

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA**

**Facultad de Veterinaria**

**Departamento de Fisiología**



**PAPEL DE LA VÍA DE LAS TIROSINAS CINASAS EN EL  
PÁNCREAS EXOCRINO**

**Ana Isabel Lajas Petisco  
Cáceres, Diciembre 1998**

Edita: Universidad de Extremadura

Servicio de Publicaciones

c/ Pizarro, 8

Cáceres 10071

Correo e.: [publicac@unex.es](mailto:publicac@unex.es)

<http://www.pcid.es/public.htm>

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA**

**Facultad de Veterinaria**

**Departamento de Fisiología**



**PAPEL DE LA VÍA DE LAS TIROSINAS CINASAS EN EL  
PÁNCREAS EXOCRINO**

Memoria presentada por **Dña. Ana Isabel Lajas Petisco** para optar  
al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad de  
Extremadura

Cáceres, Diciembre 1998





UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Campus Universitario  
Avenida de la Universidad, s/n  
10071 - CÁ CERES  
Teléfono: (927) 25 71 00  
Fax: (927) 25 71 54

FACULTAD DE VETERINARIA

D. JOSÉ ANTONIO PARIENTE LLANOS, Profesor Titular de Universidad y  
Dña. MARÍA JOSÉ POZO ANDRADA, Catedrática de Escuela Universitaria, del  
Departamento de Fisiología de la UEX

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, presentada por Dña. Ana Isabel Lajas Petisco, con el título: “Papel de la vía de las tirosinas cinasas en el páncreas exocrino” ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Fisiología de la UEX, y entendiendo que se halla finalizada y que reúne los requisitos de originalidad, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente en Cáceres, a veinte de noviembre de mil novecientos noventa y ocho.

Fdo. José A. Pariente Llanos

Fdo. M<sup>a</sup> José Pozo Andrada



Este trabajo ha sido realizado con cargo al Proyecto de Investigación subvencionado por la DGICYT (PB94-1416-CO2-O2) y con la ayuda de una beca de Formación y Perfeccionamiento de Personal Investigador concedida por la Consejería de Educación y Juventud de la Junta de Extremadura.



## *Agradecimientos*



La redacción de la presente memoria es el fin de un largo proceso en el que, directa e indirectamente, han participado numerosas personas a las que me gustaría dedicarles mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Ginés Salido, quien me brindó la oportunidad de integrarme en este estupendo grupo de trabajo, y quien siempre me ha animado a seguir adelante

A mis directores de Tesis, José Antonio y Ché, por todo el tiempo que habéis invertido en mi formación. Gracias a vuestra ayuda, confianza y amistad habéis hecho posible la finalización de este trabajo. Pero no sólo eso, vuestro cariño ha sido lo más importante para mí.

A Luis y Pedro, por su infinita paciencia conmigo y por no haber puesto nunca una mala cara ante mis insistentes peticiones de ayuda para resolver problemas con esas máquinas tan útiles y “malvadas” que son los ordenadores.

A todos mis compañeros de laboratorio: Antonio, Juan Antonio, Cristina, José Antonio, las “chicas de enfermería” Sole y Sara y a los nuevos fichajes Martín, Virginia y Alberto. ¡Cuánto tiempo trabajando juntos y contándonos nuestros problemas!. Vuestro compañerismo, amistad y apoyo me han ayudado mucho. Y a Merceditas por los excelentes ratos pasados delante de un café. Gracias a todos por los buenos momentos pasados juntos.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria por la facilidad prestada en el uso de sus instalaciones, sin las cuales parte del presente trabajo experimental no hubiera podido llevarse a cabo.

A mis amigos Mati, Pache, Javichi y Ana, sin olvidar a Coco, porque vuestro apoyo ha sido muy importante para mí.

A mis padres, mis hermanas y mi abuelita, mi familia, gracias por haberme dado la oportunidad de hacer lo que me gusta y por alentarme y apoyarme siempre. La finalización de esta memoria os la debo en gran medida a vosotros.

A todos y cada uno de vosotros GRACIAS.

Pero esta Tesis está dedicada a la persona que más me ha ayudado y que ha tenido que soportar con más paciencia mis malos momentos, principalmente durante la finalización de este manuscrito, a JOSE, mi nueva familia. Gracias por darle a mi vida un sentido pleno.



*A Jose*

*A mi familia*



## *Abreviaturas*



8-Br-AMPC: 8- bromo-adenosina monofosfato cíclica  
AA: Ácido araquidónico  
AC: Adenilato ciclase  
ACh: Acetilcolina  
AF: Ácido fosfatídico  
aFGF: Forma ácida del factor de crecimiento de fibroblastos  
AMPc: Adenosina monofosfato cíclica  
ANOVA: Análisis de la varianza  
bFGF: Forma básica del factor de crecimiento de fibroblastos  
BSA: Albúmina sérica bovina  
Ca<sup>2+</sup>: Ion calcio  
[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: Concentración intracelular de calcio  
[Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>: Concentración extracelular de calcio  
CCE: Entrada capacitativa de calcio  
CCK: Colecistocinina  
CCK-8: Octapéptido de colecistocinina  
CCK<sub>A</sub>: Receptor de la CCK tipo A  
CCK<sub>B</sub>: Receptor de la CCK tipo B  
CICR: Liberación de calcio inducida por calcio  
CIF: Factor de influx de calcio  
CRAC: Corrientes de activadas por la liberación de calcio  
CRANC: Corrientes no selectivas activadas por la liberación de calcio  
DAG: 1,2-Diacilglicerol  
EDTA: Ácido etilén diamino tetraacético  
EEM: Error estándar de la media  
EGF: Factor de crecimiento epidermal  
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidermal  
EGTA: Ácido etilén glicol-bis(β-aminoetiléter)N,N',N' tetraacético  
FAK: Tirosina cinasa de adhesión focal  
FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos  
GAP: Proteínas activadoras de las GTPasas  
GMPc: Guanosina monofosfato cíclica

HEPES: Ácido N-[Hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico]  
HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos  
IBMX: 3-Isobutil-1-metilxantina  
IGF: Factor de crecimiento similar a insulina  
IP3. Inositol-1,4,5-trifosfato  
JMV-180: Boc-Tyr(SO<sub>3</sub>H-Nle-Gly-Trp-Nle-Asp-2-feniletil éster  
Kd: Constante de disociación  
MAP: Proteínas asociadas a los microtúbulos. Proteínas acitvadas por la mitogénesis  
NO: Óxido nítrico  
PACAP: Polipéptido de la pituitaria activador de la adenilato ciclasa  
PC: Fosfatidilcolina  
PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas  
PHI: Péptido histidina-isoleucina  
PI3-cinasa: Fosfatidilinositol 3 cinasa  
PIP2: Fosfatitilinositol-4,5-bifosfato  
PKA: Proteína cinasa A  
PKC: Proteína cinasa C  
PKII: Proteína cinasa II  
PLA: Fosfolipasa A  
PLC: Fosfolipasa C  
PLD: FosfolipasaD  
PP: Polipéptido pancreático  
RER: Retículo endoplasmático rugoso  
RPI: Respuesta porcentual integrada  
SDS: Lauril sulfato sódico  
SNC: Sistema nervioso central  
TGF: Factor de crecimiento transformante  
TPA: 13, Acetato de 12, O-tetradecanoil forbol  
TPS: Tapsigargina  
VIP: Polipéptido intestinal vasoactivo

## *Índice*



<b>1.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>2.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.- Anatomía General y Estructura del Páncreas.....</b>	<b>7</b>
2.1.1.- EL ACINO PANCREÁTICO.....	8
2.1.2.- LA CÉLULA CENTROACINAR .....	9
2.1.3.- EL SISTEMA DUCTULAR .....	9
<b>2.2.- Control de la Secreción Pancreática Exocrina.....</b>	<b>11</b>
2.2.1.- CONTROL NERVIOSO.....	11
2.2.1.1.- <i>Inervación colinérgica</i> .....	11
2.2.1.2.- <i>Inervación adrenérgica</i> .....	12
2.2.1.3.- <i>Inervación peptidérgica</i> .....	13
2.2.2.- CONTROL HUMORAL.....	14
2.2.2.1.- <i>Secretina y péptidos relacionados</i> .....	14
2.2.2.2.- <i>Colecistocinina</i> .....	16
2.2.2.3.- <i>Otras hormonas y factores reguladores</i> .....	18
<b>2.3.- Mecanismos de Acoplamiento Estímulo-Secreción en el Páncreas Exocrino.....</b>	<b>22</b>
2.3.1.- SEÑALES DE TRANSMEMBRANA .....	22
2.3.1.1.- <i>Proteínas G</i> .....	22
2.3.1.2.- <i>Efectores de membrana</i> .....	24
2.3.2.- MENSAJEROS INTRACELULARES.....	25
2.3.2.1.- <i>Inositol 1,4,5-trifosfato</i> .....	25
2.3.2.2.- <i>1,2 diacilglicerol</i> .....	27
2.3.2.3.- <i>Calcio intracelular</i> .....	28
2.3.2.4.- <i>Nucleótidos cíclicos</i> .....	42
2.3.2.5.- <i>Otros mensajeros intracelulares</i> .....	45

2.3.3.- ACCIONES DE LOS MENSAJEROS INTRACELULARES: EFECTORES .....	46
2.3.3.1.- <i>Proteína cinasa C</i> .....	46
2.3.3.2.- <i>Proteínas cinasas activadas por nucleótidos cíclicos</i> .....	47
2.3.3.3.- <i>Proteínas cinasas y fosfatasas activadas por Ca<sup>2+</sup>-calmodulina</i> ....	48
2.3.3.4.- <i>Proteína fosfatidilinositol 3'-cinasa</i> .....	49
<b>2.4.- Vía de las Proteínas Tirosinas Cinasas</b> .....	<b>51</b>
2.4.1.- LAS PROTEÍNAS TIROSINAS CINASAS.....	51
2.4.2.- FACTORES DE CRECIMIENTO .....	54
2.4.2.1.- <i>Mecanismo de acción</i> .....	55
2.4.2.2.- <i>Familia del factor de crecimiento epidermal (EGF)</i> .....	57
2.4.2.3.- <i>Familia del factor de crecimiento transformante <math>\beta</math> (TGF<math>\beta</math>)</i> .....	62
2.4.2.4.- <i>Familia del factor de crecimiento similar a insulina(IGF)</i> .....	65
2.4.2.5.- <i>Familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)</i> .....	67
2.4.2.6.- <i>Familia del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)</i> .....	70
2.4.2.7.- <i>Otros factores de crecimiento</i> .....	71
2.4.3.- EFECTOS DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL PÁNCREAS EXOCRINO .....	72
2.4.4.- TIROSINAS CINASAS Y SECRECIÓN .....	76
<b>3.- EFECTO DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE EL PÁNCREAS EXOCRINO: EXPERIMENTOS IN VIVO</b> .....	<b>79</b>
<b>3.1.- Metodología</b> .....	<b>81</b>
3.1.1.- ANIMALES DE ESTUDIO .....	81
3.1.2.- PREPARACIÓN QUIRÚRGICA .....	81
3.1.3.- RECOGIDA DE MUESTRAS Y CONTROL DE PARÁMETROS.....	83
3.1.4.- DISEÑO EXPERIMENTAL .....	83
3.1.4.1.- <i>Animales con tratamiento agudo</i> .....	83
3.1.4.2.- <i>Animales con tratamiento crónico</i> .....	84

3.1.5.- TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS .....	84
3.1.5.1.- <i>Determinación del flujo de jugo pancreático</i> .....	84
3.1.5.2.- <i>Determinación de proteína total</i> .....	85
3.1.5.3.- <i>Determinación de la actividad amilásica</i> .....	85
3.1.5.4.- <i>Análisis del tejido pancreático</i> .....	86
3.1.6.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....	88
<b>3.2.- Resultados</b> .....	89
3.2.1.- RESPUESTAS SECRETORAS AL EGF .....	89
3.2.2.- EFECTOS DEL EGF SOBRE DIFERENTES PARÁMETROS TRÓFICOS .....	95
<b>3.3.- Discusión</b> .....	97
<b>4.- ESTIMULACIÓN DE LA VÍA DE LAS TIROSINAS CINASAS EN EL PÁNCREAS EXOCRINO: EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i></b> .....	99
<b>4.1.- Metodología</b> .....	101
4.1.1.- LISTA DE REACTIVOS Y SOLUCIONES .....	101
4.1.2.- ANIMALES DE ESTUDIO .....	105
4.1.3.- MÉTODO DE AISLAMIENTO DE ACINOS PANCREÁTICOS .....	105
4.1.4.- DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN DE AMILASA .....	106
4.1.5.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR .....	108
4.1.5.1.- <i>Introducción</i> .....	108
4.1.5.2.- <i>Carga con el indicador</i> .....	110
4.1.5.3.- <i>Seguimiento continuo de la fluorescencia en células aisladas</i> .....	111
4.1.5.4.- <i>Análisis digital de la <math>[Ca^{2+}]_i</math></i> .....	111
4.1.6.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO .....	113
<b>4.2.- Resultados de la Estimulación Directa de la Vía de las Tirosinas Cinasas por Factores de Crecimiento</b> .....	115
4.2.1.- EFECTOS DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE LA SECRECIÓN DE AMILASA .....	115

4.2.2.- EFECTOS DE LA COLECISTOCININA SOBRE LA SECRECIÓN BASAL DE AMILASA .....	116
4.2.3.- INTERACCIONES DE LA CCK-8 CON FACTORES DE CRECIMIENTO.....	117
4.2.4.- EFECTO DEL EGF Y DEL bFGF SOBRE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE CALCIO.....	121
4.2.5.- DISCUSIÓN SOBRE LA ESTIMULACIÓN DIRECTA DE LA VÍA DE LAS TIROSINAS CINASAS .....	125
<b>4.3.- Resultados de la Estimulación Indirecta de la Vía de las Tirosinas Cinasa por Inhibidores de las Tirosinas Fosfatasa.....</b>	<b>129</b>
4.3.1.- EFECTOS DEL VANADATO SOBRE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE CALCIO.....	129
4.3.2.- EFECTOS DEL VANADATO SOBRE LA SECRECIÓN DE AMILASA.....	138
4.3.3.- DISCUSIÓN SOBRE LOS EFECTOS DEL VANADATO .....	141
4.3.4.- EFECTOS DEL ÓXIDO DE FENILARSINA (PAO) SOBRE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE CALCIO.....	145
4.3.5.- EFECTOS DEL ÓXIDO DE FENILARSINA SOBRE LA SECRECIÓN DE AMILASA .....	154
4.3.6.- DISCUSIÓN SOBRE LOS EFECTOS DEL ÓXIDO DE FENILARSINA .....	155
4.3.7.- EFECTOS DEL DEFOSTATÍN SOBRE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE CALCIO.....	159
4.3.8.- EFECTOS DEL DEFOSTATÍN SOBRE LA SECRECIÓN DE AMILASA .....	164
4.3.9.- DISCUSIÓN SOBRE LOS EFECTOS DEL DEFOSTATÍN.....	165
<b>5.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>171</b>
<b>6.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>175</b>
<b>7.- ANEXO.....</b>	<b>205</b>

## ***1.- Justificación y Objetivos***



La secreción de jugo pancreático es el resultado fisiológico de la acción de un elevado número de mensajeros intercelulares (fundamentalmente hormonas gastrointestinales, como secretina y CCK, y neurotransmisores como ACh y VIP) que actúan como secretagogos sobre las células acinares y ductulares pancreáticas. Adicionalmente, existen agentes reguladores que pueden modular la secreción pancreática exocrina, entre los que se incluyen histamina, somatostatina, insulina y factores de crecimiento.

Las células acinares del páncreas exocrino se han utilizado muy a menudo como modelo para el estudio del acoplamiento estímulo-secreción. Como consecuencia de estos estudios, parece totalmente aceptada la existencia, en este tipo celular, de dos vías mayoritarias de mensajeros intracelulares: por una parte, la elevación transitoria del calcio libre citoplasmático y la activación de la proteína cinasa C, previa formación de IP<sub>3</sub> y DAG a partir de fosfolípidos de inositol (vía utilizada, por ejemplo, por la CCK y la acetilcolina) y, por otra parte, el incremento de los niveles intracelulares de AMPc y activación de la proteína cinasa A (vía utilizada, por ejemplo, por la secretina y el VIP).

Además de estas vías clásicas, se ha postulado recientemente la existencia de nuevas vías de transducción de señales en diversos tejidos. Una de ellas es la activación de las tirosinas cinasas. Entre los agentes relacionados con la actividad tirosina cinasa están la insulina y los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), los cuales provocan la fosforilación de restos de tirosina. Este mecanismo es uno de los acontecimientos moleculares que preceden a los procesos de división y proliferación celular, si bien se está postulando actualmente que esta vía podría tener un papel modulador de los procesos funcionales en diferentes tipos celulares, principalmente células secretoras y contráctiles. Esto se encuentra además relacionado con evidencias experimentales que demuestran que algunas hormonas clásicas (como la CCK), además de secretagogos, actúan como factores tróficos, induciendo un crecimiento del tejido pancreático al mismo tiempo que activan los procesos secretores. Por otro lado, la utilización de inhibidores específicos de las tirosinas cinasas inhibe la liberación de amilasa estimulada por CCK. Sin embargo, la posible participación de las tirosinas cinasas modulando las respuestas secretoras rápidas provocadas por agonistas extracelulares ha sido menos estudiada. Además, algunos trabajos han demostrado que la administración exógena de EGF parece tener efecto estimulante en el páncreas de rata anestesiada y ratón, habiéndose demostrado la presencia de grandes cantidades de EGF a lo largo del tracto gastrointestinal, y particularmente en el páncreas, donde se llegan a alcanzar concentraciones de 3 µg/g de tejido.

El objetivo general de este trabajo ha sido determinar el papel que la

estimulación de una vía de acoplamiento estímulo-secreción alternativa o complementaria a las ya claramente establecidas, concretamente la vía de las tirosinas cinasas, tiene sobre el páncreas exocrino. Teniendo en cuenta la información bibliográfica existente sobre los aspectos de la fisiología celular en los que participan las proteínas tirosinas cinasas y en particular sobre la fisiología del páncreas exocrino, nos propusimos contestar a los siguientes **objetivos específicos**:

a.- Determinar si la administración de factores de crecimiento a rata anestesiada modifica la actividad secretora del páncreas exocrino.

b.- Determinar si la activación directa de tirosinas cinasas en acinos pancreáticos por factores de crecimiento induce secreción enzimática y si esta activación es el resultado de alteraciones en los depósitos intracelulares de calcio.

c.- Determinar si la activación indirecta de la vía de las tirosinas cinasas, mediante el uso de inhibidores de tirosinas fosfatasas, está implicada en los procesos secretores y de movilización de calcio.

Para ello se han utilizado ratas Wistar anestesiadas y células acinares pancreáticas de esta misma especie animal.

Previamente al diseño experimental, se realizó una amplia revisión bibliográfica, que se ha ido actualizando a lo largo de los 4 años dedicados a desarrollar esta Tesis Doctoral. Los métodos empleados también se describen ampliamente y el resto de la memoria lo constituyen los resultados obtenidos, la discusión de los mismos y un breve capítulo dedicado a las conclusiones.

## ***2.- Antecedentes Bibliográficos***



## 2.1 Anatomía general y estructura del páncreas.

---

El páncreas es una glándula túbulo-acinar compuesta que está situada en la región craneal de la cavidad abdominal. Se localiza generalmente detrás del estómago, en una posición metaperitoneal, extendiéndose desde el bazo hasta las asas duodenales.

