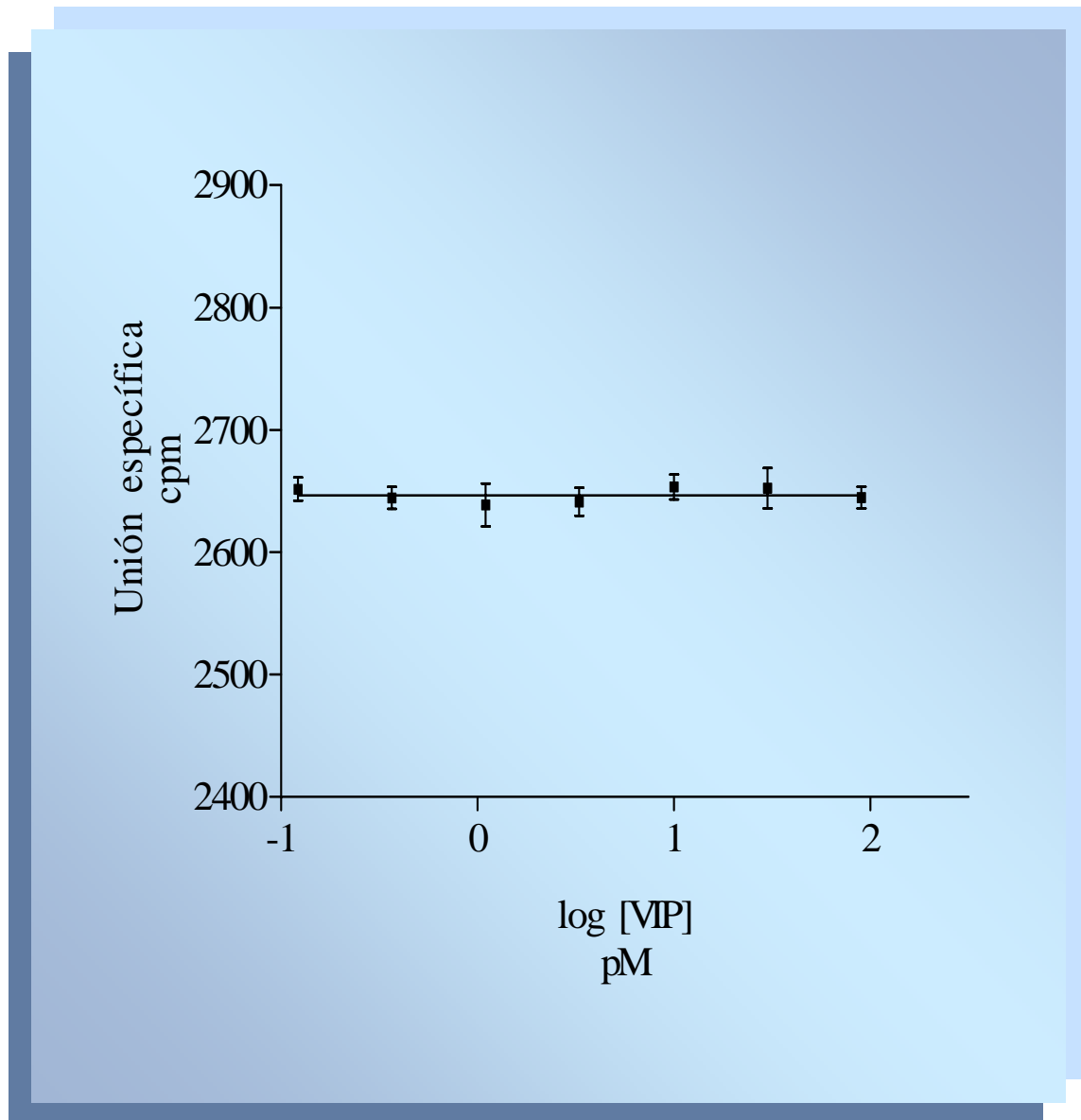


Fig. 13 Curva de desplazamiento de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s por VIP no radiactivo. Nótese que el péptido intestinal vasoactivo no fue capaz de desplazar eficientemente a la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s de su unión con el anticuerpo usado en este radioinmunoensayo, n = 4. Para detalles experimentales ver la Fig. 5.

11.4 Cuantificación de la CCK en material biológico

Respecto a la medición de la CCK en tejido cerebral se determinó que mediante los anticuerpos contenidos en el suero 49-5 y el RIA diseñado en este laboratorio, fue posible detectar y cuantificar adecuadamente los niveles contenidos de la CCK-8s, extraídos selectivamente de corteza cerebral de rata, como se puede apreciar en la Fig. 14. Su contenido fue de 0.9076 ± 0.5978 pM de CCK-8s/mg de tejido (peso húmedo)

Adicionalmente el suero 49-5 usado en este trabajo también fue adecuado para medir el contenido de las formas de bajo peso molecular de la CCK en líquido cefalorraquídeo de rata. La concentración de la CCK obtenida en este material biológico fue de 0.3739 ± 0.044 pM/100 μ l de muestra, ver Fig. 15.