El páncreas de la rata presenta una estructura difusa de color rosado. En esta especie, el peso de la glándula oscila entre 550 mg (ratas de 100 g de peso) y 1 gramo (para ratas de 300 g de peso) (Hebel y Stromberg, 1976). El tejido pancreático está recubierto por una fina capa de tejido conectivo laxo del cual parten septos hacia el interior de la glándula dividiéndola en pequeños lóbulos.

El aporte sanguíneo del páncreas viene dado por las arterias celíaca y mesentérica craneal; de éstas parten ramas que se subdividen en pequeños vasos que irrigan el tejido introduciéndose adyacentes a los conductos y túbulos pancreáticos. El drenaje venoso se realiza a través de las venas mesentérica craneal y celíaca que desembocan en la vena porta y en la vena esplénica (Gorelick y Jamieson, 1987). El sistema linfático del páncreas drena al linfocentro celíaco, que agrupa a los ganglios linfáticos esplénicos y pancreaticoduodenales (Sandoval, 1975).

El conducto por el que se excretan los productos de secreción elaborados por las células pancreáticas en la rata, el conducto pancreático-biliar común, se extiende a lo largo de la glándula ramificándose en cortos conductos interlobulares donde cada lóbulo vierte los productos de la secreción. Los conductos interlobulares se subdividen en conductos intralobulares que a su vez emiten un gran número de ramas intercalares que llegan hasta los acinos pancreáticos (Susumu, 1977). Así, el árbol que forman los conductos pancreáticos y que sólo representa un 2% del volumen total del páncreas de la rata (Githens, 1988), desempeña un papel de soporte estructural del tejido pancreático, además de su función de conducción de las secreciones enzimática y fluida al duodeno. Los productos de la secreción del páncreas son transportados por el conducto pancreático hasta el duodeno, donde participan en la digestión enzimática de las proteínas, grasas y carbohidratos.

Desde el punto de vista funcional, el páncreas es una glándula mixta, constituida por una porción endocrina y una exocrina, la cual representa la mayor parte del tejido (84%). Los conductos pancreáticos y vasos sanguíneos representan el

4% del volumen total del páncreas, mientras que la porción endocrina constituye tan sólo el 2% aproximadamente. El resto, un 10%, lo constituye la matriz extracelular (Gorelick y Jamieson, 1987). Las funciones exocrina y endocrina las llevan a cabo diferentes grupos de células. Las enzimas digestivas y el jugo pancreático son elaborados en las células acinares y ductulares respectivamente. Los conductos pancreáticos, además de constituir el sistema de conducción de las enzimas digestivas, participan en la elaboración del jugo pancreático, aportando el componente fluido y electrolítico (Schulz, 1981; Case y Argent, 1989).

La porción endocrina del páncreas está constituida por los islotes de Langerhans y se encarga de la fabricación de hormonas que van a participar en el metabolismo de los hidratos de carbono. Estos islotes son grupos de células que están distribuidos por todo el tejido pancreático y rodeados por las células exocrinas (Chey, 1993) y los productos por ellos elaborados entran en la circulación sanguínea.

Aunque durante mucho tiempo se ha considerado que el páncreas exocrino está organizado en verdaderas unidades acinares, y cuando se habla de estructura pancreática nos referimos a esta organización, hay estudios recientes que cuestionan este concepto y sugieren que la unidad funcional del páncreas es, tanto desde el punto de vista morfológico (Akao y cols., 1986) como desde el punto de vista del acoplamiento eléctrico (Petersen, 1982), de mayor tamaño que el acino de 20 a 50 células que se había venido considerando tradicionalmente. La comunicación existente entre las células del páncreas, por medio de las uniones intercelulares o "gap junction", permite que las señales que se han originado en una célula se propaguen al resto de la población celular. La ventaja de este fenómeno es la posibilidad de que se generen respuestas secretoras mayores que si solamente se estimulase un número limitado de células acinares.

Dado que el presente estudio está destinado a investigar las vías relacionadas con la secreción pancreática exocrina, nos centraremos a continuación en la descripción de la estructura del páncreas exocrino.

### ***2.1.1 El acino pancreático.***

Se considera que la subunidad básica del páncreas exocrino es el acino, agrupación de células secretoras dispuestas alrededor de un espacio o luz acinar y rodeadas de una matriz de tejido conectivo. Este tejido conectivo se continúa con aquel que rodea el epitelio de los conductos.

La mayoría de las células en el acino son las células acinares, existiendo un número reducido de las denominadas células centroacinares que marcan el comienzo del sistema de conducción de la glándula. Al microscopio óptico las células acinares

presentan una forma piramidal con el vértice dirigido hacia la luz del acino, cuyo diámetro varía en función de la actividad secretora, siendo menor cuando el acino está en reposo (Bloom y Fawcett, 1981).

Dentro de la célula acinar existe un cierto grado de especialización. Los gránulos de zimógeno se localizan en el polo apical del citoplasma y su número varía en función del grado de desarrollo y el grado de estimulación por agentes neurohormonales (Gorelick y Jamieson, 1987; Schulz, 1987). El área existente entre el núcleo de la célula, que está situado en el polo basal, y el polo apical, que es la zona en la que se localiza el complejo de Golgi, tiene un aspecto pálido cuando se observa al microscopio. Finalmente existe una tercera zona que se caracteriza por ser intensamente basófila y que se localiza en la región basal de la célula, estando ocupada por el retículo endoplasmático rugoso (RER). En el citoplasma también encontramos mitocondrias que en ocasiones están secuestradas entre los elementos que forman el retículo y a lo largo de la membrana celular. Algunas de las vacuolas del complejo de Golgi contienen un material de densidad intermedia, mientras que existen otras con un contenido similar al de los gránulos de zimógeno; estos elementos se denominan vacuolas de condensación que se encuentran en estadios de transición dentro del proceso de formación de los gránulos de zimógeno.

### ***2.1.2 La célula centroacinar.***

Son las células que marcan el inicio del sistema ductular. Son de menor tamaño que las células acinares, su citoplasma carece de gránulos de zimógeno y presenta pocas cisternas del retículo endoplasmático (Gorelick y Jamieson, 1987). A medida que nos adentramos en el árbol ductular estas células se van haciendo más cilíndricas y aparece en su citoplasma un mayor número de vesículas.

Se cree que la principal función de las células centroacinares es participar en la secreción de fluido y electrolitos, predominantemente bicarbonato (Mizuhira y cols., 1972). Spicer y cols (1982) han demostrado la existencia de anhidrasa carbonica en la célula centroacinar. También se ha observado en estas células la secreción de glicoproteínas de alto peso molecular (Case y Argent, 1993).

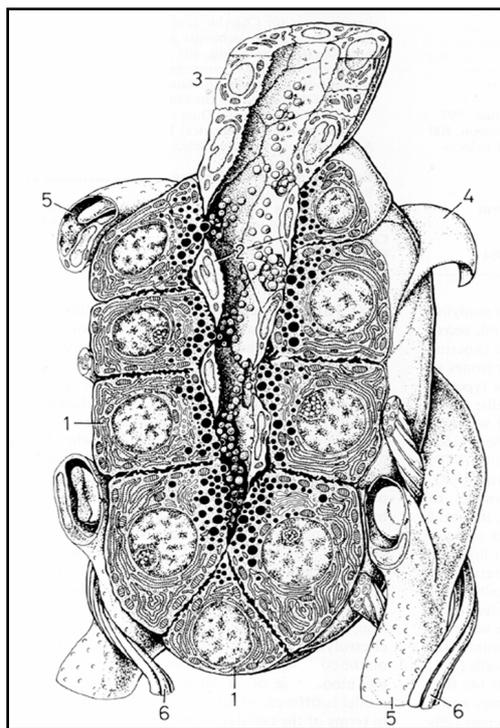
### ***2.1.3 El sistema ductular.***

El sistema ductular es el principal responsable de la secreción de bicarbonato, iones y agua (Schulz, 1981) y de conducir las enzimas digestivas secretadas por las células acinares hacia el duodeno (Case y Argent, 1989). También actúa como soporte estructural para la porción acinar.

Está constituido por conductos excretores que se originan en el acino, desde donde forman un sistema ramificado en el que se diferencian distintos segmentos. De menor a mayor calibre se encuentran sucesivamente los siguientes conductos: intercalares, intralobulares, interlobulares o extralobulares y colectores (Poirier, 1985). Estos últimos desembocan en el conducto pancreático principal en el hombre y en el colédoco en la rata (Schulz, 1987; Hebel y Stromberg, 1976).

La estructura de la célula ductular es muy similar a la de la célula centroacinar. Ambas presentan microvellosidades en el borde libre. Sin embargo, la membrana basolateral, lisa en las células centroacinares, presenta interdigitaciones en los conductos intralobulares (Kern, 1986). El citoplasma de la célula ductular parece cuasivacío, en contraste con el de la célula acinar. Presenta pocas mitocondrias, un aparato de Golgi poco desarrollado y un pequeño RER.

Los conductos pancreáticos están rodeados por una densa capa de tejido conectivo. Por este tejido discurren arterias, venas, vasos linfáticos y células nerviosas del sistema simpático (Kern, 1986). El conjunto de acinos con sus conductos intercalares e intralobulares constituyen un lóbulo o lobulillo pancreático, que se encuentran separados entre sí por tejido conectivo (Bockman, 1993).



**Figura I:** *Esquema de un acino pancreático:*

**1** Célula acinar. **2** Célula centroacinar. **3** Células de los conductos intercalares. **4** Membrana basal. **5** Capilares sanguíneos. **6** Fibra nerviosa.

Tomado de *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 1987. Second Edition. Electrolyte and fluid secretion in the exocrine pancreas. Schulz I. Pp 1147-1171.

## 2.2 Control de la secreción pancreática exocrina.

---

La secreción pancreática exocrina está controlada por medio de factores nerviosos y humorales que van a coordinar la actividad secretora del páncreas. Estos factores, que se han denominado primeros mensajeros, actúan sobre sus receptores localizados en la membrana de las células pancreáticas, activándolos y generando señales intracelulares que conducen a toda una cadena de acontecimientos bautizada por Douglas en 1968 con el nombre de "acoplamiento estímulo-secreción" que, en última instancia, desencadenan una respuesta celular. Estos primeros mensajeros interactúan entre sí pudiendo tener funciones tanto estimuladoras como inhibitoras, así como moduladoras, de la secreción pancreática exocrina.

### 2.2.1 Control nervioso.

La inervación del páncreas tiene dos implicaciones importantes en la fisiología de la glándula. La primera es la regulación de la secreción pancreática y la segunda tiene relación con la patogénesis del dolor, característica en los procesos de inflamación y carcinogénesis.

Esta inervación es compleja, recibiendo aferencias nerviosas de distinto origen y tipo. Las fibras nerviosas que inervan el páncreas son fundamentalmente parasimpáticas pero también, aunque en menor medida, recibe fibras nerviosas simpáticas (Gorelick y Jamieson, 1987). La inervación parasimpática corre a cargo del tronco ventral del nervio vago (Ribet y cols., 1985). La inervación simpática llega al páncreas por las paredes arteriales, inervando de este modo la red vascular pancreática (Bockman, 1993), de tal manera que los lugares en que se localizan las terminaciones nerviosas pueden concretarse en vasos sanguíneos, células acinares pancreáticas, células ductulares e islotes de Langerhans.

#### 2.2.1.1 Inervación colinérgica.

Numerosos estudios *in vivo* han revelado la importancia de la actuación de agentes colinérgicos sobre la secreción pancreática exocrina. El nervio vago es el principal elemento colinérgico que actúa sobre esta glándula. Debas y Yamagishi (1978) revelaron que existen arcos reflejos que conectan el antro del estómago con el

páncreas. La sección del tronco del vago y la administración de atropina reducen e inhiben, respectivamente, la secreción de proteínas y bicarbonato. Pero este fenómeno varía de unas especies animales a otras, existiendo diferente sensibilidad a la administración de atropina (Case y Argent, 1989), así como diferencias en la mayor o menor concentración de proteínas y bicarbonato en la secreción producida en respuesta a la estimulación vagal (Salido y cols., 1982). En estudios realizados en ratas anestesiadas, la estimulación eléctrica del nervio vago induce la secreción de proteínas de una manera similar a la que produce la estimulación por colecistocinina (CCK) (Camello y cols., 1993) o secretina (Wisdom y cols., 1994).

La importancia del sistema nervioso parasimpático en el control de la secreción pancreática exocrina se refleja en la localización de receptores muscarínicos en las células acinares, de los cuales se han descrito hasta el momento cinco tipos (M1, M2, M3, M4 y M5) (Peralta y cols., 1987; Barnard, 1988; Bonner y cols., 1988; Receptor nomenclature supplement, 1991). Además, numerosos estudios ponen en evidencia la existencia de receptores muscarínicos en las células acinares pancreáticas de todas las especies estudiadas, incluyendo al hombre, rata, perro, cobaya, ratón, gato y conejo (Gardner y Jackson, 1977; Peikin y cols., 1978; Bommelaer y cols., 1981; Dehaye y cols., 1984; Susini y cols., 1986; Peralta y cols., 1987; Barnard, 1988). El estudio del ARN por Northern blotting indicó que el único receptor presente en células acinares pancreáticas de rata es el M4 (Jensen, 1994), receptor que actualmente se denomina receptor M3 (Waelbroeck y cols., 1996).

Estudios de unión de secretagogos a los receptores muscarínicos realizados con los antagonistas de los mismos marcados radiactivamente [N-metil-3H]escopolamina ([3H]NMS) o [3H]quincilidil benzilato ([3H]QNB) sugieren un único sitio de unión para la mayoría de los antagonistas de los receptores (Dehaye y cols., 1984). Sin embargo, estudios realizados con carbacol demostraron que un modelo con un doble sitio de unión es el que mejor se adapta a los resultados obtenidos. Así, en acinos pancreáticos de rata, Dehaye y cols. (1984) indicaron que el porcentaje de sitios de unión de alta afinidad para el carbacol era el 14% del número total de receptores, siendo los lugares de unión de baja afinidad el 86% restante. Sin embargo, otros estudios sugieren que los receptores de alta afinidad para el carbacol constituyen el 49-52% del total (Asselin y cols., 1987).

### ***2.2.1.2 Inervación adrenérgica.***

Además de la actuación de fibras nerviosas colinérgicas sobre el páncreas exocrino se ha descrito otro tipo de inervación de la glándula que corre a cargo de factores catecolaminérgicos. Diferentes autores han revelado que la sección de los

nervios espláncnicos conduce a un incremento en la secreción, mientras que su estimulación la inhibe (Solomon, 1987; Walsh, 1987). Por tanto se acepta que estas fibras nerviosas tienen un efecto fundamentalmente inhibitorio.

En condiciones de estrés, la secreción del factor liberador de corticotropina en el sistema nervioso central (SNC) estimula las fibras nerviosas simpáticas y conducen a la liberación de noradrenalina (Messmer y cols., 1993), y en consecuencia se produce una disminución en la secreción pancreática. Este fenómeno es probablemente debido a una reducción en el flujo sanguíneo aportado a la glándula, ya que estudios histoquímicos han revelado la presencia de terminaciones adrenérgicas predominantemente asociadas a las estructuras vasculares del páncreas.

Sin embargo, la administración de agonistas adrenérgicos ha conducido a la obtención de resultados muy dispares. Algunos investigadores no encuentran efecto alguno (Kanishi y col., 1990), mientras que otros atribuyen a los receptores  $\alpha$ -1 un papel inhibitorio (Varga y cols., 1990) y a los  $\beta$ -1 un efecto estimulador, que podría estar mediado por la vía de la adenosina 3',5'-monofosfato cíclica (AMPC) (Pearson y cols., 1984; De Dios y cols., 1987). Estos y otros estudios han puesto de manifiesto el papel potencial del sistema nervioso simpático sobre la regulación de la secreción pancreática pudiendo influir tanto en la secreción fluida como en la enzimática (Pearson y cols., 1984).

Finalmente, otros agentes presentes en las fibras catecolaminérgicas, como la dopamina, presentan efectos diversos en función de la especie que se estudie (Solomon, 1987).

### 2.2.1.3 *Inervación peptidérgica.*

Junto con la inervación del sistema nervioso simpático y parasimpático existen evidencias acerca de la presencia de fibras nerviosas peptidérgicas que podrían participar en el control de la secreción pancreática exocrina. Entre los péptidos que se ha sugerido que presentan acciones sobre la secreción pancreática se encuentran la somatostatina, encefalina, polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) y sustancia P (Dockray, 1987). La encefalina inhibe la secreción modulando las rutas colinérgicas (Louie y cols., 1988). La somatostatina tiene distinto efecto en el páncreas exocrino según las especies: en el perro (Boden y cols., 1975) y el hombre (Hanssen y cols., 1977) inhibe competitivamente la acción de la secretina sobre la secreción de fluido y bicarbonato, mientras en el gato y la rata no tiene efecto en la secreción de fluido (Erspamer y cols., 1974). Sin embargo, la somatostatina es un potente inhibidor de la secreción enzimática *in vivo* (Singh y cols., 1988). En la mayoría de los estudios se ha demostrado que la somatostatina provoca una inhibición parcial de la capacidad del

VIP y la secretina para activar la adenilato ciclasa en acinos pancreáticos de rata y cobaya. Este efecto podría estar mediado por la activación de una proteína G de membrana (Jensen y cols., 1989).

El VIP es un polipéptido de 28 aminoácidos que, además de su efecto vasodilatador periférico, al unirse a su receptor en el páncreas produce una respuesta secretora tanto de la secreción fluida como de la enzimática (Jensen, 1994). Sin embargo, a diferencia de la CCK, la activación del receptor del VIP no ocasiona cambios en la biología de la célula a través de la activación de la fosfolipasa C (PLC) (Jensen, 1994).

En el páncreas de cobaya y en la línea celular tumoral de rata AR42J la sustancia P y los péptidos relacionados activan la PLC, incrementando la concentración citosólica de calcio y de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) provocando, por tanto, la secreción enzimática (May y cols., 1978).

### **2.2.2 Control humoral.**

Se ha considerado a la secretina y a la CCK como las principales hormonas que regulan las respuestas del páncreas exocrino a la comida. La llegada del contenido ácido gástrico (quimo) al duodeno conduce a la liberación de estas hormonas por parte de las células especializadas del sistema APDU que se localizan en la mucosa duodenal (Chey, 1993).

#### **2.2.2.1 Secretina y péptidos relacionados.**

Esta hormona intestinal constituye el más potente y eficaz agente estimulador del flujo pancreático y de la secreción de bicarbonato en todas las especies en que se ha probado. En el organismo existe un grupo de hormonas peptídicas con homología estructural, lo que ha dado lugar a la denominada familia de la secretina, constituida por secretina, VIP, glucagón, polipéptido de pituitaria activador de la adenilato ciclasa (PACAP-27 y PACAP-38) y el péptido histidina-isoleucina (PHI) (Case y Argent, 1989).

La secretina es un péptido que presenta dos formas moleculares (27 y 30 aminoácidos) y está presente en el sistema nervioso y en las células endocrinas del duodeno y yeyuno (O'Donohue y cols., 1981). Este péptido se aisló y caracterizó en segmentos proximales del intestino delgado del cerdo (Jorpes y Mutt, 1962).

Los estímulos para su liberación a la circulación sanguínea general durante el proceso de digestión son los ácidos y bases (García, 1989), los productos de hidrólisis de las grasas (Tranberg y cols., 1985) y la bilis (Hannsen, 1980). La secretina actúa

sobre el páncreas exocrino produciendo principalmente un incremento en la secreción fluida y en la de enzimas, presentando estas dos respuestas diferencias interespecíficas (Case y Argent, 1989). Se ha aceptado que sus efectos fundamentalmente se presentan sobre las células ductulares y en menor medida sobre las células acinares pancreáticas, conduciendo al incremento en los niveles citoplasmáticos de adenosina 3',5'-monofosfato cíclica (AMPc) (Jensen y Gardner, 1981). En estas últimas, las células acinares pancreáticas, se han descrito varios receptores para esta hormona. En el caso de la rata se ha llegado a describir hasta 4 tipos de receptores con diferente afinidad (Bissonnette y cols., 1984). Igualmente las células ductulares pancreáticas presentan receptores para esta hormona (Case, 1978).

En acinos pancreáticos, la secretina es capaz tanto de incrementar los niveles de AMPc como de activar la PLC a diferentes concentraciones (Gardner y cols, 1983). Se ha comprobado que existe una interacción entre los efectos secretores de la secretina y de la CCK, así, la estimulación simultánea con ambos péptidos conduce a una potenciación de sus efectos en el páncreas de cobaya, efecto mediado por mecanismos colinérgicos (Alcón y cols., 1996), mientras que en la rata, la administración conjunta de secretina y CCK provoca una disminución de la secreción comparada con la obtenida cuando se administran por separado (Singh y cols., 1992; Camello y Salido, 1993)

El polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) es un péptido constituido por 28 aminoácidos que está presente en intestino, páncreas, glándulas salivales y sistemas nervioso central y periférico (Dockray, 1987). Los factores principalmente implicados en su liberación parecen ser impulsos nerviosos, constituyendo un importante factor en la respuesta vagal de algunas especies como el cerdo (Chey, 1993), aunque también puede ser liberado en respuesta a algunos productos de la digestión (Schaffalitzky y cols., 1977). Sus acciones se concretan en un efecto vasodilatador periférico y, en el páncreas exocrino, producir una respuesta secretora tanto de la fracción fluida del jugo pancreático como de la enzimática (Gardner y Jensen, 1987). Sus receptores se localizan en la membrana celular y puede unirse también a los receptores específicos de la secretina, aumentando la secreción de enzimas a través de una elevación en el nivel de AMPc intracelular (Williams y cols., 1989; Swandito y cols., 1989; Lajas y cols., 1995; Camello y cols., 1997).

A diferencia de lo que ocurre en respuesta a otros agentes humorales como CCK, agentes colinérgicos, bombesina y taquicininas, la activación del receptor del VIP no ocasiona cambios en la biología celular a través de la activación de la PLC (Jensen, 1994).

El glucagón es una hormona implicada en el metabolismo de los hidratos de carbono y es secretado por las células alfa de los islotes de Langerhans. Se ha

encontrado que la administración de grandes dosis de glucagón inhibe la secreción pancreática inducida por la comida o por la perfusión intestinal de aminoácidos o ácido clorhídrico (Pincus y cols., 1948). En otros estudios sus efectos se concretaban en la inhibición tanto de la secreción pancreática de fluidos como de enzimas estimulada por secretina o CCK (Chey, 1993).

El péptido histidina-isoleucina (PHI) presenta sobre la secreción pancreática efectos similares a los del VIP (Dockray, 1987) y se distribuye por neuronas en las que también se localiza el VIP. Se une también a su mismo receptor, si bien con menor afinidad (Williams y cols., 1989).

### 2.2.2.2 *Colecistocinina (CCK).*

La CCK es un péptido originariamente aislado y purificado del intestino delgado del cerdo. Es una hormona de la que se han descrito numerosos tipos moleculares con 4, 5, 8, 12, 21, 33, 39 y 58 aminoácidos, pudiendo o no estar sulfatado el aminoácido situado en posición 7, que es un residuo de tirosina (Marx y cols., 1987). Las células secretoras de CCK se encuentran en todos los vertebrados distribuidas a lo largo del intestino y extendidas por todo el sistema nervioso central y periférico (Walsh, 1987). En estudios posteriores se puso de manifiesto que una parte de su molécula, el heptapéptido C-terminal, poseía por completo la actividad biológica de la hormona, y que el octapéptido C-terminal, por sí mismo, tenía una eficacia diez veces más potente que la CCK (Jensen y cols., 1980).

Su principal efecto sobre el páncreas exocrino consiste en la estimulación de la secreción enzimática (Grossman, 1977), a la vez que aumenta la síntesis de proteínas (Dagorn y cols., 1984) y potencia la secreción de bicarbonato (Solomon, 1994). También se ha demostrado una acción estimulante de la fracción electrolítica de la secreción pancreática. Este último efecto depende de la especie: en el gato no se produce (Brown y cols., 1967), mientras que en el perro (Salido y cols., 1990a), en el conejo (Pariante y cols., 1990b) y en el pollo (Salido y cols., 1986) provoca un aumento en el flujo, aunque menos marcado que el que produce en la secreción de proteínas; en la rata (Singh y cols., 1992; Pozo y cols., 1995), en el ratón (Mangos y cols., 1973) y en el cobaya (Pozo y cols., 1995) el efecto estimulante de la secreción de fluido es mayor incluso que el de la secretina. Concretamente, el páncreas de cobaya se caracteriza por responder a la CCK con una abundante secreción de fluido rico en bicarbonato (Matsumoto y Kanno, 1984). Por otra parte la CCK puede potenciar el efecto de la secretina en el páncreas exocrino de cobaya (Gardner y Jackson, 1977; Alcón y cols., 1996), ratón (Burnham y cols., 1984) y rata (Lee, 1979), aunque otros autores no encuentran potenciación entre ambos secretagogos (Singh y cols., 1992;

Camello y Salido, 1993) para esta última especie.

El efecto de la CCK en otras porciones del tracto digestivo consiste en una estimulación de la secreción de bicarbonato en el estómago y duodeno proximal (Konturek y cols., 1985), efecto trófico en el páncreas (Lankisch, 1980), inducción de la secreción de pepsinógeno por las glándulas gástricas (Lankisch, 1980) y contracción de la vesícula biliar y del esfínter de Oddi (Pozo y cols., 1990).

Las respuestas pancreáticas a la CCK se deben a la presencia de receptores de membrana, de los cuales se han descubierto al menos dos tipos (Jensen y cols., 1989). El primer tipo son los receptores CCKA, únicos descritos en el páncreas de rata, que tienen una alta afinidad por la CCK (del orden de picomolar) y baja afinidad para la gastrina, y son los principales responsables de la estimulación de la secreción enzimática del páncreas y la contracción de la vesícula biliar (Jensen y cols., 1989). El segundo tipo es el receptor CCKB también identificado como receptor de la gastrina (Yu y cols., 1987). Este receptor tiene la misma afinidad tanto para la CCK como para la gastrina y se ha descrito en células acinares pancreáticas de cobaya, perro y en la línea tumoral de células acinares de rata AR42J (Yu y cols., 1987).

La CCK actúa en las células acinares pancreáticas activando la fosfolipasa C (PLC) que conlleva la hidrólisis del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>) de membrana, conduciendo a la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) que va a movilizar el calcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular (Putney, 1988; Berridge e Irvine, 1989) con la consiguiente activación de las cinasas dependientes de calmodulina y de la proteína cinasa C, y la subsecuente secreción enzimática (Jensen, 1994). Esta ruta intracelular es la que se considera ligada a la activación de los receptores de alta afinidad, mientras que los de baja afinidad podrían participar en la aparición de respuestas observadas a dosis no fisiológicas ("inhibición" de la secreción a dosis supramáximas, incremento en la captación de glucosa, estímulo de la adenilato ciclasa,...) (Williams y cols., 1989). Esta idea se ha visto reforzada con el uso de análogos sintéticos de la CCK, que tienen la capacidad de unirse a los receptores de alta afinidad, funcionando como antagonistas de los de baja afinidad. Estos compuestos (CCK-[26-32] feneiletil éster o JMV-180 y Boc[Nle21-Nle31]-CCK-7) han demostrado ser estimulantes de la secreción enzimática y de cambios en la concentración de calcio libre citoplasmático ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) similares a los obtenidos con dosis fisiológicas de CCK (Matozaki y cols., 1990).

Existen dos péptidos naturales relacionados estructuralmente con la CCK, la ceruleína y la gastrina. La gastrina se encuentra en el organismo en diferentes formas moleculares, todas ellas idénticas estructuralmente a la CCK en el pentapéptido carboxilo terminal (Huang y cols., 1989). La ceruleína es un decapeptido aislado inicialmente de la piel de *Hyla caerulea*, siendo tan potente como la CCK-8 (Anastasi

y cols., 1968).

### 2.2.2.3 *Otras hormonas y factores reguladores.*

Hay otros péptidos y factores que tienen efectos sobre la secreción pancreática exocrina, pero se conoce poco acerca de su significación fisiológica en la regulación de la secreción. Pueden clasificarse en estimulantes e inhibidores.

La bombesina es un tetradecapéptido originariamente aislado de la piel de la rana *Bombina bombina*. Este péptido es estructuralmente similar a dos péptidos existentes en los mamíferos, el péptido liberador de gastrina (GRP) y la neuromedina B (NMB), ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y el tracto gastrointestinal (Solomon, 1994). En 1991 Battey y Wada describieron la existencia de dos tipos de receptores para la bombesina: el receptor del GRP (con una alta afinidad para el GRP y la bombesina, pero con afinidad 30 veces menor para la NMB) y el receptor para la NMB (con una alta afinidad para la NMB, afinidad intermedia para la bombesina, pero 300 veces menor para el GRP). Tras la unión de la bombesina (y péptidos relacionados) al receptor del GRP en células acinares pancreáticas se produce la activación de la PLC, incrementando los niveles de IP<sub>3</sub>, de calcio citosólico y de diacilglicerol; el resultado final es un aumento en la secreción de enzimas pancreáticas (Jensen, 1994).

Otro péptido, la neurotensina, se ha revelado como inhibidor de la secreción pancreática basal en la rata, pero no parece alterar las respuestas a la administración de CCK o secretina (Hamosh y cols., 1975). En otras especies, como el hombre y el perro, tiene un efecto estimulador de la secreción pancreática (Brugge y cols., 1987; Hildebrand y cols., 1990), y sus niveles plasmáticos se incrementan tras la infusión intestinal de ácidos grasos.

La motilina se localiza principalmente en el duodeno y el yeyuno y también, como otras hormonas peptídicas, en el SNC (Polak y cols., 1975). En el perro la motilina inhibe la secreción de bicarbonato en respuesta a la secretina, por el contrario, estimula débilmente la secreción de enzimas digestivas. Posteriormente Konturek y cols. (1976) observaron que la administración intravenosa de motilina inducía una estimulación dosis-dependiente en la secreción de enzimas y bicarbonato. Los autores citados han propuesto que la motilina puede ser el principal estímulo fisiológico de la secreción pancreática interdigestiva.

El polipéptido pancreático (PP), el neuropéptido Y y el péptido YY son un grupo de agentes inhibidores de la secreción pancreática con estructura similar y que están presentes en el páncreas, cerebro y neuronas intestinales respectivamente (Dockray, 1987; Walsh, 1987). Se liberan en respuesta a los productos de la digestión

de lípidos en el intestino.

La somatostatina también es una hormona reguladora de la secreción pancreática. Sus niveles plasmáticos se incrementan tras la ingestión de alimento (Layer y cols., 1993). Está presente, además de en el hipotálamo, en las células D del intestino y en los islotes de Langerhans, y en neuronas del sistema nervioso periférico (Walsh, 1987), y posee receptores en la membrana de las células acinares pancreáticas (Taparel y cols., 1985). Tiene distinto efecto sobre el páncreas exocrino según las especies: en el perro (Boden y cols., 1975) y el hombre (Hanssen y cols., 1977) la somatostatina inhibe competitivamente la acción de la secretina así como la secreción de fluido y bicarbonato, mientras que en el gato y la rata no tiene efecto en la secreción de fluido (Erspamer y cols., 1974). Además, Singh y cols. en 1988 demostraron que la somatostatina es un potente inhibidor de la secreción enzimática *in vivo*. En la mayoría de los estudios se ha demostrado que la somatostatina provoca una inhibición parcial de la capacidad del VIP y la secretina para activar la adenilato ciclasa en acinos pancreáticos de rata y cobaya. Este efecto podría estar mediado por la activación de una proteína G de membrana (Jensen y cols., 1989).

La sustancia P es un péptido de 11 aminoácidos (Leeman y Hammerchlag, 1967), ampliamente distribuido por todo el organismo, aunque las mayores concentraciones se encuentran en el SNC y tracto gastrointestinal, particularmente duodeno y colon (Hokfelt y cols., 1977). Su acción y la de otros péptidos relacionados sobre la secreción pancreática exocrina está mediada por la unión a tres tipos de receptores específicos (Receptor Nomenclature Supplement, 1991). En el páncreas de cobaya y en la línea celular tumoral de rata AR42J la unión de la sustancia P a sus receptores activa la PLC, incrementando la concentración citosólica de calcio y de GMPc y provocando la secreción enzimática (May y cols., 1978). Pero además, parece inhibir competitivamente las respuestas a la CCK y secretina (Sjödin, 1985).

La quimodenina es un péptido aislado del duodeno del cerdo que estimula la secreción de quimotripsina sin aumentar la secreción de lipasa (Adelson y Rothman, 1975). Este hecho sugirió que una serie de hormonas del intestino pudiesen controlar selectivamente la secreción de enzimas digestivas (Meyer, 1981).

Debido a que en la masa pancreática exocrina se entremezclan las células de la porción endocrina, existe una gran controversia sobre el efecto que la insulina podría presentar sobre la secreción pancreática exocrina. Bruzzone y cols (1984) observaron que la insulina inhibe la secreción basal y la estimulada por ceruleína en el páncreas perfundido de rata. Sin embargo, Kanno y Saito (1976) demostraron en el mismo animal que la insulina potencia la acción de la CCK en la secreción de amilasa tanto *in vivo* como *in vitro*. Posteriormente, Singh en 1985 observó que la insulina no afecta a la secreción basal de amilasa pero sí potencia la secreción estimulada por ACh en

fragmentos pancreáticos de ratón. Recientemente, se ha comprobado que la insulina estimula débilmente la secreción de amilasas pero potencia claramente la secreción estimulada por ACh en acinos pancreáticos de rata (Juma y cols., 1997). Se ha demostrado la existencia de receptores para la insulina en células acinares pancreáticas de ratón, rata y cobaya (Okabayashi y cols., 1990). La ocupación de los receptores de la insulina estimula la captación de glucosa, así como la síntesis proteica (Williams y cols., 1981). Como se expuso anteriormente, la insulina potencia la liberación de amilasas estimulada por CCK tanto *in vivo* como *in vitro* (Kanno y Saito, 1976; Saito y cols., 1980). Estudios recientes han demostrado que la insulina interacciona con las mismas proteínas G que la CCK; no obstante, hasta el momento, la relación entre los efectos aditivos de la activación del receptor de la insulina y la CCK y la capacidad para interaccionar con las mismas proteínas G no está clara (Jensen, 1994). Estudios realizados por Juma y cols (1997) han sugerido que la insulina es capaz de movilizar calcio desde los depósitos intracelulares; la potenciación del efecto de la ACh se lleva a cabo por diferentes mediadores intracelulares, entre ellos el  $Ca^{2+}$ , el AMPc o las tirosinas cinasas.

La histamina, 2-(4-imidazolil) etilamina, es una amina primaria aislada por Best y cols en 1927. Está considerada como una hormona de acción local o autacoide producto de la descarboxilación del aminoácido histidina. Entre otras funciones es un estimulante de la secreción ácida gástrica (Code, 1982), interviene en reacciones alérgicas, y tiene ciertos efectos estimulantes en el páncreas del perro (Tankel y cols., 1977), y el conejo (Liebow y Franklin, 1982); sin embargo es poco eficaz como secretagogo en la rata (Chariot y cols., 1979).

Se conocen tres tipos de receptores para la histamina, H1, H2 y H3. La estimulación de los receptores H1 va acompañada de la hidrólisis de fosfolípidos de inositol y subsecuentemente de un aumento de la secreción pancreática exocrina, como se ha observado en el conejo (Pariente y cols., 1990b) y el cobaya (Salido y cols., 1990b). Por el contrario, los receptores H2, cuya acción parece mediada por la activación de la adenilato ciclasa vía una proteína GS, con el consiguiente incremento en la concentración de AMPc (Johnson, 1982), parecen tener un efecto antagonico al observado para los receptores H1 (Pariente y cols., 1989). El receptor H3 ha sido identificado como un receptor presináptico, que además de inhibir la liberación neuronal de histamina también puede inhibir la liberación de otros neurotransmisores, como la serotonina, en el SNC (Schlicker y cols., 1988). Estudios posteriores han demostrado que los receptores H3 también se localizan en otros modelos celulares del tracto gastrointestinal (Lewin y cols., 1992). En el páncreas, los receptores H3 juegan un papel importante en la regulación de la secreción exocrina mediada por mecanismos nerviosos en el cobaya (Jennings y cols., 1996; Salido y cols., 1997).

El efecto estimulador de la histamina en la secreción pancreática exocrina (Pariente y cols., 1991; Alcón y cols., 1995) lleva acompañado una ligera elevación de la concentración del calcio citosólico (Salido y cols., 1990b), pero también parece claro que los efectos secretores de la histamina están mediados por la vía del AMPc (Lajas y cols., 1995; González y cols., 1996; Camello y cols., 1997). La elevación de la concentración de calcio citosólico parece debida a la activación de los receptores H1, mientras que la estimulación de los receptores H2 está relacionada con la elevación de los niveles de AMPc (Singh y cols., 1997). La histamina es capaz de incrementar la liberación de potasio de las células del páncreas de cobaya, aunque dicho efecto es considerablemente inferior al observado para la ACh (Rosado y cols., 1996). La liberación de potasio estimulada por histamina o ACh en el páncreas de cobaya necesita de una elevación de la concentración de calcio citoplasmático (Rosado y cols., 1997a; Rosado y cols., 1997b). Tapia y cols (1997) han demostrado que la histamina, en un rango de concentraciones comprendido entre 0.1  $\mu$ M y 1 nM, incrementa la liberación de tripsinógeno en el páncreas de cobaya.

Todos estos hallazgos demuestran que la histamina se puede considerar como un autacoide de importancia fisiológica en el páncreas exocrino (Pariente y cols., 1991; Singh y cols., 1997).

## 2.3 Mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción en el páncreas exocrino.

---

Los agentes fisiológicos que presentan efectos sobre la secreción pancreática exocrina interactúan inicialmente con sus receptores situados en la membrana celular (Williams y cols., 1989). Todos aquellos acontecimientos que suceden con posterioridad a la ocupación de los receptores y que conducen a la secreción tanto de proteínas como de iones se han bautizado con el nombre de "acoplamiento estímulo-secreción", un término que fue empleado por primera vez en 1961 cuando Douglas estudiaba el papel del calcio en los procesos de secreción en células cromafines (Douglas y Rubin, 1961; Douglas, 1968), los cuales se basaron en el término de acoplamiento excitación-contracción que Sandow en 1952 describió para aquellos fenómenos que sucedían en la contracción muscular (Ebashi, 1991).

Aunque el término fue originariamente aplicado al papel que el ion  $Ca^{2+}$  presentaba como mediador de las respuestas secretoras en las células cromafines, hoy en día es usado en un sentido más amplio. El acoplamiento estímulo-secreción está íntimamente relacionado con el término de mensajeros intracelulares o segundos mensajeros. Además, el descubrimiento de este mecanismo dio origen a la definición de mensajero: las hormonas o neurotransmisores, que son la señal extracelular, serían los primeros mensajeros encargados de promover la respuesta celular mediante la activación de señales transmembranas con la consiguiente generación de sustancias intracelulares o segundos mensajeros que, a su vez, desencadenan una respuesta actuando sobre otros compuestos denominados efectores. Así, para mejor operatividad es útil dividir el acoplamiento estímulo-secreción considerando señales de transmembrana (o transmembranosas), mensajeros intracelulares y efectores.