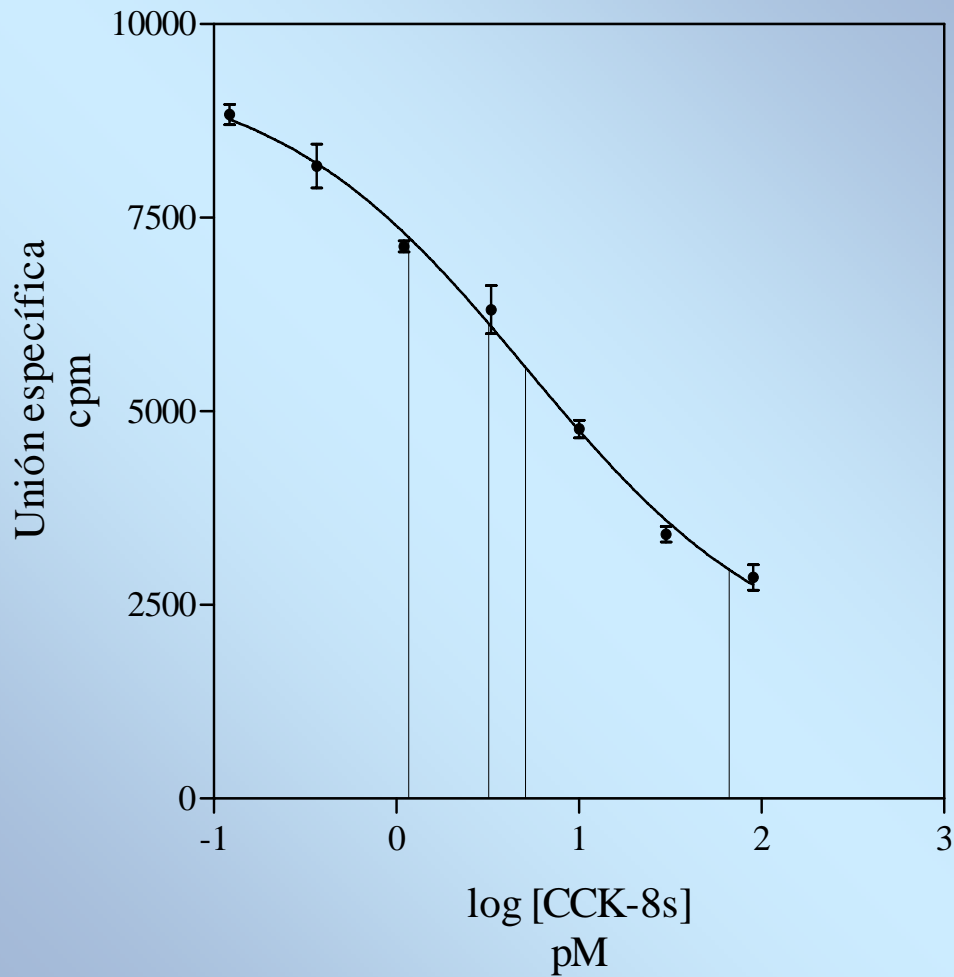


Fig. 14 Cuantificación de la CCK-8s en tejido cerebral. 50 μ l de suero (título 1:30,000) fueron incubados con BH-[¹²⁵I]-CCK-8s y diluciones seriales de CCK-8s fría extraída de tejido cerebral durante 72 h. Al final de la incubación el péptido radiactivo libre del unido al anticuerpo fue separado por la adición de 50 μ l de una solución de carbón revestido con dextrán al 1% en buffer fosfatos 0.02 M y centrifugado en frío. La radiactividad fue contada en el sobrenadante que contiene a los complejos anticuerpo-BH-[¹²⁵I]-CCK-8s. En las ordenadas se muestra la unión específica de la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s por el anticuerpo y en las abscisas el logaritmo de la concentración pM de CCK-8s usada como desplazador. Los datos son la media \pm SEM de la unión específica de BH-[¹²⁵I]-CCK-8s al anticuerpo, n = 3.

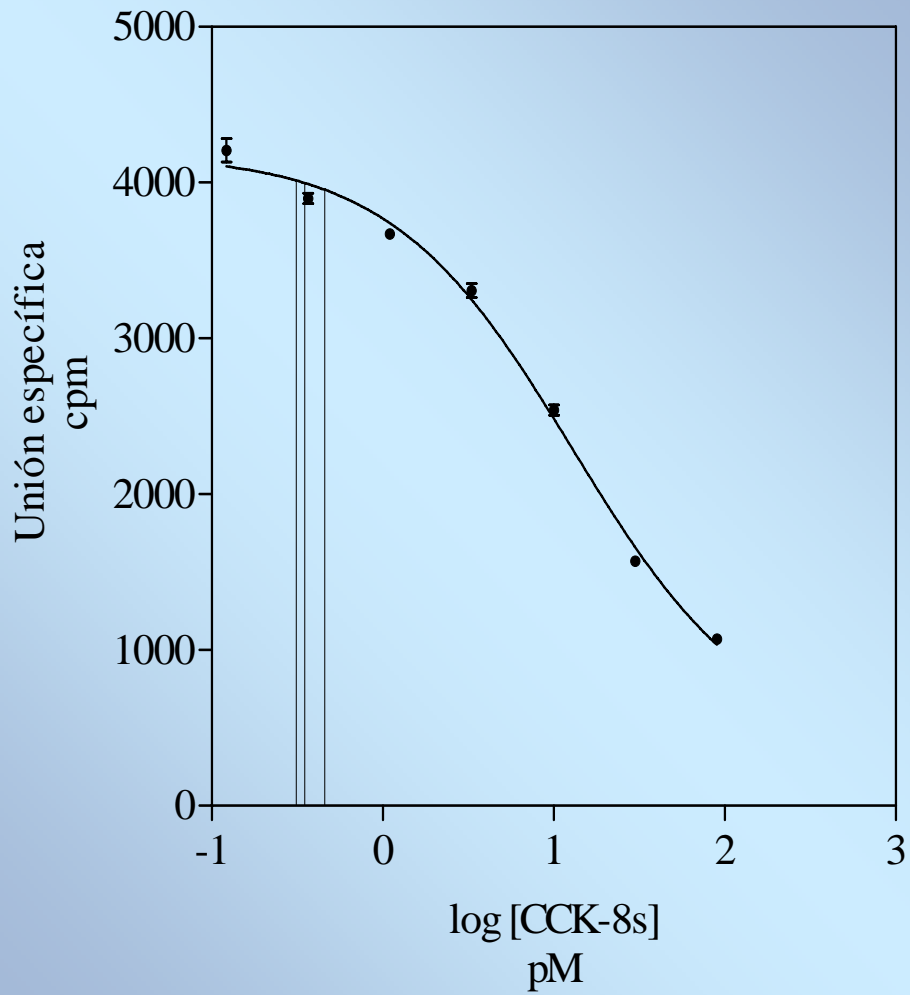


Fig. 15 Cuantificación de la CCK en líquido cefalorraquídeo. Nótese la concentración de CCK-8s obtenida por RIA en este material biológico, $n = 3$. Para detalles experimentales ver la Fig. 14.