### *2.3.1 Señales de transmembrana.*

#### *2.3.1.1 Proteínas G.*

Las proteínas G, también conocidas como "GTP binding proteins", están compuestas por un número determinado de subunidades  $\alpha$  y un menor número de

subunidades  $\beta$  y  $\delta$ , que normalmente se presentan como complejo  $\beta\delta$  (Simon y cols., 1991).

Su descubrimiento tuvo lugar a lo largo de la década de los 70, en el transcurso de las investigaciones que trataban de profundizar en el conocimiento de la vía del AMPc. Algunas proteínas G comunican la activación del receptor de membrana a la adenilato ciclasa (AC), incrementando su actividad para aumentar la concentración de AMPc en el citoplasma. Tras los descubrimientos iniciales, se encontraron proteínas G implicadas en el proceso de inhibición de la vía del AMPc ejercido por algunos receptores. Así, las proteínas G que regulan la adenilato ciclasa se han clasificado en estimulantes (Gs) e inhibidoras (Gi), basándose en la presencia de distintas subunidades  $\alpha_s$  y  $\alpha_i$ , las cuales también pueden distinguirse en base a su sensibilidad a la toxina del cólera y la toxina pertussis (Simon y cols., 1991). Estas toxinas actúan catalizando la ribosilación (ADP-ribosilación) de las subunidades  $\alpha_s$  y  $\alpha_i$  respectivamente (Simon y cols., 1991).

Tras ello se fueron clasificando, desde un punto de vista funcional y bioquímico, en distintos tipos: transducina o Gt, Go, Gp o Gq, Gs,... (Spiegel, 1990). Con el clonaje de genes se han descubierto diferentes tipos de cada una de las tres subunidades que pueden formar distintas combinaciones (las subunidades beta y delta, con una alta homología, se combinan con distintas subunidades alfa, que la dan la "identidad" a la proteína G) (Kaziro, 1990). Así, es posible que en una misma célula se expresen varios genes, originando una serie de distintas proteínas G que modulen la respuesta a distintos receptores. Además, un mismo receptor puede funcionar con más de una proteína G (cada una con una función distinta) y viceversa, una proteína G puede estar asociada a más de un receptor y/o respuesta celular (Birnbaumer, 1990).

Simon y cols (1991) han demostrado la existencia de una gran diversidad de proteínas pertenecientes a la familia de proteínas G, las cuales se han clasificado en cuatro clases: la familia de proteínas Gs; la familia de las proteínas Gi, las cuales son muy abundantes en el cerebro; una nueva familia de proteínas G, denominadas Gq que están ampliamente distribuidas y finalmente unas proteínas de 42 y 43 Kda que activan la PLC específica de fosfoinositoles.

El modelo generalmente aceptado para la activación de las proteínas G se basa en la presencia en la subunidad alfa de un punto que une nucleótidos de guanina, el cual, en estado de reposo, está ocupado por GDP. Como consecuencia de su activación el GDP es sustituido por GTP y la subunidad alfa del heterotrímero se disocia del complejo  $\beta\delta$  y activa a su efector (PLC o AC). El sistema funciona como amplificador de las señales, ya que la vida media del complejo GTP- $\alpha$  es mucho mayor que la del complejo hormona-receptor; la subunidad  $\alpha$  unida a GTP regula entonces la actividad del efector apropiado en cada caso. Debido a la presencia de actividad GTPasa

intrínseca de este complejo, el GTP se hidroliza a GDP con lo que la subunidad  $\alpha$  ahora inactiva se reasocia al complejo  $\beta\delta$  terminando su activación (Yule y Williams, 1994). Así, es la subunidad  $\alpha$  la que reconoce al efector.

En las células acinares pancreáticas el VIP, la secretina y la CCK a elevadas concentraciones activan la adenilato ciclasa, mientras que la somatostatina inhibe la acción del VIP. La toxina del cólera imita la acción del VIP y la secretina para activar la AC, mientras que la toxina pertussis bloquea la acción de la somatostatina para inhibir la AC, indicando el concurso de proteínas Gs y Gi respectivamente.

Recientemente se ha demostrado que los receptores ligados a la movilización del  $Ca^{2+}$  (los de la CCK y los receptores muscarínicos de la ACh) están funcionalmente acoplados a la PLC mediante distintas proteínas G (Matozaki y cols., 1988).

La complejidad de las proteínas G en las células acinares pancreáticas se ve reflejada en la existencia de 15 formas de la subunidad  $\alpha$ , que han podido ser reconocidas mediante el empleo de anticuerpos dirigidos contra la secuencia de la citada subunidad (Schnefel y cols., 1990). Estos resultados sugieren que en las células acinares existen múltiples caminos para la transmisión de señales que implican la actuación de las proteínas G de membrana y que receptores como los de la CCK, que pueden existir en estados de alta y baja afinidad, podrían activar diferentes proteínas G en función del estado en que se encuentran. Todo esto permite pensar en las proteínas G del páncreas exocrino como una red que permite la integración y modulación de las respuestas mutuas por parte de diversos secretagogos.

### ***2.3.1.2 Efectores de membrana (fosfolipasa C y adenilato ciclasa).***

La adenilato ciclasa (AC), enzima que se encarga de la síntesis de AMPc, se encuentra en todos los tejidos animales. Se han descrito tres formas bioquímicamente diferentes: una sensible a la calmodulina, inicialmente localizada en el cerebro, una insensible a la calmodulina y presente en varios tejidos (ambas son proteínas de membrana), y una tercera soluble encontrada únicamente en testículo. La AC pancreática no es estimulada por la calmodulina (Yule y Williams, 1994).

En contraste con la AC, que como ya hemos dicho se localiza fundamentalmente en la membrana celular, la fosfolipasa C (PLC) se ha encontrado en el citoplasma de muchos tipos celulares (Yule y Williams, 1994). La PLC es, en realidad, una familia o conjunto de enzimas. Tras diversos estudios se han podido identificar al menos nueve isoformas que pueden ser englobadas en cuatro familias llamadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (Meldrum y cols., 1991). Esta diversidad de isoformas permite

pensar que distintos agonistas pueden estimular diferentes proteínas G y/o diferentes formas de PLC para generar así patrones de respuesta específicos.

Todos los tipos de PLC actúan tanto sobre el PIP<sub>2</sub>, por el que muestran mayor afinidad, como sobre el fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P) y el fosfatidilinositol (PI) (Hokin y Dixon, 1990), y su función es hidrolizar el enlace éster entre el glicerol y el grupo fosfato del inositol existente en la estructura de estos fosfolípidos, generando diacilglicerol e IP<sub>3</sub>. Además de generar estos dos compuestos, hay una pequeña proporción de fosfatos de inositol cíclicos que se forman como consecuencia de la propia forma de actuación de la enzima (Hokin y cols., 1987). Para su funcionamiento es preciso el ion calcio, que además puede estimular su actividad en rangos de concentración cercanos a los existentes en el citosol durante la estimulación (1  $\mu$ M) (Taylor y cols., 1986). Parece necesario que esta enzima, que se encuentra en el citosol, se una a la membrana antes de comenzar la hidrólisis de los fosfolípidos de inositol. Además del calcio, algunos autores han propuesto la participación de otros factores en su activación, como fosfatidilcolina, DAG o ácidos grasos insaturados (Martin, 1989).

Los únicos estudios que se han llevado a cabo para identificar los tipos de PLC que existen en el páncreas se han realizado con la técnica de inmuno blotting y han revelado la presencia en el páncreas de los isotipos  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (Rhee y cols., 1991). Actualmente hay evidencias de que la PLC $\gamma$  es activada por la fosforilación en restos de tirosina tras la unión de factores de crecimiento (tales como el EGF o el FGF) a su receptor. La activación de la PLC $\beta$  es responsable de la hidrólisis de PIP<sub>2</sub>, con la producción de IP<sub>3</sub> y DAG, en respuesta a secretagogos (Yule y Williams, 1994).

Otros efectores de membrana también podrían participar en la transducción de la señal pero no han sido aún bien caracterizados. Estos efectores serían las fosfolipasas C y D específicas para fosfatidilcolina, la fosfolipasa A<sub>2</sub>, el intercambiador Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> y varios canales iónicos. Todos ellos estarían regulados por mensajeros intracelulares en mayor medida, teniendo menos importancia las proteínas G (Yule y Williams, 1994).

## ***2.3.2 Mensajeros Intracelulares.***

### ***2.3.2.1 Inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3).***

La activación de la PLC produce la hidrólisis del fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) para dar lugar a la formación de IP<sub>3</sub> y diacilglicerol (DAG). Ambas moléculas

actúan como mensajeros intracelulares primarios en el páncreas. La acción principal del IP<sub>3</sub> consiste en provocar una rápida liberación del ion calcio desde depósitos intracelulares no mitocondriales; esta función es específica para este isómero, el resto de los isómeros no provoca dicha liberación (Yule y Williams, 1994).

Los estudios muestran que la formación de IP<sub>3</sub> es muy rápida. En acinos pancreáticos marcados con [<sup>3</sup>H]inositol y estimulados con dosis máximas de CCK o carbacol se ha observado un rápido incremento en los niveles de IP<sub>3</sub>, alcanzando el máximo a los 5 segundos (Rubin y cols., 1984).

Estudios realizados mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) han encontrado múltiples isómeros del inositol trifosfato, incluyendo Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> y el Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>. Estos mismos estudios demuestran que el IP<sub>3</sub> aumenta a un nivel de 2 a 5 veces superior al basal 5 segundos después del estímulo, tras lo que se produce una disminución en los niveles detectados aunque se mantienen en valores superiores a los basales incluso 10 minutos después del estímulo. La formación de Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> presenta un patrón diferente: su aparición presenta un retraso de 15 a 40 segundos respecto al IP<sub>3</sub>, pero continúa aumentando en presencia del estímulo. Una pequeña proporción del IP<sub>3</sub> generado tras la estimulación con un secretagogo (inferior al 5%) es una forma cíclica, esta forma es 16 veces menos potente que el IP<sub>3</sub> no cíclico en el páncreas exocrino. Esta forma cíclica es producida de manera continua a lo largo de la estimulación por un agonista, y debido a su carácter de sustrato difícilmente degradable, se va acumulando gradualmente en el interior celular. Por lo tanto la liberación de Ca<sup>2+</sup> provocada por esta forma cíclica podría ser importante en la estimulación por agonistas durante largos periodos de tiempo (Yule y Williams, 1994).

Estudios realizados por Rowley y cols (1990) demostraron que concentraciones máximas de CCK, bombesina o agonistas colinérgicos pueden estimular la síntesis de IP<sub>3</sub>; sin embargo menores concentraciones de secretagogos, en respuesta a las cuales se pueden apreciar cambios en la secreción y en la concentración intracelular del ion calcio (por ejemplo, 1-50 pM de CCK), no producen cambios apreciables en el metabolismo de los inositoles fosfato. Esta dificultad para detectar estos cambios no se conoce si es realmente debida a la ausencia de metabolismo de los inositoles fosfato o a la falta de sensibilidad en los métodos de estudio (Matozaki y Williams, 1989).

Se ha demostrado que el metabolismo del IP<sub>3</sub> se lleva a cabo por dos rutas. La primera de ellas es iniciada por la fosfatidilinositol 3'-cinasa (PI3-cinasa) sensible a Ca<sup>2+</sup>-calmodulina, que fosforila el IP<sub>3</sub> a inositol 1, 3, 4, 5-tetrafosfato el cual puede de nuevo defosforilarse por una 5-monofosfatasa a Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>. Esta molécula puede de nuevo fosforilarse a Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> y posteriormente a Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> e IP<sub>6</sub> o bien defosforilarse a Ins(1)P o Ins(3)P dependiendo de la fosfatasa inicial (Berridge e

Irvine, 1989). En la ruta alternativa el IP<sub>3</sub> puede defosforilarse a Ins(1,4)P<sub>2</sub> e Ins(4)P. No se ha encontrado ningún papel fisiológico para ninguno de estos inositoles fosfato, únicamente está establecido que los niveles de Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> se incrementan rápidamente en acinos pancreáticos tras la estimulación por un agonista, siendo sostenido este incremento a lo largo de la estimulación (Trimble y cols., 1987). Recientemente se ha propuesto un papel fisiológico para el Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>: dado que la célula debe gastar energía para su síntesis es lógico pensar que esta molécula no es un mero derivado del catabolismo del IP<sub>3</sub>. Así, algunos autores (Hill y cols., 1988) han propuesto que puede promover la entrada de Ca<sup>2+</sup> en la célula o facilitar la comunicación de depósitos intracelulares de Ca<sup>2+</sup>; sin embargo no hay evidencias claras que confirmen estas acciones en las células acinares pancreáticas.

### **2.3.2.2 1,2 diacilglicerol (DAG).**

El 1,2 diacilglicerol (DAG) es el activador endógeno de la proteína cinasa C (PKC) (Nishizuka, 1984; 1992) y es uno de los productos generados por la PLC tras la hidrólisis del PIP<sub>2</sub>. La estimulación de las células acinares pancreáticas con dosis máximas de agonistas que median su acción a través de la PLC conduce a un incremento rápido en los niveles de DAG. Pero, a diferencia del IP<sub>3</sub>, los niveles de DAG siguen aumentando en presencia del agonista durante muchos minutos. Esta elevación es el resultado de dos procesos: tras una rápida elevación hay una segunda fase en la que se produce una constante y prolongada aparición de DAG (Matozaki y Williams, 1989). Al igual que con la formación de IP<sub>3</sub>, la generación de DAG también presenta dependencia de la dosis de secretagogo que se emplea. A dosis bajas, con las que no se detectan cambios en los niveles de IP<sub>3</sub>, el pico inicial de DAG no se observa y solamente se hace visible el incremento posterior. Este último incremento en el nivel de DAG no se correlaciona totalmente con la hidrólisis del PIP<sub>2</sub> en términos tanto de magnitud, evolución en el tiempo o dependencia de la concentración de agonista. Existe la posibilidad de que el DAG se forme a partir de la hidrólisis de otros fosfolípidos de membrana distintos de PIP<sub>2</sub>, como por ejemplo la fosfatidilcolina (PC). Este hecho llevó a Bruzzone (1990) a proponer un modelo según el cual algunos agonistas producirían respuestas mediante la activación de la PKC sin generar IP<sub>3</sub>, lo cual es posible si se hidrolizan PI y/o PIP. También sería posible si actúa una fosfolipasa C que hidrolice la anteriormente citada PC (Loffelholz, 1989) o bien una fosfolipasa D (PLD) (Pandol y cols., 1991) que lo genera a partir de PC, colina o ácido fosfatídico (AF). Así se generaría DAG sin la aparición de la señal de calcio.

El DAG generado puede seguir dos rutas metabólicas (Jaken, 1989):

- a.- una cinasa lo transforma en AF, para posteriormente incorporarlo a las

rutas metabólicas de los fosfolípidos de inositol.

b.- separación de los ácidos grasos por acción de una lipasa.

Como ya hemos comentado anteriormente, el DAG ejerce su acción a través de la PKC, presente en todos los tejidos. Fue el grupo de Nishizuka el descubridor de esta cinasa a finales de los años 70, y observó que para su activación presenta dependencia de calcio y fosfolípidos (Nishizuka, 1984). Debido a esta dependencia de fosfolípidos se piensa que la enzima es solamente activa cuando está asociada a la membrana celular (se trata de una enzima que en reposo se encuentra en el citosol y al ser activada se asocia a las membranas celulares, proceso conocido como translocación, si bien hay algunos tejidos en los que el proceso es a la inversa). La duración y el grado de unión depende del agonista considerado (Rana y Hokin, 1990).

### **2.3.2.3 *Calcio intracelular.***

Hoy en día está claramente demostrada la importancia que tiene el ion  $\text{Ca}^{2+}$  en las respuestas del páncreas exocrino al grupo de secretagogos que activan la vía de los fosfolípidos de inositol. La primera referencia acerca del páncreas exocrino aparece en 1966 (Hokin, 1966), y en la década de los 70 diversos autores demuestran la intervención del ion  $\text{Ca}^{2+}$  en los procesos de exocitosis en el páncreas exocrino (Argent y cols., 1976).

En el páncreas exocrino y otros tejidos (de manera diferente a como sucede en las células cromafines o las células beta pancreáticas) la secreción inicial que tiene lugar tras la estimulación no depende de la presencia de calcio en el medio externo, mientras que la secreción tardía o sostenida (a partir de los cinco minutos tras la aplicación del estímulo) sí necesita la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular (Sung y Williams, 1988). De esta manera se ha sugerido la existencia de dos fases en las respuestas mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$ :

a.- una primera fase en la que se produce la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en los depósitos intracelulares,

b.- y una segunda fase, tardía o sostenida, en la que se produce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  procedente del medio extracelular.

El desarrollo de indicadores fluorescentes sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  ha facilitado enormemente la monitorización de los cambios que se producen en la concentración de calcio libre citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). La información que actualmente se tiene sobre el patrón de movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  en los diversos tipos celulares es muy elevada, y ha sido objeto de numerosas revisiones. Las primeras evidencias que se tienen sobre la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la estimulación con secretagogos que actúan por la vía de los fosfolípidos de inositol fueron obtenidas utilizando determinaciones de

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ , electrodos y fosfoproteínas sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  (Williams, 1980; Schulz y Stolze, 1980; Hootman y Williams, 1987).

Determinaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  empleando el indicador fluorescente Quin-2, y más recientemente fura-2, indo-1 y fluo-3, han permitido conseguir mucha más información acerca de los aspectos espaciales y temporales de los mecanismos reguladores de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en las células acinares pancreáticas. Estos experimentos se realizaron inicialmente sobre suspensiones de células acinares y, más recientemente, sobre células aisladas (“single cells”) mediante técnicas de microespectrofluorimetría, análisis digital de imágenes o detección de corrientes iónicas activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  (“patch clamp”). De estos estudios se desprende que tras la estimulación con dosis máximas de CCK, bombesina o agonistas colinérgicos, se produce un aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de entre 4 y 10 veces el valor de reposo, alcanzando un máximo (que en ocasiones está en torno a 1 mM), en cuestión de segundos (Yule y Gallacher, 1988; Stuenkel y cols., 1989). A continuación se produce una reducción en el curso de los 2-5 minutos siguientes hasta un nivel estable por encima del valor basal (Muallem, 1989). También el estímulo selectivo de las proteínas G (empleando fluoroaluminato  $[\text{AlF}_4^-]$ , agente que estimula las proteínas G de membrana sin necesidad de actuar sobre los receptores celulares) ha desarrollado el mismo patrón sobre el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Matozaki y cols., 1988).

Estudios en los que las células eran estimuladas en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular mostraron que el incremento inicial en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es independiente de la presencia de este ion en el exterior; sin embargo, la fase posterior de respuesta sostenida o meseta no se observaba. De igual manera, cuando se elimina el  $\text{Ca}^{2+}$  del medio durante la respuesta sostenida se produce un descenso en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, indicando una absoluta dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Pandol y Schoeffield, 1987; Muallem y cols., 1989; Tsunoda y cols., 1990). La elevación inicial en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se piensa que es debida a la producción de  $\text{IP}_3$ , ya que la variación en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el tiempo y la dependencia de la dosis de agonista ensayado es similar a la que sigue la formación de  $\text{IP}_3$ .

En células acinares pancreáticas en reposo, al igual que ocurre en otras células, la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  varía entre 50 y 200 nM. Para mantener estos valores tan bajos de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , comparados con las existentes en el medio extracelular, es necesario por parte de la célula contrarrestar la gran tendencia que hay a la entrada de este ion en el citoplasma siguiendo su gradiente electroquímico. Para ello existen varios mecanismos de transporte en la membrana celular y en los orgánulos citoplasmáticos, que mantienen la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dentro de los valores normales (Muallem, 1989). Un mecanismo importante para mantener los valores de reposo de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es el representado por la bomba adenosinatrifosfatasa dependiente del ion  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa) (Ansha y cols.,

1984; Bayerdorffer y cols., 1985) que transporta  $\text{Ca}^{2+}$  al medio externo. Esta bomba desempeña igualmente un importante papel cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tiene que retornar a los valores basales tras la estimulación de las células. Recientemente se ha demostrado que la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma se puede detectar segundos después de su incremento en el citosol. Este aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  parece seguir muy de cerca al incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , incluso cuando se están produciendo oscilaciones (Tepikin y cols., 1992; Tepikin y Petersen, 1992).

#### *Liberación de $\text{Ca}^{2+}$ desde los depósitos intracelulares.*

De los experimentos iniciales en los que se ensayaba el efecto de los secretagogos sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se dedujo que este ion era liberado desde un depósito intracelular, que podría ser el retículo endoplásmico (RE), sin que se produjeran cambios significativos en otros compartimentos celulares como la mitocondria o los gránulos de secreción (Dormer y Williams, 1981). La propuesta de que el  $\text{IP}_3$  es el mensajero encargado de iniciar la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  se vio confirmada por la cinética de producción de esta molécula en las células. Los secretagogos producen una adecuada correlación entre la formación de  $\text{IP}_3$  y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rowley y cols., 1990), habiéndose establecido que el depósito desde el que se libera este ion es el RE, ya que estudios bioquímicos y estructurales han revelado que este fenómeno es reproducible en vesículas de RE pero no en vesículas procedentes de la membrana celular (Dormer y Williams, 1981; Waltz y Baumann, 1989).

Sin embargo, la identidad y localización precisa de este depósito aún no se ha determinado con exactitud en células no musculares, a diferencia de en células musculares donde está identificado el retículo sarcoplásmico como único depósito intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tsien y Tsien, 1990). Existen resultados que sugieren que se trata de una zona del RE (Thevenod y cols., 1989a), pero también se ha descrito un orgánulo, denominado calciosoma, similar al RE pero físicamente separado, que contiene la proteína captadora de  $\text{Ca}^{2+}$  calsecuestrina y al que los autores atribuyen la función de depósito en ciertos tejidos (incluido el páncreas exocrino) (Volpe y cols., 1988). Otros resultados también coinciden con esta primera descripción de un depósito diferente al RE (Rossier y cols., 1991). Actualmente, la identidad morfológica del depósito de  $\text{Ca}^{2+}$ , así como su localización precisa dentro de la célula, están poco claras y es difícil de establecer, aunque sí puede explicarse el patrón de movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en su interior (Tsien y Tsien, 1990).

Se ha propuesto que el  $\text{IP}_3$  induce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un complejo formado por su receptor y un canal iónico (Joseph y Williamson, 1986), purificado por primera vez en células de Purkinje (Supattapone y cols., 1988a). No hay consenso

acerca de si está situado en la parte externa de la membrana o en su interior (Tsien y Tsien, 1990). La unión con el receptor precisa de los grupos fosfatos en las posiciones 4 y 5 del anillo de inositol, y presenta un alto grado de cooperatividad, siendo necesaria la unión de tres moléculas de IP<sub>3</sub> para que se libere el Ca<sup>2+</sup> (Nahorski y Potter, 1989).

Los datos estructurales existentes indican que el receptor es un tetrámero (Supattapone y cols., 1988b) que presenta homología con el receptor de rianodina (localizado en el retículo sarcoplásmico de las células musculares esqueléticas, en las que se cree que acopla la despolarización en los túbulos T con la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo sarcoplásmico) (Chandler y cols., 1976). Presenta cuatro regiones transmembranas, con los extremos C-terminal y N-terminal localizados en o cerca del lumen del retículo y el citosol respectivamente (Furuichi y cols., 1989). Cuando ha sido purificada, se ha encontrado que esta proteína posee un lugar para el reconocimiento del IP<sub>3</sub> y un canal asociado para la liberación del Ca<sup>2+</sup> (Ferris y cols., 1989).

El mecanismo por el que el receptor produce la liberación del Ca<sup>2+</sup> del depósito es la apertura de un canal de 10 pS de conductancia. En este proceso hay un fenómeno de amplificación, pues los datos estequiométricos demuestran que por cada molécula de inositol se liberan 20 iones de Ca<sup>2+</sup> (Berridge e Irvine, 1984). Al parecer la liberación tiene lugar de modo cuantal (Berridge e Irvine, 1984; Muallem y cols., 1989), hecho que concuerda con la demostración, por Muallem y cols (1989), de que el Ca<sup>2+</sup> intracelular movilizado en las células acinares del páncreas por los secretagogos tiene respuestas de tipo "todo-nada".

Se han descrito posibles lugares de regulación del receptor del IP<sub>3</sub>. El receptor es fosforilado por la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa II (PKII) (dependiente del complejo Ca<sup>2+</sup>-calmodulina) (Ferris y cols., 1991) representando ésto un posible mecanismo de retroalimentación negativa en la transducción de la señal. Estudios realizados en páncreas exocino han obtenido resultados que apoyan este hecho: el tratamiento con activadores de la PKC no afecta la hidrólisis del PIP<sub>2</sub> pero sí inhibe la secreción y la liberación de Ca<sup>2+</sup> por las células (Willems y cols., 1989). Además este receptor puede ser fosforilado por una proteína cinasa A (PKA), hecho que reduce su potencia para liberar Ca<sup>2+</sup> (Supattapone y cols., 1988b). En este receptor también se han encontrado puntos de unión para adenina y Ca<sup>2+</sup>.

Los estudios realizados en páncreas exocrino han revelado que el canal no es un transportador, sino simplemente una vía conductiva que precisa potasio (K<sup>+</sup>) en el citoplasma para su normal funcionamiento, siendo la fuerza motriz el gradiente electroquímico de ambos iones (Muallem y cols., 1985; Schulz y cols., 1989).

La terminación del efecto del IP<sub>3</sub> no se produce por desensibilización del

receptor (Nicotera y col., 1990), lo que indica que debe ser por medio de metabolización (Berridge e Irvine, 1989), aunque estudios realizados recientemente sugieren que el mismo IP3 inactiva el receptor (Mak y Foskett, 1997).

En estudios previos se ha encontrado que el IP3 es capaz de liberar solamente una porción del Ca<sup>2+</sup> movilizable, indicando que el IP3 podría no ser el único mediador en la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Thevenod y cols., 1989a). Además se ha propuesto la existencia de distintos puntos de almacenamiento para este ion basándose en las propiedades de los mismos para la captura de Ca<sup>2+</sup> (Thevenod y cols., 1989a), esto es, un depósito sensible a IP3 y otro insensible. En estos sistemas el GTP es un compuesto que se ha incluido como mediador en la comunicación entre los depósitos (Gill y cols., 1989); incluso en el páncreas se ha propuesto que la ADP ribosa cíclica sería el mensajero para el depósito insensible a IP3 (Thorn y cols., 1994). Gerasimenko y cols (1996) han descrito que el IP3 y la ADP ribosa cíclica producen liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los gránulos de zimógeno, por lo que estos gránulos también actuarían como almacenes intracelulares de calcio.

Actualmente no está claro si los depósitos sensibles e insensibles a IP3 están localizados en el mismo orgánulo. Estudios farmacológicos e inmunológicos han indicado que estos dos depósitos son, al menos parcialmente, diferentes (Elliasman y cols., 1990; Brorson y cols., 1991), contribuyendo ambos a los procesos de señalización del Ca<sup>2+</sup> (Biden y cols., 1986).

#### *Salida del Ca<sup>2+</sup> desde el citoplasma.*

A lo largo del período de estimulación con los agonistas el nivel de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático presenta un retorno a un nivel cercano al que existía en período de reposo, de manera que algún mecanismo debe ponerse en marcha para reducir su entrada al citosol procedente del medio extracelular o bien incrementar su transporte a los depósitos y/o al medio externo.

Las células acinares pancreáticas eliminan gran parte del Ca<sup>2+</sup> citoplasmático mediante su transporte al medio extracelular (Tepikin y cols., 1992), aunque también existe un retorno hacia los depósitos intracelulares. El transporte de calcio a través de la membrana plasmática se lleva a cabo por la bomba de Ca<sup>2+</sup> dependiente de ATP y Mg<sup>2+</sup> (Muallem, 1989). La activación de esta bomba está mediada por la PKC (Muallem y cols., 1988) y el propio Ca<sup>2+</sup>, a través de la calmodulina (Muallem, 1989). Existe la posibilidad de su activación por otras cinasas.

Un estudio simultáneo de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y del transporte de Ca<sup>2+</sup> al medio extracelular en células aisladas mediante la denominada técnica de la “gota” ha demostrado que la bomba de Ca<sup>2+</sup> se activa y desactiva de manera muy rápida

siguiendo estrechamente la  $[Ca^{2+}]_i$  (Tepikin y cols., 1994), “oscilando” incluso con las oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_i$ .

En otros estudios se ha descrito la existencia de un intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  en la membrana de las células pancreáticas, pero los datos existentes hacen pensar que su papel es muy reducido (Muallem y cols., 1988).

#### *Oscilaciones de $Ca^{2+}$ .*

Existen dos patrones descritos para la liberación del  $Ca^{2+}$  intracelular: el primero es una liberación masiva del  $Ca^{2+}$  desde los depósitos, y el segundo consiste en la liberación pulsátil a modo de espigas, proceso conocido con el nombre de “oscilaciones” y que se produce en respuesta a la estimulación con dosis bajas de agonistas. Este último proceso ha hecho pensar que los cambios que se producen en la  $[Ca^{2+}]_i$  en las células son mucho más complicados que lo que revelan las determinaciones realizadas en suspensiones celulares. La aparición de estos diferentes mecanismos de liberación del  $Ca^{2+}$  (frecuencia, tiempos y amplitud) dependen de la concentración del agonista empleada o del estado en que se encuentra el receptor (Yule y cols., 1991).

La gran liberación de  $Ca^{2+}$  producida en respuesta a la estimulación con dosis altas de secretagogos se produce durante los primeros 2-5 segundos (Muallem y cols., 1989). Sin embargo para concentraciones inferiores existe un período de retraso en la aparición de la respuesta de  $Ca^{2+}$  que depende de la dosis de agonista empleada y que aumenta cuando ésta disminuye (0.5-3 minutos hasta la aparición de la primera espiga). Así las células producen liberaciones de  $Ca^{2+}$  repetitivas, sin que exista movilización masiva de todo el calcio acumulado. Este fenómeno se ha descrito en células pancreáticas aisladas de ratón, cobaya y rata (Yule y Gallacher, 1988; Tsunoda y cols., 1990), así como en muchos otros tejidos.

Las oscilaciones pueden iniciarse en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular pero dependen de los niveles de ATP, como se demuestra en estudios en los que la deplección de ATP inhibe el patrón oscilatorio (Tsunoda y cols., 1990), de manera que podría existir un mecanismo de recaptación de  $Ca^{2+}$  dependiente de ATP. Sin embargo, el  $Ca^{2+}$  extracelular es necesario para mantener las oscilaciones, especialmente en respuesta a la ACh, posiblemente debido a que en su ausencia se produce el vaciamiento de los depósitos (Yule y Gallacher, 1988; Tsunoda y cols., 1990). Tras la estimulación con dosis baja de agonista, las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  se producen con una frecuencia de entre 1 y 4 ciclos por minuto durante todo el tiempo en el que el agonista está presente. La forma que presentan estas oscilaciones varía de unos tipos celulares a otros, pudiendo tener una apariencia sinusoidal, picos o espigas

transitorias que retornan siempre al basal, oscilaciones asimétricas o bien oscilaciones sobre un nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  elevado con respecto al basal. En el páncreas exocrino la CCK induce oscilaciones transitorias o irregulares (con valles que llegan al basal), mientras que la ACh genera oscilaciones sobre una  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevada (Toescu, 1995).

Hay muchos modelos que han intentado explicar el mecanismo de generación de las oscilaciones, modelos que tenían en cuenta los mecanismos de liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la entrada del mismo desde el exterior. Aunque no hay consenso acerca de cómo se producen, todos los modelos actuales implican a las proteínas G y a la formación de IP3 para la producción del pico inicial en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Las hipótesis existentes dividen las oscilaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en dos clases: oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la actividad cíclica de la membrana, dando lugar a las denominadas oscilaciones controladas por segundos mensajeros y oscilaciones controladas por receptor, respectivamente (Berridge y Gallione, 1988).

En las oscilaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  controladas por receptor se producen cambios en la concentración de IP3. La disminución de los niveles de IP3 se debería a una retroinhibición de la PLC, que podría estar mediada por la PKC que fosforilaría la proteína G de membrana, cesando así la producción de IP3 (Tsien y Tsien, 1990; Tsunoda y cols., 1990). Una nueva oscilación se produciría cuando la actividad de la PKC se redujera por sí misma, momento durante el cual el agonista seguiría actuando sobre su receptor y escaparía a esta inhibición (Berridge y cols., 1988).

En otro modelo, el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por el IP3 activa la hidrólisis del PIP2 para amplificar la producción del IP3 tras su metabolización. Por tanto, se liberaría más  $\text{Ca}^{2+}$  tras esta nueva generación de IP3. Cuando éste ha dado metabolizado, el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se reduce al ser transportado hacia los depósitos, iniciándose un nuevo ciclo con la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por el IP3 residual. El  $\text{Ca}^{2+}$  liberado activaría a la PLC, aumentando los niveles de IP3, con lo que el ciclo volvería a repetirse (Meyer y Stryer, 1988).

Hay un tercer modelo en el que el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado interfiere con el receptor del IP3 (se produce una retroalimentación negativa por parte del  $\text{Ca}^{2+}$ ). La producción de IP3 desencadena una liberación inicial de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos y, a medida que se incrementa la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , se está produciendo una inhibición de la liberación inducida por IP3. Conforme el  $\text{Ca}^{2+}$  es transportado fuera del citosol esta inhibición va desapareciendo, de manera que ello conduce a la nueva unión del IP3 a su receptor comenzando nuevamente el ciclo (Supattapone y cols., 1988b). Sin embargo, en células acinares pancreáticas permeabilizadas la inhibición de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por IP3 debida al incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  solamente se ha observado cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  alcanza valores próximos a 10 mM, mientras que la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscila

normalmente en valores entre 300 y 500 nM (Tsunoda, 1993).

Por otro lado, todos estos modelos tienen en contra que no se ha podido demostrar hasta el momento que se produzcan oscilaciones en la concentración de IP<sub>3</sub> (Berridge e Irvine, 1989). Además no explican cómo niveles constantes de este mensajero intracelular pueden producir oscilaciones de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, hecho corroborado por infusiones intracelulares de su análogo no metabolizable IP<sub>3</sub> (Wakui y cols., 1989), al igual que ocurre al aumentar experimentalmente la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Berridge, 1990; Petersen, 1992). Incluso hay agonistas que pueden inducir oscilaciones en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> sin producir cambios detectables en el nivel de IP<sub>3</sub>, fenómeno que se observa tras el tratamiento de las células con JMV-180, agonista de los receptores de alta afinidad de la CCK, el cual induce oscilaciones en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Matozaki y cols., 1990). Más aún, el inhibidor de la PLC, U73122, no inhibe las oscilaciones inducidas por JMV-180 (Yule y Williams, 1992). Consecuentemente existen otros mecanismos implicados en la generación de las oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> intracelular; por ejemplo, el ácido araquidónico (Tsunoda y cols., 1996b) y las esfingosinas producen oscilaciones (Yule y cols., 1993) al igual que otros candidatos a mensajeros intracelulares, como la ADP ribosa cíclica (Thorn y cols., 1994).

En las oscilaciones controladas por segundos mensajeros el argumento clave es el fenómeno de la liberación de calcio inducida por calcio ("calcium induced calcium release", CICR) (Berridge, 1988). El IP<sub>3</sub> es capaz de liberar una pequeña cantidad del Ca<sup>2+</sup> de los depósitos, existiendo un depósito sensible y otro insensible a IP<sub>3</sub>, y se ha sugerido que el Ca<sup>2+</sup> liberado desde el primero desencadena la liberación desde el segundo (Petersen y Wakui, 1990), produciéndose lapsos entre cada liberación como consecuencia del tiempo necesario para su recarga. Evidencias que apoyan este modelo se han obtenido de experimentos en los que incrementando artificialmente la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> con inyecciones de Ca<sup>2+</sup> o mediante el tratamiento con ionóforos, se originan oscilaciones (Osipchuk y cols., 1990; Wakui y cols., 1990; Wakui y Petersen, 1990).

También se ha observado que la cafeína, un agente que libera Ca<sup>2+</sup> con independencia de la formación de IP<sub>3</sub>, puede afectar a las oscilaciones e incluso, en ocasiones, inducir las por sí misma (Osipchuk y cols., 1990).

Es necesario tener en cuenta el proceso de entrada de Ca<sup>2+</sup> procedente del medio extracelular a la hora de explicar los ciclos, ya que ésta es necesaria para la recarga de los depósitos intracelulares. De todas formas, la complejidad de las oscilaciones que se producen en los diferentes tipos celulares que se han estudiado hasta ahora induce a pensar que en una misma célula se desarrollen distintos mecanismos compatibles entre sí.

Existen especulaciones acerca de la significación funcional que pueden representar las oscilaciones descubiertas en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> ante la estimulación con

secretagogos. En otros tejidos se las ha relacionado con procesos tan dispares como secreción, aprendizaje y memoria (Berridge y Gallione, 1988). Pero en el caso del páncreas exocrino, así como en otros muchos tejidos donde también se han descrito oscilaciones, el significado de este fenómeno aún no se conoce con certeza, aunque se le ha relacionado con el control de la secreción fluida y de enzimas. Probablemente una señal oscilante sea más fácil de controlar y modular que una sostenida, evitándose además los posibles efectos tóxicos que presentaría un aumento continuado en la  $[Ca^{2+}]_i$ .

#### *Aspectos espaciales de la señal de $Ca^{2+}$ .*

Recientemente la determinación de la  $[Ca^{2+}]_i$  mediante el empleo de técnicas de análisis digital de imágenes y microscopía láser confocal ha proporcionado interesantes datos sobre la propagación de la señal de  $Ca^{2+}$  a lo largo de la célula acinar. Estos resultados han revelado que la señal de calcio se inicia en el polo luminal de la célula y posteriormente se extiende a modo de ola hacia el polo basal (Toescu y cols., 1992a). La importancia de este fenómeno se desconoce por el momento, pero parece reflejar la localización del punto inicial de liberación de  $Ca^{2+}$ , debido a la mayor concentración de receptores de IP3 o una mayor sensibilidad al IP3.

El modelo de la CICR puede explicar las ondas de propagación espacial del  $Ca^{2+}$ . Si los depósitos tienen la adecuada disposición a lo largo de la célula, este mecanismo podría ser el responsable de la aparición de las ondas. Esto ha sido propuesto para el páncreas exocrino (Petersen, 1992) y otros modelos celulares como hepatocitos (Berridge, 1990) y oocitos, donde estas ondas presentan la forma de espirales (Lechleiter y Clapham, 1992). Incluso se ha descrito la existencia de espigas locales de  $Ca^{2+}$  que solamente si presentan suficiente amplitud se propagarían a lo largo del citosol (Petersen, 1992). Esta liberación local de  $Ca^{2+}$  en el polo luminal, donde se acumulan los gránulos de zimogeno, produciría o facilitaría su exocitosis (Petersen y cols., 1994).