13 *Discusión*

La CCK es una familia de péptidos que posee miembros de alto y bajo peso molecular que participan en numerosas manifestaciones funcionales. De ellos, los péptidos de bajo peso molecular (CCK-4 y CCK-8s) reconocen receptores ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y regulan como ya ha sido revisado en la introducción numerosos procesos en el cerebro de los mamíferos.

En el presente trabajo fue posible desarrollar un radioinmunoensayo adecuado y confiable para cuantificar las formas de bajo peso molecular de la CCK en material biológico, tal como líquido cefalorraquídeo y tejido cerebral. A pesar de que durante los últimos años se han reportado una gran cantidad de ensayos para cuantificación de la CCK, muchos de ellos no han tenido la validez suficiente, debido en gran parte a que los anticuerpos que se utilizan en dichos métodos no presentan las características de título, afinidad y especificidad necesarias. Debido a lo anterior, pocos laboratorios han logrado cuantificar las concentraciones de la CCK de manera confiable y aunque algunos lo han logrado han tenido necesidad, en muchas ocasiones, de combinar el RIA con otras técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que por sus características es costosa y no permite cuantificar en poco tiempo un gran número de muestras, tal es el caso de investigadores como Robberech, et.al. (1978), Maidment, et.al. (1991 y 1997), Merani, et. al. (1997), Rehfeld (1998) y Xiao-Jun, et.al. (2001). Mientras que, otros como Vanderhaeghen, et. al. (1980), Beinfeld, et.al. (1985), You, et.al. (1997), Gustafsson, et.al. (1999) y Becker, et.al. (2001) han desarrollado RIAs exitosamente sin tener que combinar con otra técnica. Sin embargo, la mayor parte de estos trabajos usan anticuerpos provenientes del laboratorio de Rehfeld o bien utilizan “Kits” que son adquiridos comercialmente, haciendo que la determinación de la CCK en muestras biológicas siga siendo azarosa o muy costosa, pues queda sujeta a la buena voluntad de los donantes a lo abultado de los fondos del laboratorio que la practica (Rehfeld, et.al., 1973)

De esta manera, la dificultad para obtener resultados cuantitativos confiables ha contribuido a nuestra ignorancia acerca del papel funcional de la CCK por lo que resulta necesario continuar realizando esfuerzos para desarrollar ensayos sensibles y específicos que permitan su cuantificación adecuada. Ante esta situación el objeto del presente trabajo fue la obtención de anticuerpos específicos, desarrollados en conejos en contra de las formas de bajo peso molecular de la CCK, en un intento por establecer un RIA específico y de bajo costo para éste péptido y así poder estudiar con precisión, posibles cambios en su concentración bajo diferentes condiciones experimentales.

En consecuencia, en éste trabajo el paso decisivo para el desarrollo del radioinmunoensayo que se reporta fue la obtención de anticuerpos con títulos altos, elevada especificidad y una afinidad adecuada para la detección de las formas bajo peso molecular de la CCK. Dicha obtención fue lograda utilizando CCK-4 acoplada a tiroglobulina bovina. Sin embargo, la respuesta de los conejos al esquema de inmunización utilizado fue variable, lográndose obtener títulos de anticuerpos adecuados únicamente en el conejo 49 tras cinco inmunizaciones repetidas, cuyo suero alcanzó un título tan alto como 1:100000 (Tabla 5; suero 49-5) comparándose favorablemente con el título de anticuerpos presentes en una preparación comercial (SIGMA-Aldrich) de alta calidad (Fig. 3).

Existen algunas situaciones que son críticas para la producción de anticuerpos, tales como, el tamaño de la molécula inyectada (antígeno), la cantidad de inmunógeno utilizado, el número de inmunizaciones aplicadas y la vía de su administración. Dado que la CCK es una molécula muy pequeña (633.2 kD) y su antigenicidad es seguramente muy baja, como ocurre con la de todos los haptenos, se acopló a una glicoproteína de alto peso molecular (670 kD) en un intento por aumentar su antigenicidad. A pesar de eso, solo en uno de tres conejos y después de 13 inmunizaciones fue posible demostrar un título suficientemente alto de anticuerpos antiCCK, como para ser utilizados en el diseño de un radioinmunoensayo útil para la cuantificación de esta molécula. En este conejo (49-5) títulos de anticuerpos altos fueron obtenidos desde el primer sangrado y continuaron incrementándose paulatinamente con la administración

adicional de nuevas dosis del inmunógeno (Tabla 5). La cantidad de inmunógeno y la vía utilizada para su administración fueron seleccionadas por haber sido reportadas (Skowsky & Fisher, 1972; Merani, 1997; Rehfeld, 1998) como efectivas para la producción de anticuerpos antiCCK. Los resultados obtenidos con el conejo 49 confirmaron la utilidad de estos parámetros.

Dado que los anticuerpos obtenidos en nuestro trabajo fueron logrados usando como inmunógeno a la CCK-4, que está formada por los cuatro últimos aminoácidos de la región carboxilo terminal de toda la familia de la CCK, no resultó sorprendente que los anticuerpos obtenidos hayan reconocido aparte de la CCK-4 a la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s usada como marcador.

La afinidad obtenida para el anticuerpo producido en este laboratorio fue de 33.15 ± 9.01 pM (Fig. 4), que compara favorablemente con el valor reportado por Rehfeld en 1998 como adecuado para el uso de anticuerpos contra la CCK en procedimientos de radioinmunoensayo. A este respecto es importante mencionar también que el marcador usado para determinar la constante de disociación K_D en este trabajo fue la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s, y tal como se observa en la Fig. 7 el RIA es más específico para la CCK-4.

Por lo que toca a la especificidad encontrada, como en el caso de los anticuerpos reportados por otros laboratorios (Beinfeld, 1985; Merani, 1997; Rehfeld, 1998) nuestros anticuerpos resultaron altamente específicos para las formas de bajo peso molecular de la familia CCK y particularmente para la CCK-4 y la CCK-8s pues fueron las únicas formas capaces de desplazar a la BH-[¹²⁵I]-CCK-8s usada como marcador encontrándose una EC50 ligeramente más favorable para la CCK-4 (1.047 contra 1.226 pM, Tabla 6, Figuras 6 y 7). Asimismo, nuestros anticuerpos no fueron capaces de reconocer a las formas grandes de la CCK (CCK-33; Tabla 6; Figura 8) ni a otros péptidos relacionados con ella como la caeruleína, gastrina, secretina y péptido intestinal vasoactivo (Tabla 6; Figuras 9, 10, 12 y 13) reconociendo sólo ligeramente a la gastrina grande (Tabla 6; Figura 11). Consideramos por tanto, que la especificidad obtenida garantiza en nuestro

radioinmunoensayo la especificidad requerida para la medición inequívoca de CCK-4 y CCK-8s en diversos tipos de muestras biológicas.

Como era de esperarse, mediante el uso de estos anticuerpos fue posible la detección y cuantificación de CCK-4/CCK-8s en muestras biológicas encontrándose valores para la corteza cerebral de la rata que comparan con los obtenidos en otros laboratorios. (Larsson & Rehfeld, 1979; Beinfeld, et.al., 1981; Emson, et.al., 1982; Bandopadhyay & deBelleruche, 1995). Asimismo, fue también posible estimar la concentración de CCK-4/CCK-8s en muestras de líquido cefalorraquídeo del mismo animal con valores similares también a los reportados en la literatura (Geracioti, et.al., 1993; You, et.al., 1994; Xiao-Jun, et.al., 2001).

En conjunto los resultados obtenidos en este trabajo nos llevan a sugerir que los anticuerpos producidos y el radioinmunoensayo implementado mediante su uso, pueden ser utilizados para la cuantificación bioquímica de CCK-4/CCK-8s en distintos tipos de material biológico extraídos bajo diferentes condiciones experimentales.

Los esfuerzos por contribuir al conocimiento en torno al sistema CCKérgico deben seguir en todas sus posibles líneas de investigación dada la importancia que esta familia de neuropéptidos tiene para el sistema nervioso central. No será sorprendente que la CCK, al participar en un gran número de vías neuronales, esté también implicada en ciertos desórdenes neurológicos y psiquiátricos que afectan a los humanos y de que en la medida en que nuestro conocimiento de éste sistema neurotransmisor avance, dichos trastornos podrán tratarse de manera más efectiva.

11 Conclusión

Los resultados de este trabajo indican que, bajo las condiciones utilizadas fue posible obtener anticuerpos antiCCK de alta afinidad y especificidad que permitieron montar un radioinmunoensayo adecuado, confiable y de bajo costo, para cuantificar las formas de bajo peso molecular de la CCK en material biológico, tal como el líquido cefalorraquídeo y el tejido cerebral. El método implementado puede ser utilizado con un buen rango de seguridad para la cuantificación bioquímica de CCK-4/CCK-8s en distintos tipos de material biológico. Es posible que los anticuerpos obtenidos, sean también útiles para el diseño de métodos para la visualización inmunohistoquímica de la CCK-4/CCK-8s, en el sistema nervioso de los mamíferos.

11 Bibliografía

1. Bandopadhyay, and deBellerocche, (1995) *Depletion of Cortical Cholecystokinin Levels after Excitotoxin Injection into the Nucleus Basalis: Sensitivity to MK-801* Eur.J.Pharmacol. 275(1):53-59.
2. Becker, C., Hamon, M., and Benoliel, J-J. (1999a) *Prevention by 5-HT_{1A} receptor Agonist of Restraint Stress- and Yohimbine Induced Release of Cholecystokinin in the Frontal Cortex of Freely Moving.* Neuropharmacol. 38(2):525-532.
3. Becker, C., Hamon, M., Cesselin, F. and Benoliel, J-J. (1999b) *δ₂-Opioid Receptor mediation of Morphine-Induced CCK Release in the Frontal Cortex of the Freely Moving Rat.* Synapse 34(1):47-54.
4. Becker, C., Thiébot, M-H., Touitou, Y., Hamon, M., Cesselin, F. and Benoliel, J-J. (2001) *Enhanced Cortical Extracellular Levels of Cholecystokinin-Like Material in a Model of Anticipation of Social Defeat in the Rat.* J. Neurosci. 21(1):262-269.
5. Beglinger, C. and Degen, L. (2004) *Fat in the Intestine as a Regulator of Appetite-Role of CCK.* Physiol. Behav. 83(4):617-621.
6. Beinfeld, M.C. (1998) *Cholecystoquinin* In: Bloom, F.E. and. Kopfer, D.J. (eds.), *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress.* Raven Press, New York, pp 585-594.
7. Beinfeld, M.C. (2003) *Biosynthesis and Processing of ProCCK: Recent Progress and Future Challenges.* Life Sci. 72(7):747-757.
8. Beinfeld, M.C., Meyer, D.K., Eskay, R.L., Jensen, R.T. and Brownstein, M. (1981) *The Distribution of Cholecystoquinin Immunoreactivity in the Central Nervous System of the Rat as Determinated by Radioimmunoassay.* Brain Res. 212: 51-57.
9. Bloom, E.E. and Morales, M. (1998) *The Central 5-HT₃ Receptor in CNS Disorders.* Neurochem. Res. 23(5):653-659.
10. Bradwejn, J. and Koszycki, D. (1994) *The Cholecystokinin Hypothesis of Anxiety and Panic Disorder.* Ann. N.Y. Acad. Sci. 713(1):273-282.
11. Breukel, A., Lopes da Silva, F. and Ghijsen, W. (1997) *Cholecystokinin (CCK-8) Modulates Vesicular Release of Excitatory Amino Acids in Rat Hippocampal Nerve Endings.* Neurosci. Lett. 234:67-70.