Schulz y cols (1989) relacionaron el modelo de los dos depósitos con el sistema de captación de  $Ca^{2+}$  en su interior: un aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  hace que se incremente su acumulación en el depósito sensible a IP3, con lo cual salen protones ( $H^+$ ) que se intercambian por  $Ca^{2+}$  estimulando su transporte activo hacia el interior del depósito. Esto llevaría a la reducción del pH local alrededor del depósito, que afectaría al segundo de ellos, el insensible a IP3, liberando su  $Ca^{2+}$ . El IP4 cooperaría en la entrada de  $Ca^{2+}$  en el interior del primer depósito desde el segundo y/o desde el medio extracelular, al igual que lo haría el GTP.

No está claro cuál es el significado fisiológico de este fenómeno, pero parece

ser un modo de coordinar y extender ordenadamente la información a los distintos puntos del interior celular.

#### *Entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular.*

Con anterioridad nos hemos referido a la importancia de la presencia de Ca<sup>2+</sup> en el medio extracelular para el mantenimiento de la respuesta sostenida de Ca<sup>2+</sup> en las células acinares pancreáticas. Así, debe existir un incremento en la permeabilidad de la membrana celular al Ca<sup>2+</sup> que esté en estrecha relación con el mecanismo de recarga de los depósitos intracelulares. El mecanismo que subyace a la entrada de Ca<sup>2+</sup> en las células acinares pancreáticas es poco conocido. La entrada de Ca<sup>2+</sup> se produce a través de canales independientes de voltaje, ya que no es sensible al potencial de membrana o a bloqueantes orgánicos de los canales de Ca<sup>2+</sup>, como la nifedipina o el verapamil. Esta entrada es bloqueada por los iones La<sup>3+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Co<sup>2+</sup> (Pandol y Schoeffield-Payne, 1987; Tsunoda, 1990), lo que parece indicar que la entrada de Ca<sup>2+</sup> en las células acinares pancreáticas se produce a través de canales no específicos para el Ca<sup>2+</sup>, a diferencia de otras células en las que existen varios tipos de canales para este ion (Tsien y Tsien, 1990). También existe sensibilidad al pH extracelular (pH<sub>0</sub>): la entrada de Ca<sup>2+</sup> se ve favorecida en medio alcalino mientras que se reduce en los medios ácidos (Muallem y cols., 1989; Tsunoda y cols., 1990).

Existen algunas hipótesis que intentan explicar este proceso; en ellas se contempla la posibilidad de que exista algún canal no específico de este catión activado por IP<sub>3</sub> en la membrana de la célula (Kuno y Gardner, 1987), aunque se ha propuesto también que el IP<sub>3</sub> y el IP<sub>4</sub> podrían actuar paralelamente para permitir la entrada de Ca<sup>2+</sup> y la recarga de los depósitos intracelulares a través de un canal localizado en la membrana plasmática (Berridge e Irvine, 1989; Irvine, 1992).

Otro mensajero intracelular, la guanosina monofosfato cíclica (GMPc), formada en respuesta a un aumento de óxido nítrico (NO) producido por los secretagogos que movilizan Ca<sup>2+</sup> (Gukovskaya y Pandol, 1994), podría estar implicada en este proceso. Finalmente, alguno de los acontecimientos que suceden a la activación de la PLC y PKC han sido implicados en el control de la entrada de Ca<sup>2+</sup>, así como el ácido araquidónico (AA) y el citocromo P-450 (para una revisión ver Tsunoda, 1993). Otros han identificado un pequeño compuesto de peso molecular inferior a 500, aniónico y fosforilado que activa la entrada de Ca<sup>2+</sup> (Randriamampita y Tsien, 1993), que han denominado “factor para la entrada de Ca<sup>2+</sup>” (CIF) y que se piensa es generado en aquellas células cuyos depósitos de Ca<sup>2+</sup> se van vaciando tras la respuesta a algún estímulo. Aún así, no hay consenso sobre el mecanismo que realmente está actuando en este proceso. Sin embargo, en muchos tipos de células, parece estar firmemente

establecido que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  está regulada por el grado de vaciamiento de los depósitos, denominado modelo capacitativo para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Putney, 1986; 1990); esto es, cuando los agonistas liberan el  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos, este vaciamiento abre el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática mediante algún mecanismo aún desconocido. Recientemente se ha propuesto un posible papel de las tirosinas cinasas en el proceso de entrada capacitativa de calcio, ya que Yule y cols., en 1994, demuestran que diferentes inhibidores de las tirosinas cinasas disminuyen la entrada de calcio en la célula (Yule y cols., 1994).

Recientemente se ha propuesto un fenómeno que podría tener gran implicación en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol y que se ha denominado corrientes activadas por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (CRAC) (Clapham, 1993), que se caracteriza por presentar alta selectividad para el ion  $\text{Ca}^{2+}$ , conductancia baja (20 femtoS) y poca o ninguna dependencia del voltaje. Por el contrario, el grupo de Schulz en Alemania tiene evidencias de que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células acinares pancreáticas tiene lugar a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  no selectivos, proceso que han denominado CRANC (Krause y cols., 1996).

#### *Recarga de los depósitos de $\text{Ca}^{2+}$ .*

En el modelo que nos ocupa y en otros tejidos, como la glándula parótida, se ha caracterizado el mecanismo por el que el depósito acumula  $\text{Ca}^{2+}$ . Bajo estimulación intensa, los depósitos permanecen vacíos durante el tiempo que el estímulo está actuando, de manera que su recarga es necesaria para una posterior respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este proceso requiere la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular y la retirada del estímulo. El tiempo requerido para este proceso varía de unos tipos celulares a otros, estando entre 7 y 15 minutos en el caso de las células acinares pancreáticas (Stuenkel y cols., 1989). En la mayoría de los casos, la recarga de los depósitos se produce con un nivel constante de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico próximo o igual al de reposo (Pandolf y cols., 1987; Stuenkel y cols., 1989). Cuando las células se someten a concentraciones de secretagogos, como la CCK, consideradas fisiológicas, la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  muestra oscilaciones, en cuya causa parece intervenir la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  por los depósitos intracelulares (Petersen y cols., 1991).

Se han sugerido dos posibles mecanismos por los que los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  se recargan: la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol y su transporte sincronizado hacia el interior de los depósitos, y un segundo según el cual existe recarga directa desde el medio extracelular (Putney, 1986).

Los estudios realizados mediante el empleo de inhibidores de las bombas celulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y de protones indican que el depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a  $\text{IP}_3$  tiene

una bomba de  $H^+$  que crea un gradiente ácido en su interior, que es la fuerza motriz para captar el  $Ca^{2+}$  por medio de un intercambiador  $Ca^{2+}/H^+$ . Al parecer, este intercambio también puede realizarse por medio de un proceso dependiente de  $Mg^{2+}$  y ATP. El depósito no sensible a  $IP_3$  acumula el  $Ca^{2+}$  a través de una bomba de  $Ca^{2+}$  dependiente de ATP, captando  $Ca^{2+}$  cuando su concentración es cercana a la de reposo (Schulz y cols., 1989).

En otros modelos, para que la captación de  $Ca^{2+}$  se produzca, es necesaria la presencia de  $K^+$  en el lado citosólico, que se acumularía en el depósito para ser intercambiado por el  $Ca^{2+}$  cuando éste pasa a su interior (Muallem, 1989). Este mecanismo es compatible con la descripción del mecanismo de actuación del  $IP_3$ , que necesita  $K^+$  para liberar  $Ca^{2+}$  (Muallem y cols., 1985). El anión  $Cl^-$  es probablemente intercambiado con el  $K^+$ .

Continúa existiendo la duda sobre si la entrada de  $Ca^{2+}$  se produce de manera directa desde el exterior al depósito sin pasar por el citoplasma, o si pasa primero por éste. Muallem y cols (1990) han encontrado en las células acinares pancreáticas que el depósito capta  $Ca^{2+}$  citosólico, y no directamente desde el medio extracelular. Por otro lado, Putney y cols (1989) encontraron que el  $Ca^{2+}$  atravesaba el citosol, lo que hace que se detectaran pequeñas elevaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$  durante el proceso de recarga.

Algunas investigaciones sugieren que el  $Ca^{2+}$  entra primero en un depósito intracelular y luego es transportado a un segundo depósito desde el que es liberado en respuesta a los agonistas, momento en el que actuarían el  $IP_4$  o algún otro mensajero intracelular (Tsunoda, 1993).

De todos modos hay que tener ciertas reservas al considerar estas teorías ya que se basan en resultados procedentes de distintos tipos celulares.

#### *Relación entre $[Ca^{2+}]_i$ y pH.*

En todas las células animales la  $[Ca^{2+}]_i$  basal está en torno a 100 nM, y el  $pH_i$  alrededor de 7.2. Tras la estimulación de las células se producen cambios en ambos parámetros, de manera que podrían estar íntimamente relacionados.

Meech y Thomas, en 1980, realizaron experimentos en los que encontraron que tras la inyección de  $Ca^{2+}$  en neuronas se producía una caída en el  $pH_i$ , lo cual era seguido de una posterior recuperación. Explicaron este fenómeno por la posible existencia de un intercambio de  $Ca^{2+}$  por  $H^+$  en las mitocondrias, como también habían descrito anteriormente otros autores en sus trabajos con mitocondrias aisladas (Chance, 1965). Pero el efecto contrario también se ha observado: una acidificación del citoplasma producida mediante inyección de  $H^+$ , conduce a un incremento en la

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> posiblemente por producirse un intercambio del Ca<sup>2+</sup> por los H<sup>+</sup> existentes en la mitocondria u otro orgánulo citoplasmático (Rink y cols., 1980). En 1981 Roos y Boron concluyeron que la caída en el pHi podría: (1) inhibir la entrada de Ca<sup>2+</sup> en los depósitos intracelulares, (2) conducir a la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde estos depósitos y/o (3) desplazar el Ca<sup>2+</sup> desde algún orgánulo intracelular o desde una proteína ligadora de Ca<sup>2+</sup>.

Así, por ejemplo, en células musculares una reducción en el pHi facilita la salida de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo sarcoplásmico (Orchard y cols., 1987). En el acoplamiento estímulo-secreción la administración de gastrina y trombina conduce a la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos intracelulares en células parietales y plaquetas (Tsunoda y cols., 1991), proceso asociado a una acidificación del citosol. También en neutrófilos, plaquetas y células parietales, la administración de un ionóforo (nigericina) que disipa el potencial de membrana e incrementa el intercambio K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, conduce a una disminución del pHi por anulación del gradiente de K<sup>+</sup> y de H<sup>+</sup> (Reuss y cols., 1984). Esta reducción en el pHi lleva asociada un incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Tsunoda y cols., 1991). En neutrófilos, la acidificación del citoplasma por medio de ácido propiónico, que reduce el pHi, promueve la movilización de Ca<sup>2+</sup> (Naccache y cols., 1988).

De esta forma, la acidificación del citosol podría funcionar como una fuerza que dirige los H<sup>+</sup> hacia los depósitos intracelulares, con un transporte de iones Ca<sup>2+</sup> en sentido opuesto por medio de un sistema que podría ser un intercambiador Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> o canales de Ca<sup>2+</sup> sensibles a H<sup>+</sup>. Tsunoda en 1990 encontró que las oscilaciones de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en células acinares pancreáticas son sensibles a los cambios de pHi: una acidificación del medio intracelular mediante la administración de un pulso de NH<sub>4</sub>Cl hacía que aumentara transitoriamente la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en células que presentaban una respuesta oscilatoria a 20 pM de CCK, y se eliminaba el patrón oscilatorio. Una nueva aplicación de NH<sub>4</sub>Cl hacía que la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se redujera hasta el valor basal, proceso que explicó en términos de un transporte de Ca<sup>2+</sup> hacia los depósitos. Cuando empleó ácido propiónico, la acidificación del citosol no originaba cambios en el patrón oscilatorio de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> ante la respuesta a la CCK, pero la alcalinización que se producía cuando era retirado el ácido propiónico tenía como resultado una reducción en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> e inhibía las oscilaciones.

Estos resultados, junto con los obtenidos en los experimentos realizados también en células acinares pancreáticas por Muallem y Loessberg (1990), en los que agonistas que median su acción a través de la vía del Ca<sup>2+</sup> intracelular provocaban cambios en el pHi por actuación sobre los mecanismos de transporte de iones, han llevado a pensar que la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos y la recarga de los mismos podría requerir un flujo compensador de H<sup>+</sup> en la dirección opuesta al

movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  para mantener la electroneutralidad (Thevenod y cols., 1989b).

Tsunoda en 1993 propone que la reducción en el  $\text{pH}_i$  tiene como resultado un aumento en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  procedente del medio extracelular, mientras que si es el  $\text{pH}$  extracelular el que es ácido con respecto al intracelular se produce una inhibición de este flujo de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Este comportamiento sugiere que el sistema de transporte encargado de estos cambios de  $\text{Ca}^{2+}$ , paralelos a los del  $\text{pH}$ , podría estar situado tanto en la membrana celular como en la de algún orgánulo intracelular.

De igual manera que la acidificación promueve la activación de un posible intercambiador situado en la membrana de algún depósito intracelular, pudiera ocurrir que existan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana cuya actividad fuera sensible al  $\text{pH}_i$ . En células LLC-PK1 el tratamiento con nigericina conduce a un aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Burns y cols., 1991); este efecto se ve inhibido por verapamil, sugiriendo que el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  procede de un aumento en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana celular. En las células acinares pancreáticas, la alcalinización del medio extracelular hace que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula en respuesta a los agonistas se incremente, y esta entrada es inhibida por cationes como  $\text{La}^{3+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ . Por el contrario, una reducción en el  $\text{pH}_0$  conduce a una menor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las mismas células (Muallem y cols., 1989; Tsunoda y cols., 1990). Por tanto, en el acoplamiento estímulo-secreción la apertura de canales para  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana celular parece estar regulada por  $\text{H}^+$  que actúan en la cara exterior de la misma.

Teniendo en cuenta estos hallazgos, sería posible que aquellas variaciones que se producen en el  $\text{pH}_i$  o en el  $\text{pH}$  del interior de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando las células han sido estimuladas por agonistas podrían tener alguna influencia sobre la cinética de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que pudieran existir en sus membranas. En el RE de las células acinares pancreáticas y de glándula parótida se ha propuesto la existencia de un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a  $\text{pH}$  (Kremmer y cols., 1987). Cuando el  $\text{pH}$  del interior del retículo está por debajo del valor de reposo el canal está cerrado, mientras que si el  $\text{pH}$  aumenta el canal se abre y permite la salida de  $\text{Ca}^{2+}$ . En un estudio posterior Schulz y cols (1989) proponen la existencia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , presentes en el depósito insensible a  $\text{IP}_3$ , que podrían ser sensibles a una alcalinización en la proximidad regional de la membrana de este depósito. Esta alcalinización sería el resultado de la actuación de una bomba de  $\text{H}^+$  localizada en la membrana del depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a  $\text{IP}_3$  y que crea un gradiente de  $\text{H}^+$  a través de la membrana de este depósito de manera que un intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ , también situado en la membrana de este depósito, se encargaría de la recarga del mismo. Los resultados obtenidos por otros investigadores (Levy y cols., 1990) también apoyan la hipótesis de que el mecanismo de acumulación del  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de sus depósitos intracelulares podría ser un intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ .

A pesar de que existen bastantes datos que indican que una acidificación del citosol conduce a un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , el efecto contrario también ha sido descrito. La alcalinización del citosol de células endoteliales de bovino promueve una liberación de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos accesibles a los agonistas (Danthuruli y cols., 1990).

González y cols (1997a) han demostrado que la movilización de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos intracelulares en células acinares pancreáticas, observada tras la estimulación con los agonistas CCK-8 y ACh, está acompañada por una disminución del pH intracelular. Además, esta acidificación es totalmente dependiente de la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos intracelulares. Se demuestra además en este trabajo que este fenómeno está mediado principalmente por la activación de un intercambiador  $Ca^{2+}/H^+$  localizado en la membrana plasmática.

Estos mismos autores (González y cols., 1997b) también demuestran que las señales de  $Ca^{2+}$  en las células acinares pancreáticas requieren la existencia de gradientes subcelulares de pH.

### ***2.3.2.4 Nucleótidos cíclicos.***

#### ***Adenosina monofosfato cíclica (AMPC).***

Junto con la vía del  $Ca^{2+}$ , el AMPC parece jugar un importante papel en la regulación de las respuestas secretoras pancreáticas (Hootman y Williams, 1987). Este hecho se basa en las siguientes evidencias: (1) varias hormonas y neurotransmisores, que estimulan la secreción, producen un incremento en los niveles de AMPC; (2) análogos sintéticos del AMPC tales como el dibutiril-AMPC o el 8-Br-AMPC, estimulan también la secreción de proteínas y electrolitos en células pancreáticas y (3) la estimulación de la adenilato ciclasa (AC) o la inhibición de la fosfodiesterasa conducen ambas a un incremento en la actividad secretora de las células acinares (Hootman y Williams, 1987).

Los péptidos de la familia de la secretina (secretina, VIP y glucagón) estimulan la secreción en las células acinares pancreáticas mediante la modulación de la vía del AMPC. En suspensiones de acinos pancreáticos (Korman y cols., 1980) o de células aisladas (Robberecht y cols., 1976) de cobaya, tanto la secretina como el VIP incrementan los niveles de AMPC citosólico entre 8 y 30 veces el nivel basal. En presencia del inhibidor de la fosfodiesterasa, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), se produce un mayor incremento en los niveles de AMPC (Gardner y cols., 1983). La elevación observada en los niveles de AMPC en respuesta a secretina y VIP es el resultado de la activación de la AC localizada en la membrana de las células acinares

pancreáticas (Robberecht y cols., 1982).

Igualmente, se ha podido comprobar que otros compuestos como el PHI (Jensen y cols., 1981), el rhGRF, y el PACAP (Raufman y cols., 1991) actúan como reguladores endógenos incrementando los niveles de AMPc. De manera similar se ha observado que autacoides como la histamina también pueden participar en la síntesis de AMPc (Lajas y cols., 1995; Camello y cols., 1997).

La CCK a altas concentraciones igualmente puede activar la AC pancreática, pero este efecto no parece estar relacionado con su papel fisiológico (Bruzzzone, 1990).

Compuestos que estimulan la actividad de la AC o que inhiben la de la fosfodiesterasa también afectan al metabolismo del AMPc. La toxina del cólera es capaz de elevar los niveles de AMPc en acinos pancreáticos de cobaya (Gardner y Rottman, 1979) y de rata (Pan y cols., 1982) por modificación covalente de la proteína Gs asociada a la AC. La forskolina, un diterpeno aislado de la raíz de *Coleus* sp, es un potente activador de la AC, elevando hasta 30 veces los niveles de AMPc citosólico en células acinares pancreáticas de rata (Heysler, 1983).

Los inhibidores de la fosfodiesterasa como la isobutil metil xantina (IBMX), la teofilina y el Ro 20-174, presentan por sí mismos pequeños efectos sobre el metabolismo del AMPc, pero son capaces de potenciar en gran medida los efectos que sobre éste presentan la secretina o el VIP (Gardner y cols., 1983).

Este papel no sólo es aplicable al tejido acinar propiamente dicho, sino que el AMPc también es un mensajero en el caso de las células ductulares del páncreas (Schulz, 1987), que además son más sensibles a la estimulación con secretina (Milutinovic y cols., 1977), siendo el AMPc el mensajero intracelular limitante para la producción de fluido y electrolitos en el páncreas (Kepen y cols., 1975). También hay una serie de secretagogos que pueden inhibir la vía del AMPc, como ocurre con la somatostatina y la ACh (Singh, 1985).

El mecanismo efector de este nucleótido cíclico es la activación de una cinasa dependiente de AMPc, la proteína cinasa A (PKA). Esta enzima se ha localizado en el tejido pancreático y hormonas como la secretina y el VIP, pero no la CCK, incrementan su actividad (Jensen y Gardner, 1978). Existe menos información para el patrón de fosforilación producido por la PKA que en el caso de las cinasas activadas por la ruta de los fosfolípidos de inositol. Se sabe que fosforila una serie de proteínas en las células del páncreas, cuya identidad es desconocida, siendo diferentes a las que se fosforilan por el Ca<sup>2+</sup> y la PKC (Hootman y Williams, 1987).

Inicialmente en el cobaya y posteriormente en la rata y el ratón, se ha podido comprobar que los secretagogos que actúan incrementando los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular y los que lo hacen aumentando el AMPc pueden potenciar sus efectos

(Pozo y cols., 1995; Alcón y cols., 1996). Sin embargo, esta potenciación no afecta a todas las respuestas celulares: está muy bien establecida para la secreción enzimática pero no ocurre así para el transporte de  $\text{Na}^+$ , donde el efecto es aditivo, ni para el transporte de glucosa donde el efecto estimulador ocasionado por los agentes que actúan incrementando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  no se ve modificado por adición de VIP (Burnham y cols., 1984).

#### *Guanosina monofosfato cíclica (GMPc).*

Otro posible mensajero intracelular es el GMPc. Este nucleótido se forma por la acción de la enzima guanilato ciclase y es metabolizado por una fosfodiesterasa de manera similar a como ocurre con el AMPc. Igualmente, existe una cinasa dependiente de GMPc, análoga a la PKA para el AMPc, que media su acción (Tremblay y cols., 1988).

Los niveles intracelulares de este nucleótido se incrementan tras la estimulación con ACh, CCK y los ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Kapoor y Krishna, 1978), aunque su papel en la secreción pancreática está bastante menos establecido que el del AMPc (Tremblay y cols., 1988). La elevación de los niveles citoplasmáticos de GMPc, mediante el empleo de derivados no metabolizables como el dibutilil- GMPc o el 8-Br- GMPc, o activando la guanilato ciclase con nitrosurea o nitroprusida, no presenta efectos sobre el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  ni sobre la secreción de amilasa (Menozzi y cols., 1989).

Por tanto el incremento en los niveles de GMPc en respuesta a los secretagogos fisiológicos (CCK y ACh) parece ser secundario al incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Por ahora no hay un papel claramente definido para el GMPc en las células acinares pancreáticas, aunque se ha propuesto un papel mediador en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Pandol y Schoeffiel-Payne, 1990).

#### ***2.3.2.5 Otros mensajeros intracelulares.***

Cuando se estimula el páncreas con un secretagogo, es posible la formación de otros metabolitos, además del DAG, algunos de los cuales se sintetizan a partir de este último. Diversos autores han descrito que tras la administración de los secretagogos se produce un incremento en la producción de ácido araquidónico (AA) (Pandol y cols., 1991). Este compuesto es liberado secuencialmente a partir de los fosfatos de inositol tras la actuación secuencial de una PLC y una diacilglicerol lipasa. A concentraciones elevadas de secretagogos también se activa la PLA<sub>2</sub>, que hidroliza la fosfatidilcolina además de otros fosfatos de inositol, generando AA. Estudios posteriores llevados a cabo por Hou y cols (1996a) han demostrado que la ceruleína estimula la producción de AA en acinos pancreáticos a través de la PLC y la DAG lipasa, sin intervención de

la PLA2 o la PLD.

La adición de AA a acinos pancreáticos *in vitro* estimula ligeramente la secreción de amilasa (Pandol y cols., 1991) e incrementa la  $[Ca^{2+}]_i$  independientemente de IP3 (Tsunoda y Owyang, 1995). En acinos pancreáticos de rata, este compuesto es capaz de incrementar la secreción de amilasa solamente cuando se administra a elevadas concentraciones (Stenson y Lobos, 1982). Pero también se han descrito efectos inhibidores sobre la secreción pancreática (Maruyama, 1990). Estos estudios revelan que la inhibición producida por la administración de AA se produce como resultado de una disminución en la producción de PIP2 e IP3 inducida por secretagogos. Además el AA causa una deplección en la concentración de ATP (Chaudhry y cols., 1988).

El AA es metabolizado por las células acinares por una ciclooxigenasa y una lipoxigenasa, dando lugar a la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos (Stenson y Lobos, 1982), de los que existen evidencias de su participación como mensajeros intracelulares en los mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción en las células acinares pancreáticas (Yule y Williams, 1994).

Existen otras múltiples rutas intracelulares de acoplamiento estímulo-secreción descritas en el páncreas exocrino. Entre ellas se encuentra la ruta de las GTPasas de bajo peso molecular de la familia Ras, que juegan un papel muy importante en el crecimiento y la transformación celular (Malarkey y cols., 1995). También encontramos la ruta de las GTPasas de bajo peso molecular de la familia Rho, íntimamente relacionadas con la reorganización del citoesqueleto y la formación de fibras de tensión (Symons, 1997). La ruta de las cinasas de las proteínas activadas por la mitogénesis (MAP) juegan un importante papel en el crecimiento y la proliferación celular estimulada por factores de crecimiento, agonistas que activan a las proteínas G de membrana, citoquinas y determinados antígenos (Malarkey y cols., 1995). Tras la activación, las MAP cinasas se translocan hacia el núcleo celular e inician la activación de protooncogenes tales como c-jun (Pulverer y cols., 1991). Otros mecanismos celulares activados por las MAP cinasas incluyen la fosforilación de la proteína p90 ribosomal S6 cinasa (p90s6k), la PLA citosólica, la proteína activada por las MAP cinasas (MAPKAP) y la estimulación del transporte de glucosa (Malarkey y cols., 1995).

### ***2.3.3 Acciones de los mensajeros intracelulares: efectores.***

Se han identificado y caracterizado varios mensajeros intracelulares de las células acinares pancreáticas, pero es comparativamente poco lo que se conoce sobre los mecanismos mediante los que actúan para inducir la exocitosis así como la secreción fluida, la síntesis de proteínas y la expresión de genes.

Todos los mensajeros intracelulares, aunque existen otros mecanismos por los que pueden llegar a este mismo fin, activan proteínas cinasas y fosfatasas y regulan, por tanto, el estado de fosforilación de las proteínas celulares (Cohen, 1985). Además existen datos que apoyan la idea de que los cambios producidos en la fosforilación de proteínas reguladoras están implicados en la mediación de la acción de las hormonas y neurotransmisores en las respuestas celulares de gran número de tejidos.

#### ***2.3.3.1 Proteína cinasa C (PKC).***

La PKC es una proteína ubicua de la cual se han descrito hasta 11 tipos o isoenzimas (a, bI, bII, g, d, e, z, h, q, i y l) hablándose hoy en día de la familia de la PKC (Nishizuka, 1992). Las diferencias existentes entre ellas y su sensibilidad al calcio y al DAG dejan abierta la posibilidad a la existencia de mecanismos selectivos de estimulación de alguno de estos tipos por parte de diferentes agonistas celulares. La PKC fosforila gran variedad de substratos en residuos de serina y treonina.

Existe gran número de indicios que apoyan la idea del papel que la PKC pudiera tener en la regulación de la secreción de enzimas en las células acinares pancreáticas. Tanto formas permeables de DAG como los ésteres del forbol, en particular el TPA (13, acetato de 12, O-tetradecanoil forbol), que presentan estructura parecida a la del DAG, estimulan la secreción de enzimas y aumentan la estimulada por calcio en células intactas (Hootman y Williams, 1987; Bruzzone, 1990; Camello y cols., 1993).

Una estimulación prolongada de la enzima con ésteres de forbol se sabe que reduce la actividad de la misma, proceso conocido con el nombre de down regulation, que consiste en una reducción de la cantidad de enzima. Se cree que esto tiene relación con la proteólisis de la molécula (Jaken, 1989), que libera la zona catalítica y aumenta la actividad fosforiladora. Otra modificación experimentada por la PKC es un proceso de autofosforilación (Jaken, 1989), que incrementa su actividad, por lo que es posible un mecanismo de retroalimentación.

Las funciones propuestas para la PKC en diferentes respuestas celulares son muy amplias (Rana y Hokin, 1990). Hay una gran variedad de datos que muestran su papel inhibitor de la señal de calcio en diversos modelos, incluyendo la secreción

pancreática (Arita y cols., 1991). En esta última se ha propuesto como punto de interacción la liberación de calcio y la inactivación de los receptores y/o las proteínas G.

Los ésteres de forbol pueden estimular la actividad de la bomba de Na<sup>+</sup> (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa) de las células acinares pancreáticas (Hootman y Williams, 1987), además de la salida de calcio citosólico (Muallem, 1989). También se ha descrito un incremento en los niveles de ácido araquidónico a cargo de la PKC, a través de la activación de la PLA<sub>2</sub> (Pandol y cols., 1991). La actividad del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> se ve estimulada por su fosforilación en respuesta a la estimulación de las células con factores de crecimiento, ésteres de forbol, ácido ocaidaico y suero fetal bovino, y se ha implicado en esta fosforilación a la PKC (Yun y cols., 1995).

En otros modelos, por el contrario, parece tener una acción cooperadora, ya que puede activar canales de entrada de calcio extracelular dependientes de voltaje (Rana y Hokin, 1990); esto no ocurre en el páncreas exocrino, en donde estos canales no existen. Esta cooperación entre calcio y PKC ha dado lugar a la propuesta de Rasmussen (Rasmussen y cols., 1986) según la cual, tras actuar inicialmente el calcio liberado por el IP<sub>3</sub>, la respuesta estaría apoyada por la actividad de la PKC (estimulada por el mismo calcio).

Otro papel asignado a la PKC es la modulación del sistema del AMPc. Swandito y cols (1989) trabajando con acinos pancreáticos observaron que el TPA producía un incremento en los niveles de AMPc citosólico inducidos por VIP, y propusieron que se debía a una modulación de las proteínas G<sub>s</sub> o G<sub>i</sub> controladoras de la adenilato ciclasa.

### ***2.3.3.2 Proteínas cinasas activadas por nucleótidos cíclicos.***

Todos los efectos conocidos del AMPc son llevados a cabo a través de la activación de una proteína cinasa A (PKA) activada por dicho nucleótido cíclico. La unión del AMPc a la subunidad reguladora de esta proteína cinasa conduce a la disociación y activación de la subunidad catalítica (Ederveen y cols., 1989). Jensen y Gardner en 1978 diferenciaron entre proteínas cinasas activadas por AMPc y activadas por GMPc.

Existen en el páncreas dos isoformas de la proteína cinasa activada por AMPc, las isoenzimas I y II, las cuales se diferencian en sus subunidades reguladoras (Nigam y Blobel, 1989).

En 1978, Jensen y Gardner demostraron que tanto la secretina como el VIP son capaces de activar la PKA con una muy buena correlación de dicha activación con los

incrementos en los niveles de AMPc. Sin embargo se ha demostrado que concentraciones fisiológicas de CCK no incrementan la actividad de dicha proteína, únicamente a concentraciones supramáximas se ha observado que la CCK puede activar la PKA, relacionado con el incremento en los niveles de AMPc observados a esas concentraciones, y a las que no se ha encontrado significación fisiológica (Willems y cols., 1987).

Se ha encontrado que la CCK no modifica el efecto del VIP o la secretina en la activación de la cinasa dependiente de AMPc, lo que puede llevar a pensar que el efecto potenciador de estos secretagogos no se produce a este nivel (Yule y Williams, 1994).

Los sustratos de la PKA son totalmente desconocidos, pero todavía se conoce menos acerca de la proteína cinasa activada por GMPc que se ha descrito en células acinares (Yule y Williams, 1994).

### ***2.3.3.3 Proteínas cinasas y fosfatasas activadas por $Ca^{2+}$ -Calmodulina.***

Aunque la unión del  $Ca^{2+}$  directamente a una enzima es posible, la mayoría de las acciones del  $Ca^{2+}$  son iniciadas por la unión a proteínas sin actividad enzimática. Con la excepción de la troponina en el músculo esquelético, la proteína a la que suele unirse el  $Ca^{2+}$  en la mayoría de las ocasiones es la calmodulina (Klee y cols., 1986). La calmodulina es una proteína ubicua con carácter ácido y 19.000 KDa de peso molecular, que une 4 moles de  $Ca^{2+}$  por cada mol de proteína. La unión del  $Ca^{2+}$  se produce inicialmente en dos sitios localizados en el extremo carboxilo terminal de la molécula, para posteriormente unirse con baja afinidad a otros dos lugares de unión localizados en el extremo amino terminal (Klee y cols., 1986).

La calmodulina es responsable de la activación de una gran variedad de enzimas en el páncreas, incluyendo cinasas, una fosfatasa y una nucleótido cíclico fosfodiesterasa.

Se han distinguido hasta 7 cinasas activadas por  $Ca^{2+}$ -calmodulina. Algunas de ellas como la  $Ca^{2+}$ -calmodulina cinasa II pueden fosforilar una gran cantidad de proteínas, actuando por tanto como una proteína cinasa multifuncional (Colbran y cols., 1989).

Se han identificado cuatro de estas proteínas en el páncreas: la cinasa de la cadena ligera de miosina (Bissonette y cols., 1989), la  $Ca^{2+}$ -calmodulina cinasa I (Nairn y cols., 1985),  $Ca^{2+}$ -calmodulina cinasa II (Gorelick y cols., 1983) y la  $Ca^{2+}$ -calmodulina cinasa III (Nairn y cols., 1985). La  $Ca^{2+}$ -calmodulina cinasa I fue inicialmente aislada por su capacidad para fosforilar una proteína de las vesículas

sinápticas, la sinapsina I. La Ca<sup>2+</sup>-calmodulina cinasa II fue aislada a principios de los 80 y la forma pancreática consiste en una única subunidad de 50 KDa y presenta una reacción inicial de fosforilación intramolecular previa a la fosforilación de sustratos exógenos que aún no han sido identificados (Gorelick y cols., 1983). Estudios recientes han demostrado que la proteína fosfatasa 1 participa en la defosforilación de la Ca<sup>2+</sup>-calmodulina cinasa II, oponiéndose a la teoría que sugería que esta proteína presentaba actividad autónoma (Hwang y cols., 1996). La Ca<sup>2+</sup>-calmodulina cinasa III, de 140 KDa, se sabe que es relativamente específica para su sustrato, el factor 2 de elongación, una proteína de 100 KDa que está relacionada con la traslación ribosomal de ARNm (Nairn y Palfrey, 1987). Cuando este factor es fosforilado la eficiencia de la traslación disminuye significativamente. El papel fisiológico de esta proteína podría estar relacionado con el efecto de las altas concentraciones de CCK para inhibir la síntesis de proteínas (Yule y Williams, 1994). La cinasa de la cadena ligera de miosina es una proteína de 138 KDa cuya actividad se cree responsable de la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina observada en acinos pancreáticos estimulados por CCK (Burnham y cols., 1988).

#### ***2.3.3.4 Proteína fosfatidilinositol 3'-cinasa (PI3-cinasa).***

La fosfatidilinositol 3'-cinasa (PI3-cinasa) es una cinasa lipídica que fosforila el fosfatidilinositol y sus derivados en la posición 3 del anillo de inositol dando lugar a la formación de Ins(3)P, Ins(3,4)P<sub>2</sub> e Ins(3,4,5)P<sub>3</sub>. Sus funciones biológicas no están claras, si bien, la elevación en los niveles de los productos de la PI3-cinasa se ha relacionado con la proliferación y la transformación celular (Chen y Guan, 1994).

La PI3-cinasa presenta dos dominios, denominados subunidades p85 y p110. La PI3-cinasa se une a los receptores de los factores de crecimiento a través de la subunidad p85, en tanto que la subunidad p110 presenta el dominio catalítico (Malarkey y cols., 1995). Existe una íntima relación entre los receptores de los factores de crecimiento y la PI3-cinasa.

Recientemente se ha descrito una proteína que puede actuar como segundo mensajero de la PI3-cinasa, una proteína serina-treonina cinasa de 60 KDa que se ha denominado Akt/PKB (Bos, 1995). El dominio carboxilo terminal de esta proteína es una cinasa relacionada con la proteína cinasa A y con la proteína cinasa C, mientras que el dominio amino terminal es una secuencia de unos 100 aminoácidos identificado inicialmente en la proteína que le da nombre y que posteriormente se ha identificado en otras 70 proteínas más, entre las que se encuentran serina-treoninas y tirosinas cinasas, distintas isoformas de la PLC, GTPasas, factores intercambiadores de

nucleótidos y componentes del citoesqueleto (Mayer y cols., 1993).

No se sabe mucho acerca de los posibles sustratos de la Akt/PKB. Hasta la fecha sabemos que cuando dicha proteína está inactiva se encuentra en forma dimérica. Tras la llegada de un estímulo, el fosfatidilinositol 3 fosfato induce el paso a la forma monomérica. Es en esta forma en la que la Akt/PKB puede ser fosforilada y activada (Bos, 1995). Un posible sustrato de la Akt/PKB es la proteína p70s6k cinasa, aunque no se sabe con exactitud si la Akt/PKB fosforila directamente a dicha cinasa (Bos, 1995), pero está descrito que la PI3-cinasa participa como regulador en la activación de la p70s6k cinasa por la CCK-8 en células acinares pancreáticas (Bragado y cols., 1997).

Además de la descrita relación de la PI3-cinasa con los receptores de los factores de crecimiento, recientemente se ha demostrado que la unión de la CCK-8 a su receptor, posiblemente tras la activación de determinadas tirosinas cinasas de membrana, puede activar la PI3-cinasa (Rivard y cols., 1994). Rivard y col (1995) han demostrado que la inhibición de la PI3-cinasa con wortmanina no tuvo ningún efecto en la secreción pancreática estimulada por CCK-8, sino más bien, estaría relacionada con sus efectos tróficos. En contraste con lo anteriormente descrito, Tsunoda y cols (1996a) han demostrado que la unión de la CCK a su receptor activa la PI3-cinasa a través de una ruta donde participa la Src cinasa. Esta ruta podría mediar la secreción enzimática estimulada por CCK.

## **2.4 Vía de las proteínas tirosinas cinasas**

---

Los secretagogos del páncreas actúan principalmente vía dos mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción, como ya se ha descrito anteriormente. La secretina y péptidos relacionados activan la adenilato ciclasa e incrementan los niveles de AMPc. La CCK, el carbacol o la bombesina, por su parte, activan la PLC, que hidroliza fosfoinositoles generando DAG e Ins(1,4,5)P3. Subsecuentemente el DAG y Ins(1,4,5)P3 activan proteínas serina-treonina cinasas como la PKC o provocan la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos intracelulares al citosol. Estos dos mecanismos potencian sus efectos en algunas circunstancias y se cree que son las vías intracelulares más importantes en el páncreas exocrino (Williams y Yule, 1993).

Recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo en numerosos tejidos, entre ellos el páncreas exocrino. Este nuevo mecanismo incorpora las proteínas tirosinas cinasas a la ya larga lista de moléculas que forman parte de los mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción. Las tirosinas cinasas son proteínas pertenecientes a la familia de las proteínas cinasas. Dependiendo de su especificidad, las proteínas cinasas se clasifican en serina-treonina cinasas (fosforilan residuos de serina o treonina), tirosinas cinasas (fosforilan residuos de tirosina) y proteínas cinasas con doble especificidad (pueden fosforilar tanto residuos de treonina y serina como de tirosina) (Girault, 1994).