12. Bylund, D.B. and Yamamura, H.I. 1990. *Methods for Receptor Binding*. In: Yamamura, H.I., Enna, S.J. and Kuhar, M.J. (eds), *Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis*. Raven Press, New York, pp 1-35.
13. Cantor, C. and Rehfeld, J.F. (1985). *Radioimmunoassay of Cholecystoquinin: Comparison of Different Tracers*. *J. Immunol. Meth.* 82(1):47-55.
14. Crawley, J.N. (1991) *Cholecystokinin-Dopamine Interactions*. *Trends In Pharmacology Sciences* 12(6):232-236.
15. Crawley, J.N. and Corwin, R.L. (1994) *Biological Actions of Cholecystokinin Peptides* 15(4):731-755.
16. Daugé, V. and Léna, I. (1998) *CCK in Anxiety and Cognitive Processes*. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22(6): 815-825.
17. de Araujo, L-G., Alster. P. Brodin, E. and Wiesenfeld-Hallin, Z. (1998) *Differential Release of Cholecystokinin by Morphine in Rat Spinal Cord*. *Neurosci. Lett.* 245(1):13-16.
18. De Wied, D. and Sigling, H.O. (2002) *Neuropeptides Involved in the Pathophysiology of Schizophrenia and Major Depression*. *Neurotox. Res.* 4(5-6):453-468.
19. Dockray, G.J. (1977) *Immunoreactive Component Resembling Cholecystokinin Octapeptide in Intestine*. *Nature (London)* 270(1):359-361.
20. Dockray, G.J. (1980) *Cholecystokinin in Rat Cerebral Cortex: Identification, Purification and Characterization by Immunochemical Methods*. *Brain Res.* 188(1):155-165.
21. Eberlein, G.A., Eysselein, V.E., Davis, M.T., Lee, T.D., Shively, J.E., Grandt, D., Niebel, W., Williams, R., Moessner, J., Zeeh, J., Meyer, H.E., Goebell, H. and Reeve, J. Jr. (1992) *Patters of Prohormone Processing. Order Revealed by a New Procholecystokinin-Derived Peptide*. *J. Biol. Chem.* 267(3):1517-1521.
22. Emson, P.C., Rehfeld, J.F. and Rossor, M.N. (1982) *Distribution of Cholecystokinin-Like Peptides in the Human Brain*. *J. Neurochem.* 38(4):1177-1179.
23. Ferraro, L., O'Connor, W.T., Li, X-M., Rimondini, R., Beani, L., Ungerstedt, U. Fuxe, K. and Tanganelli, S. (1996) *Evidence for a Differential Cholecystokinin-B Receptor and -A Receptor Regulation of GABA Release in the Rat Nucleus Accumbens Mediated Via Dopaminergic and Cholinergic Mechanisms*. *Neurosci.* 73(4):941-950.

24. Fink, H., Rex, A., Voits, M. and Voigt, J.P. (1998) *Major Biological Actions of CCK a Critical Evaluation of Research Findings*. Exp. Brain Res. 123(1-2):77-83.
25. Ganellin, R.C., Bishop, P.B., Bambal, R.B., Chan, S.M.T., Law, J.L., Marabout, B., Lutra, P.M., Moore, A.N.J., Peschard, O., Bourgeat, P.B., Rose, C., Vargas, F. and Schwartz. (2000) *Inhibitors of Tripeptidyl Peptidase II. 2. Generation of the First Novel Lead Inhibitor of Cholecystokinin-8-Inactivating Peptidase: A Strategy for the Design of Peptidase Inhibitors*. J. Med. Chem. 43(4):664-674.
26. Ge, J., Long, S.K. and Kilpatrick, I.C. (1998) *Preferential Blockade of Cholecystokinin-8S- Induced Increases in Aspartate and Glutamate Levels by CCK_B Receptor Antagonist, L-365,260, in Rat Brain*. Eur. J. Pharmacol. 345(2):163-170.
27. Geary, N. (2001) *Estradiol, CCK and Satiation*. Peptides 22(1):1251-1263.
28. Gemignani, A., Paudice, P., Bonanno, G. and Raiteri, M. (1994) *Pharmacological Discrimination Between γ -Aminobutyric Acid Type B Receptors Regulating Cholecystokinin and Somatostatin Release from Rat Neocortex Synaptosomes*. Molecular Pharmacol. 46(1):558-562.
29. Geraciotti, T.D., Nicholson, W.E., Orth, D.N., Ekhtor, N.N. and Loosen, P.T. (1993) *Cholecystokinin in Human Cerebrospinal Fluid: Concentrations, Dynamics, Molecular Forms and Relationship to Fasting and Feeding in Health, Depression and Alcoholism*. Brain Res. 629 (2):260- 268.
30. Ghijsen, W.E., Leenders, M. A. and Wiegant, V.M. (2001) *Regulation of Cholecystokinin Release from Central Nerve Terminals*. Peptides 22(1):1213-1221.
31. Goldman, J. and Côté, L. (1991) *Aging of the Brain: Dementia of the Alzheimer's Type* In: Kandel, R.E., Schwartz, H.J and Jessell, M.T. (eds), Principles of Neural Science. 3^a ed. Prentice Hall International. USA. 974-983 pp
32. Goltermann, N.R., Rehfeld, J.F. and Roigaard-Petersen, H. (1980) *In vivo Biosynthesis of Cholecystokinin in Rat Cerebral Cortex*. J. Biol. Chem. 255(13):6181-6185.
33. Gracey, D.J., Bell, R. and King, D.J. (2002) *Differential Effects of the CCK-A Receptor Ligands PD-140,548 and A-71623 on Latent Inhibition in the Rat*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 26(3):497-504.
34. Gulpinar, M.A. and Yegen, B.C. (2004) *The Physiology of Learning and Memory: Role of Peptides and Stress*. Curr. Protein. Pept. Sci. 5(6):457-473.

35. Gustafsson, H., de Araujo, L.G., Schött, E., Stiller, C-O., Alster. P., Wiesenfeld-Hallin, Z. and Brodin, E. (1999) *Measurement of Cholecystokinin Release in vivo in the Rat Spinal Dorsal Horn*. Brain research protocols 4(1):192-200.
36. Hadjiivanova, C., Belcheva, S. and Belcheva, I. (2003) *Cholecystokinin and Learning and Memory processes*. Acta Physiol. Pharmacol. Bulg. 27(2-3):83-88.
37. Hernández-Gómez, A.M., Aguilar-Roblero, R. and Pérez de la Mora, M. (2002) *Role of Cholecystokinin-A and Cholecystokinin-B receptors in Anxiety*. Amino Acids (23):283-290.
38. Hebb, A.L., Zacharko, R.M., Domínguez, H., Laforest, S., Gauthier, M., Lezac, C. and Drolet, G. (2003) *Changes in Brain Cholecystokinin and Anxiety-like Behavior Following Exposure of Mice to Predator Odor*. Neurosci. 116(2):539-551.
39. Hökfeld, T., Blacker, D., Broberger, C., Herrera-Marschitz, M., Snyder, G., Fisone, G., Cortes, R., Morino, P., You, Z.B. and Ögren, S.O. (2002) *Some Aspects on the Anatomy and Function of Central Cholecystokinin Systems*. Pharmacol. Toxicol. 91(6):382-386.
40. Jessell, M.T. and Kelly, D.D. (1991) *Pain and Analgesia* In: Kandel, R.E., Schwartz, H.J and Jessell, M.T. (eds.), Principles of Neural Science. 3^a ed. Ed. Prentice-Hall International. USA. 385-399 pp.
41. Knoche, H.W. (1991) *Radioisotopic Methods for Biological and Medical Research*. Oxford Press, pp 399-413.
42. Lacourse, K.A., Lennart, F-H., Samuelson, L.C. and Rehfeld, J.F. (1998) *Altered Processing of Procholecystokinin in Carboxipeptidase E-deficient Fat Mice: Differential Synthesis in Neurons and Endocrine Cells*. FEBS Lett. 436(1):61-66.
43. Larsson, L-I. and Rehfeld, J.F. (1979) *Localization and Molecular Heterogeneity of Cholecystokinin in the Central and Peripheral Nervous System*. Brain Res. 165(1):201-218.
44. Lanza, M. and Makovec, F. (2000) *Cholecystokinin (CCK) Increases GABA Release in the Rat Anterior Nucleus Accumbens Via CCK_B Receptors Located on Glutamatergic Interneurons*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 361(1):33-38.
45. Liddle, R. (1998) *On the measurement of Cholecystokinin*. Clinical Chemistry 44(5):903-904,
46. Löfberg, C., Harro, J., Gottfries, C.G. and Orelund, L. (1996) *Cholecystokinin peptides and receptor binding in Alzheimer's disease*. J. Neural. Transm. 103(1):851-860.

47. Maidment, N.T. and Villafranca, N.P. (1997) *Persistence of the Releasable Pool of CCK in the Rat Nucleus Accumbens and Caudate-Putamen Following Lesions of the Midbrain*. Brain. Res. 747(2):290-296.
48. Maidment, N.T., Siddall, B.J., Rudolph, V.R., Erdelyi, E. and Evans C.J. (1991) *Dual Determination of Extracellular Cholecystinin and Neurotensin Fragments in Rat Forebrain: Microdialysis Combined with a Sequential Multiple Antigen Radioimmunoassay*. Neuroscience 45(1):81-93.
49. Marley, P.D. and Rehfeld, J.F. (1984) *Extraction Techniques for Gastrins and Cholecystokinins in the Rat Central nervous System*. J. Neurochem. 42:1515-1522.
50. McClane, G. (2004) *Cholecystinin Antagonists a New Way to Improve the Analgesia from Old Analgesics*. Curr. Pharm. Des. 10(3):303-314.
51. Merani, S., Palmour, R.M., Bradwejn, J., Berezowska, I., Vaccarino, F.J. and Gutkowska, J. (1997) *Development of a Sensitive and Specific Assay System for Cholecystinin Tetrapeptide*. Peptides 18(6):869-875.
52. Miller, K.K., Hoffer, A., Svoboda, K.R. and Lupica, C.R. (1997) *Cholecystinin Increases GABA Release by Inhibiting a Resting K⁺ Conductance in Hippocampal interneurons*. J. Neurosci. 17(3):4994-5003.
53. Mollereau, C., Roumy, M. and Zajac, J.M. (2005) *Opioid-Modulating Peptides: Mechanisms of Action*. Curr. Top. Med. Chem. 5(3):341-355.
54. Moran, T.H. (2004) *Gut Peptides in the Control of Food Intake: 30 years of ideas*. Physiol. Behave. 82(1):175-180.
55. Moran, T.H. and Kinzig, K.P. (2004) *Gastrointestinal Satiety Signals II. Cholecystinin*. Am. J. Physiol Gastrointes. Liver Physiol. 286(2):G183-G188.
56. Moran, T.H. and Schwartz, G.J. (1994) *Neurobiology of Cholecystinin*. Crit. Rev. Neurobiol. 9(1):1-28.
57. Noble, F., and Roques, B. (1999) *CCK-B Receptor: Chemistry, Molecular Biology, Biochemistry and Pharmacology*. Progress in Neurobiology. 58(2):349-379.
58. Noble, F., Wank, S.A., Crawley, J., Bradwejn, J., Seroogy, K., Hamon, M, and Roques, B. (2000) International Union of Pharmacology. XXI. *Structure, Distribution and Functions of Cholecystinin Receptors* Pharmacol. Rev. 51(4):745-781.

59. Ossipov, M.H., Lai, J., King, T., Vanderah, T.W., Malan, T.P.Jr., Hruby, V.J. and Porreca, F. (2004) *Antinociceptive and Nociceptive Actions of Opioids*. J. Neurobiol. 61(1):126-148.
60. Pérez de la Mora, M., Hernández-Gómez, A-M., Méndez-Franco, J. and Fuxe, K. (1993) *Cholecystokinin-8 Increases K⁺-evoked (³H) γ - aminobutyric acid Release in Slices from Various Brain Areas*. Eur. J. Pharmacol. 250:423-430.
61. Pérez de la Mora, M. (2003) *Dónde y cómo se produce la ansiedad: sus bases biológicas*. CIENCIA 54(2):16-28.
62. Radu, D., Brodin, E., Weber, G. and Lindefors, N. (2001) *Delayed stress-induced in tissue level of Cholecystokinin in rat prefrontal cortex: modulation by microdialysis probe implantation and systemic ketamine*. Brain Res. 908(2):197-203.
63. Raitieri, M., Paudice, P. and Vallebuona, F. (1993) *Release of Cholecystokinin in the Central Nervous System*. Neurochem. Int. 22(6):519-527.
64. Rasmussen, K. (1994) *CCK, Schizophrenia, and Anxiety: CCKB Antagonists Inhibit the Activity of Brain Dopamine Neurons*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 713(1):300-311.
65. Rehfeld, J.F. a (1978) *Immunochemical Studies on Cholecystoquinin I. Development of Sequence-Specific Radioimmunoassay for Triacontatriapeptide Cholecystoquinin*. J. Biol. Chem. 253(11):4016-4021.
66. Rehfeld, J.F. b (1978) *Immunochemical Studies on Cholecystoquinin II. Distribution and Molecular Heterogeneity in the Central Nervous System and Small Intestine of Man and Hog*. J. Biol. Chem. 253(11):4022-4030.
67. Rehfeld, J.F. (1998) *Accurate Measurement of Cholecystokinin in Plasma*. Clin. Chem. 44(5):991-1001.
68. Rehfeld, J.F. (2004) *Cholecystokinin: Clinical Endocrinology and Metabolism*. Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 18(4):569-586
69. Rehfeld, J.F., Lindberg, I. and Friis-Hansen, L. (2002) *Increased Synthesis but Decreased Processing of Neuronal proCCK in Prohormone Convertasa 2 and 7B2 Knockout Animals*. J. Neurochem. 83(1):1329-1337.
70. Rehfeld, J.F., Stadil, F. and Rubin, B. (1973) *Production and Evaluation of Antibodies for the Radioimmunoassay of Gastrin*. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 31:459-464.

71. Revel, L., Mennuni, L. Garofalo, P. and Makovec, F. (1998) *CR2945: A Novel CCK-B Receptor Antagonist with Anxiolytic-like Activity*. *Behav. Pharmacol* 9(3):183-194.
72. Rex, A. and Fink, H. (1998) *Effects of Cholecystinin-Receptor Agonists on Cortical 5-HT Release in Guinea Pigs on the X-Maze*. *Peptides* 19(3):519-526.
73. Robberecht, P., Deschodt-Lanckman, M. and Vanderhaeghen, J.J. (1978) *Demonstration of Biological Activity of Brain Gastrin-Like Peptidic Material in the Human: Its Relationship with the COOH-Terminal Octapeptide of Cholecystinin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75(1):524-528.
74. Rose, C., Vargas, F., Facchinetti, P., Bourgeat, P., Bambal, R.B., Bishop, P.B., Chan, S.M.T., Moore, A.N.J., Ganellin, R.C. and Schwartz, J.C. (1996) *Characterization and Inhibition of a Cholecystinin-Inactivating Serine Peptidase*. *Nature* 380(3): 403-409.
75. Rotzinger, S. and Vaccarino, F.J. (2003) *Cholecystinin Receptor Subtypes: Role in the Modulation of Anxiety-related and Reward-related Behaviours in Animal Models* *J Psychiatry Neurosci* 28(3):171-181.
76. Rotzinger, S., Bush, D.E. and Vaccarino, F.J. (2002) *Cholecystinin Modulation of Mesolimbic Dopamine Function: Regulation of Motivated Behavior*. *Pharmacol. Toxicol.* 91(6):404-413.
77. Siniscalchi, A., Rodi, D., Cavallini, S., Marino, S., Ferraro, I., Beani, L. and Bianchi, C. (2003) *Effects of Cholecystinin Tetrapeptide (CCK-4) and Anxiolytic Drug on GABA outflow from the Cerebral Cortex of Freely Moving Rats*. *Neurochem. Int.* 42(1):87-92.
78. Skowsky, W.R. and Fisher, D.A. (1972) *The Use of Thyroglobulin to Induce Antigenicity to Small Molecules*. *J. Lab. Clin. Med.* 80(1):134-144.
79. Strader, A.D. and Woods, S.C. (2005) *Gastrointestinal Hormones and Food Intake*. *Gastroenterology* 128(1):175-191.
80. Tanganelli, S., Fuxe, K., Antonelli, T. O'connor, W.T. and Ferraro, L. (2001) *Cholecystinin/Dopamine/GABA Interactions in the Nucleus Accumbens: Biochemical and Functional Correlates*. *Peptides* 22(1):1229-1234
81. To, T.C. and Bagdy, G. (1999) *Anxiogenic Effect of Central CCK Administration is Attenuated by Chronic Fluoxetine or Ipsapirone Treatment*. *Neuropharmacol.* 30(1):279-282.

82. Vanderhaeguen, J.J., Lostra, F., DeMey, J. and Guilles, C. (1980) *Immunohistochemical Localization of Cholecystokinin - and Gastrin -like Peptides in the Brain and Hypophysis of the rat*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77(2):1190-1194.
83. Vanderhaeguen, J.J., Signeau, J.C. and Gepts, W. (1975) *New Peptide in the Vertebrate CNS Reacting with Antigastrin Antibodies*. Nature (London) 257 (October):604-605.
84. van Megen, H.J., Westenberg, H.G., den Boer, J.A. and René, K.S. (1996) *Cholecystokinin in Anxiety*. Eur. Neuropsychopharmacol. 6:263-280.
85. Verhage, M., Ghijsen, W.E., Nicholls, D.G. and Wiegant, V.M. (1991) *Characterization of the Release of CCK-8 from Isolated Nerve Terminals and Comparison with Exocytosis of Classical Transmitters*. J. Neurochem. 56(4):1394-1400.
86. Virgo, L., Humphries, C., Mortimer, A (1995) *Cholecystokinin Messenger RNA Deficit in Frontal and Temporal Cerebral Cortex in Schizophrenia*. Biological Psychiatry, 37(3):694-701.
87. Vishnuvardhan, D. and Beinfeld, M. (2002) *Biosynthesis and Post-Translational Processing of Site-Directed Endoproteolytic Cleavage Mutants of Pro-CCK in AtT-20 Cells*. Biochemistry 41(1):570-578.
88. Voigt, J-P., Sohr, R. and Fink, H. (1998) *CCK-8S Facilitates 5-HT Release in the Rat Hypothalamus*. Pharmacol. Biochem. Behav. 59(1):179-182.
89. Volkoff, H., Canosa, L.F., Unniappan, S., Cerda-Reverter, J.M., Bernier, N.J., Kelly, S.P. and Peter, R.E. (2005) *Neuropeptides and the Control on Food Intake in Fish*. Gen. Comp. Endocrinol. 142(1-2):3-19.
90. Wall, P.M. and Messier, C. (2000) *Concurrent Modulation of Anxiety and Memory*. Behavior. Brain Res 109(2):229-241,
91. Wank, S.A. (1998) *G-Protein-Coupled Receptors in Gastrointestinal Physiology I. CCK Receptors: an Exemplary Family*. Am. J. Physiol. 274: Gastrointest. Liver. Physiol. 37(4): G607-G613,
92. Wang, H., Wong, P.T., Spiess, J. and Zhu, Y.Z. (2005) *Cholecystokinin-2 (CCK-2) Receptor-mediated Anxiety-like Behaviors in Rat*. Neurosci. Biobehav. Rev. 22(3):556-584.
93. Wiertelak, E., Maier, S. and Watkins, L. (1992) *Cholecystokinin Antianalgesia: Safety Cues Abolish Morphine Analgesia*. Science 256(5):830-833.

94. Wiesenfeld-Hallin, Z., de Araújo, L.G., Alster, P., Xiao-Ju, X. and Hökfelt, T. (1999) *Cholecystoquinin/Opioid Interactions*. Brain Res. 848(2):78-89.
95. Woodruff, G.N. and Hughes, J. (1991) *Cholecystokinin Antagonists*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 31: 469-501.
96. Xiao-Jun, X., Alster, P., Wei-Ping, W., Jig-Xia, H. and Wiesenfeld-Hallin, Z. (2001) *Increased level of Cholecystokinin in cerebral fluid is associated with chronic pain-like behavior in spinally injured rats*. Peptides 22(1):1305-1308.
97. You, Z-B., Herrera-Marschitz, M., Brodin, E., Meana, J.J., Morino, P., Hökfelt, T., Silveira, R., Goiny, M. and Ungerstedt, U. (1994) *On the Origin of Striatal Cholecystokinin Release: Studies with in vivo Microdialysis*. J. Neurochem. 62(1):76-85.
98. You, Z-B., Herrera-Marschitz, M., Pettersson, E., Nylander, I., Goiny, M., Shou, H-Z, Kehr, J., Godukhin, O., Hökfelt, T., Terenius, L. and Ungerstedt, U. (1996) *Modulation of Neurotransmitter Release by Cholecystokinin in the Neostriatum and Substantia Nigra of the rat; Regional and Receptor Specificity*. Neuroscience 74(3):793-804.
99. You, Z-B., Godukhin, O., Goiny, M., Nylander, I., Ungerstedt, U., Terenius, L., Hökfelt, T. and Herrera-Marschitz, M. (1997) *Cholecystokinin-8s Increases Dynorphin B, Aspartate and Glutamate Release in the Fronto-parietal Cortex of the rat Via Different Receptor Subtypes*. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 355:576-581.
100. You, Z.B., Tzschentke, T.M., Brodin, E. and Wise, R.A. (1998) *Electrical Stimulation of the Prefrontal Cortex Increases Cholecystokinin, Glutamate and Dopamine Release in the Nucleus Accumbens: an In vivo Microdialysis Study in Freely Moving Rats*. J. Neurosci. 18(16): 6492-6500.