### ***2.4.1 Las proteínas tirosinas cinasas.***

El dominio catalítico de las tirosinas cinasas generalmente se compone de un número inferior a 300 aminoácidos. Presentan en común entre sí, y con el resto de proteínas cinasas, secuencias homólogas en el dominio catalítico que han llevado a sugerir que todas las cinasas derivan de un único gen ancestral (Hanks y Quinn, 1991). Las proteínas tirosinas cinasas presentan a lo largo de su estructura molecular dominios SH2 y SH3, los cuales les permiten establecer relaciones con sus sustratos. Los dominios SH2 tienen afinidad por proteínas que contienen residuos de tirosina fosforilados, en tanto que los SH3 tienen afinidad por proteínas que poseen secuencias de aminoácidos ricas en prolina (Girault, 1994).

Un gran número de tirosinas cinasas, especialmente aquellas que están reguladas por segundos mensajeros, poseen un dominio regulador que se une al dominio catalítico, impidiendo de este modo que algún sustrato pueda acceder a dicho

dominio. La unión del segundo mensajero al dominio regulador modifica la conformación de la proteína, lo que ocasiona que el dominio catalítico quede libre y la proteína se active. Este hecho explica por qué la proteólisis de algunas tirosinas cinasas provoca su activación (Bolen, 1993).

En la mayoría de los casos, la fosforilación del dominio catalítico de las tirosinas cinasas es un proceso necesario para llevar a cabo su actividad enzimática. La fosforilación de este dominio puede producirse por dos mecanismos: autofosforilación o por mediación de una proteína cinasa reguladora (Girault, 1994). En otros casos, la fosforilación de determinadas regiones del dominio catalítico puede producir la inhibición de la actividad enzimática de la proteína; en este caso, la defosforilación de este dominio, por activación de una fosfatasa reguladora, es necesaria para su activación (Girault, 1994).

Las tirosinas cinasas se subdividen en dos clases: tirosinas cinasas unidas a receptores de membrana y tirosinas cinasas citoplasmáticas. El primer grupo es activado por agentes como la insulina o los factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). La proteínas del segundo grupo pueden ser activadas además por los agonistas de los receptores acoplados a proteínas G de membrana y por una gran variedad de productos de los oncogenes (Zachary y cols., 1991).

El primer miembro descrito de la superfamilia de receptores con actividad tirosina cinasa fue el receptor del EGF. Todos los receptores con actividad tirosina cinasa intrínseca se autofosforilan en residuos de tirosina en respuesta a su agonista, y este fenómeno activa el receptor (Hardie, 1991). En los últimos años se han descrito varios receptores miembros de la mencionada superfamilia. En todos los casos existen evidencias de que la fosforilación de proteínas en restos de tirosina está implicada en el control del crecimiento celular provocado por estos agentes (Hardie, 1991). La superfamilia podría dividirse en, al menos, cuatro subfamilias:

1.- *Familia del receptor del EGF*. El receptor del EGF es capaz de unir tanto el EGF como el tipo  $\alpha$  del factor de crecimiento transformante (TGF- $\alpha$ ) (Hardie, 1991).

2.- *Familia del receptor del FGF*. Estos receptores comparten algunas homologías con el receptor del EGF, aunque en su porción extracelular presentan dominios semejantes a inmunoglobulinas (Dell y Williams, 1992).

3.- *Familia del receptor de la insulina*. Esta familia comprende tanto el receptor de la insulina como el del IGF-1 (factor de crecimiento tipo insulina-1). Estos dos receptores son muy similares, de hecho, ambos péptidos pueden unirse al receptor no específico aunque la afinidad por él es menor (Hardie, 1991).

4.- *Familia del receptor del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ )*. Esta

familia está compuesta por, al menos 5 proteínas específicas que se relacionan con diferentes acciones del TGF $\beta$  sobre las células (Massagué, 1992).

Se cree que ambos grupos de tirosinas cinasas, citosólicas y unidas a receptor, participan en la transducción de señales y tienen un papel muy importante en la división y proliferación celular (Campbell y cols., 1992). Recientemente también se ha propuesto la participación de las tirosinas cinasas en la regulación de la secreción pancreática exocrina (Duan y cols., 1994). Más adelante profundizaremos en el papel de las tirosinas cinasas en la secreción pancreática.

Actualmente hay descritos numerosos procesos en los que participan las proteínas tirosinas cinasas. Entre los más estudiados se encuentran los que median la respuesta a los factores de crecimiento. La unión de un factor de crecimiento al dominio externo del receptor origina, tras un proceso de dimerización del mismo en el caso del PDGF, la autofosforilación del dominio intracelular, el cual se convierte en activador de un complejo multimolecular que incluye un gran número de proteínas con actividad enzimática, entre las que se encuentran la PLC $\gamma$ , la PI3-cinasa y numerosas proteínas que actúan a modo de adaptadores proteicos (Shc, Grb2, etc.) (Schlessinger y Ullrich, 1992). Las proteínas adaptadoras inician toda una cascada de señales: primeramente se produce la activación de proteínas de la familia de GTPasas de bajo peso molecular, Ras. Ras unida a GTP activa a su vez a la proteína cinasa citosólica c-raf, que fosforila a la proteína MAP cinasa cinasa (o MEK cinasa), ésta fosforila a las MAP cinasas y estas a su vez fosforilan a otras proteínas incluyendo la proteína ribosomal S6 cinasa, la PLA2 citosólica y factores relacionados con la transcripción genética (Malarkey y cols., 1995). Además de los factores de crecimiento la ruta de las MAP cinasas puede ser también activada por la ocupación de receptores acoplados a proteínas G de membrana, como la vasopresina, la angiotensina o la CCK (Duan y Williams, 1994). Duan y cols. (1995) demostraron que la CCK, así como la activación de la PKC, producen la activación tanto de Ras como de las MEK cinasas en acinos pancreáticos de rata. Recientemente se ha observado que los receptores muscarínicos M1 y M2, cuya activación tiene ciertos efectos tróficos, están relacionados con la activación de las MAP cinasas (Gutkind y cols., 1997). Se ha identificado una nueva familia de tirosinas cinasas, íntimamente relacionadas con las MAP cinasas, que participan en los procesos de crecimiento y proliferación celular. Estas cinasas se han identificado en virtud de su capacidad para fosforilar el extremo amino terminal del factor c-Jun, por lo que se las ha denominado c-Jun amino-terminal cinasas (JNK) (Hibi y cols., 1993). Se han identificado dos formas con masas moleculares de 46 y 55 KDa, las cuales son fosforiladas, al igual que las MAP cinasas, en residuos de treonina y tirosina (Kyriakis y cols., 1994). Al igual que las MAP cinasas, las JNK cinasas pueden ser activadas por secretagogos clásicos como la CCK (Dabrowsky y cols.,

1996) o el carbacol a través de la activación de receptores muscarínicos M1 expresados en células NIH 3T3 (Coso y cols., 1995).

Las tirosinas cinasas también participan en los mecanismos iniciados tras la ocupación del receptor de la hormona del crecimiento (GH). Cuando la GH se une a su receptor, éste interacciona con una tirosina cinasa citoplasmática llamada tirosina cinasa asociada al receptor de la GH (JAK2) (Argetsinger y cols., 1993). Esta tirosina cinasa produce la activación de diferentes proteínas intracelulares, entre las que se encuentran la PLC, la PI3 cinasa y la cascada de las MAP cinasas descrita anteriormente (Carter-Su y cols., 1996).

Otra familia de tirosinas cinasas son las proteínas de la familia Src. Entre los miembros de esta familia se encuentran la p60src, proteína que está íntimamente relacionada con las placas de adhesión focal y con la FAK y que se sobreexpresa en células transformadas por el virus del Sarcoma de Rous (v-Src) (Kanner y cols., 1990); la p59fyn y la p56lck. En linfocitos T y B las Src cinasas p59fyn y p56lck estimulan la fosforilación de residuos de tirosina de otras tirosinas cinasas como la p70zap y p72syk que desencadenan la fosforilación de un gran número de proteínas (Taniguchi y cols., 1991).

Está bien descrito que los procesos de crecimiento y división celular implican cambios en la estructura del citoesqueleto (Malarkey y cols., 1995). El inicio de los mecanismos proliferativos fisiológicos está relacionado con las interacciones entre la célula y la matriz extracelular y con las células vecinas y con cambios en la morfología celular. Estos cambios dan lugar a la fosforilación de una serie de proteínas relacionadas con el citoesqueleto. Entre estas se encuentra una proteína asociada a las placas de adhesión focal y aislada inicialmente en 1990 por Parson, quien la denominó cinasa de adhesión focal (p125FAK). El nombre se debe a su peso molecular y a su asociación con estas placas (Malarkey y cols., 1995).

### ***2.4.2 Factores de crecimiento.***

Numerosos estudios han demostrado que la activación de receptores acoplados a proteínas G de membrana, los cuales carecen de actividad tirosina cinasa intrínseca, da lugar a un incremento en la fosforilación de residuos de tirosina de un gran número de proteínas intracelulares (Lutz y cols., 1993; Zachary y cols., 1993; Duan y cols., 1994; Rozengurt., 1995). La cascada de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina posiblemente es una ruta intracelular de transducción de señales que juega un papel muy importante en diferentes procesos celulares, entre los que se incluyen el crecimiento, la motilidad y la morfología celular (Shattil y cols., 1994; Rozengurt., 1995).

La regulación de la proliferación y el balance entre los procesos de proliferación celular, diferenciación y muerte celular se mantiene a través de una compleja interacción de muy diversos factores. Estos incluyen nutrientes, hormonas y productos de las secreciones del tracto gastrointestinal. Observaciones realizadas durante los pasados 20 años han demostrado la vital importancia de péptidos reguladores, denominados factores de crecimiento, en estos procesos (Lund y cols., 1990).

La identificación y caracterización de numerosos factores de crecimiento ha conducido al reconocimiento de una red de factores interrelacionados dentro de los tejidos del tracto gastrointestinal. Podemos decir que las investigaciones llevadas a cabo sobre estos factores de crecimiento han conducido a las siguientes conclusiones: Primero, cada factor de crecimiento puede ser producido por múltiples tipos celulares en el tracto gastrointestinal. Segundo, cada tipo celular puede producir más de un tipo de estas moléculas. Tercero, cada población de células tiene receptores específicos para más de uno de estos péptidos y, a la inversa, se pueden encontrar receptores para un factor de crecimiento en diferentes tipos celulares. Cuarto, varios receptores para un único factor de crecimiento o para una familia de factores de crecimiento pueden encontrarse en una sola célula. Quinto, el efecto de un factor de crecimiento en una célula puede estar determinado por la presencia de otro de estos péptidos en la misma. Sexto, diferentes factores de crecimiento de una misma familia pueden unirse a un mismo receptor. Séptimo, un factor de crecimiento puede modular su propia expresión genética así como la de otros factores, y sus receptores en sus células diana. Octavo, diferentes factores de crecimiento pueden ejercer el mismo efecto en algunas células y ejercer efectos dispares en otras poblaciones celulares.

Como vemos estas proteínas se expresan en muy diversos tejidos, indicando su importancia en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular. Esta amplia distribución y espectro de acción sugiere que las respuestas celulares a la integridad funcional de las poblaciones celulares dentro del tracto gastrointestinal derivan de la respuesta de una célula específica más que de un único factor (Podolsky, 1994).

#### **2.4.2.1 Mecanismo de acción.**

Todos los factores de crecimiento modulan la proliferación celular mediante su unión a receptores específicos. Estos receptores son proteínas transmembranales que contienen dominios de unión específicos en su región extracelular aminoterminal. Sin embargo, en aquellas células en las que se expresa tanto el receptor como su factor de crecimiento específico, la interacción entre éste y el receptor puede ocurrir dentro de

la misma célula, sin necesidad de que el factor se secrete al medio extracelular. Esto es lo que sucede con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) no secretado que se une a vesículas intracelulares en algunas líneas de fibroblastos (Heldin, 1992).

Los receptores de los factores de crecimiento incluyen un amplio espectro de proteínas estructuralmente distintas. Muchos de ellos están formados por una cadena polipeptídica que contiene una región de transmembrana. Otros receptores están constituidos por dos heterodímeros en los que una de las subunidades contiene el dominio transmembrana y la otra es enteramente intracelular pero está unida covalentemente mediante puentes disulfuro a la región transmembranal. El dominio extracelular de muchos de los receptores contiene residuos de cisteína que se distribuyen espacialmente de tal forma que favorecen la formación de puentes disulfuro entre las cadenas para formar la estructura tridimensional del receptor (Podolsky, 1994).

Después de la unión del factor a su receptor específico la respuesta celular resultante va a depender del tipo de cascada intracelular de señales que ocurra. Las distintas familias de receptores de los factores de crecimiento se diferencian entre sí por su acoplamiento con diferentes mecanismos de señales intracelulares que siguen al proceso de unión al receptor (Nishizuka, 1992). La mayoría de los receptores de los factores de crecimiento poseen actividad tirosina cinasa intrínseca en sus dominios intracelulares. Pueden dividirse en aquellos en los que el dominio tirosina cinasa está separado en dos y aquellos en los que el dominio tirosina cinasa permanece intacto (Yarden y Ullrich, 1988). Otros receptores que utilizan la fosforilación de tirosinas como señal intracelular carecen de actividad tirosina cinasa intrínseca, pero están asociados con los denominados "nonreceptor tirosina cinasa" que pertenecen a la familia de las c-src proteínas presentes en la superficie intracelular de la membrana (Hanks y cols., 1988).

Los substratos de la actividad tirosina cinasa de los receptores de los factores de crecimiento no están claros aún. Parece ser que son un gran número de proteínas celulares, incluyendo otras fosfocinasas, en las cuales la fosforilación sirve para modular su actividad. Generalmente, cada receptor con actividad tirosina cinasa es capaz de autofosforilarse en un residuo de tirosina clave que se encuentra en su dominio intracelular. Esta autofosforilación conlleva la atenuación de la actividad cinasa del receptor, por lo tanto se convierte en un mecanismo eficaz de autorregulación (McCune y cols., 1990). El residuo de tirosina que se fosforila también puede ser fosforilado por proteínas cinasa intracelulares adicionales, incluyendo las c-src cinasa (Okada y cols., 1991). Además la modulación de la actividad cinasa del receptor puede ser llevada a cabo por la fosforilación en residuos de serina o treonina mediante fosfocinasas intracelulares. Así, el dominio carboxilo

terminal intracelular de muchos receptores de los factores de crecimiento están sujetos a la fosforilación en múltiples residuos de serina y treonina (Podolsky, 1994).

Como ya dijimos anteriormente, los receptores de los factores de crecimiento pueden acoplarse a alguna de las vías de señalización intracelular existentes (Nishizuka, 1992). Estas vías intracelulares están generalmente interrelacionadas, y, por tanto, la activación de un receptor puede modular a más de una de ellas. Estos mensajeros intracelulares que pueden ser activados por los receptores de los factores de crecimiento son el AMPc, GMPc, los productos de la vía de la fosfolipasa C, principalmente diacilglicerol y fosfoinositoles, conectados con el calcio intracelular, y los productos de la proteína cinasa C. Estos sistemas de señalización tan entrelazados pueden modular virtualmente cualquier función celular en respuesta a la activación de los receptores de los factores de crecimiento (Podolsky, 1994)

Como ya se ha visto con anterioridad, los factores de crecimiento son polipéptidos que participan en la regulación de procesos como el crecimiento, la replicación y la diferenciación celular. Su presencia en la circulación sistémica les permite actuar como reguladores del metabolismo celular. También podrían actuar localmente como reguladores (autocrinos o paracrinos) de las funciones celulares (Canalis, 1992). Estos polipéptidos pueden clasificarse, en función de homologías estructurales en varias familias. Entre ellas cabe destacar la familia del factor de crecimiento epidermal (EGF), la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) y la familia del denominado “insuline-like growth factor” (IGF). Además de compartir características funcionales, los miembros de una misma pueden también compartir los receptores, de tal forma que, funcionalmente, son parcial o totalmente intercambiables (Podolsky, 1994).

Además de estas familias hay un pequeño número de factores de crecimiento, aparentemente sin similitudes estructurales con otros factores, que también han sido identificados en el tracto gastrointestinal. Entre ellos se incluyen el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Podolsky, 1994).

#### ***2.4.2.2 Familia del factor de crecimiento epidermal (EGF).***

El EGF es el miembro principal de esta familia que comprende al menos siete polipéptidos diferentes de los que se han encontrado cuatro en el tracto gastrointestinal. El EGF fue aislado inicialmente por Cohen en 1962 a partir de glándula submaxilar de ratón. Posteriormente, en 1972 Savage y cols. demostraron

que este factor está formado por una cadena de 53 aminoácidos. Asimismo se observó que este péptido es el mismo que la urogastrona, un factor presente en extractos de orina y que podía inhibir la secreción ácida gástrica (Gregory, 1975).

Además del EGF, esta familia incluye al factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), la anfiregulina y factores de crecimiento que ligan heparina (HB-EGF). Todas estas moléculas están definidas por tres características fundamentales: (1) la posibilidad de unirse al receptor del EGF; (2) la capacidad para imitar los efectos biológicos del EGF, sobre todo los relacionados con su actividad mitogénica; y (3) la presencia dentro de su estructura primaria de seis residuos de cisteína importantes para su función (Podolsky, 1994).

Todos los miembros de la familia del EGF se expresan primeramente como precursores. Así, el EGF se forma inicialmente como un prepro-EGF que es una proteína de 1200 residuos y que contiene múltiples unidades de EGF que pueden ser sucesivamente liberadas para producir el factor activo (Carpenter y Cohen, 1990).

### *Receptores y mecanismos de acción*

Los miembros de la familia del EGF actúan como agentes mitógenos a través de la estimulación de receptores específicos que se encuentran en la superficie celular (Carpenter y Wahl, 1991). El primer receptor identificado mediante estudios de "binding" fue el receptor del EGF (EGFR). Sin embargo, posteriormente se han identificado varios receptores más con características estructurales similares y que pueden unir uno o varios de los miembros de la familia del EGF (Plowman y cols., 1990). El EGFR está constituido por una cadena proteica glicosilada de 1186 aminoácidos, que se ha mantenido relativamente conservada a lo largo de la evolución. Contiene un único dominio de transmembrana que separa la región de unión extracelular del dominio citoplasmático que contiene una tirosina cinasa regulada por EGF. La región carboxilo terminal del EGFR contiene 4 residuos de tirosina que se autofosforilan conllevando la autorregulación a través de la inhibición de la actividad del EGFR (McCune y cols., 1990). Adicionalmente hay residuos de serina y treonina que son fosforilados por cinasas no unidas a receptor, entre ellas algunos miembros de la familia de la src (Hanks y cols., 1988).

La unión del factor a su receptor provoca cambios rápidos en las características enzimáticas de la actividad tirosina cinasa del receptor, de manera que disminuye la  $K_m$  y aumenta la  $V_m$  de la fosforilación. El mecanismo básico de modulación de la actividad tirosina cinasa intracelular es poco conocido, sin embargo, se sabe que la unión del factor al receptor conduce a la dimerización del mismo (Countaway y cols., 1992).

Aunque se conoce que el EGFR fosforila numerosas proteínas *in vitro*, la naturaleza de sus sustratos endógenos no está clara. Existe un amplio conjunto de proteínas que pueden ser fosforiladas por el EGFR (Carpenter y Wahl, 1991). Así podemos incluir a la proteína ribosomal S6 cinasa. Otras serinas cinasas reguladoras también son fosforiladas por el EGFR para disparar una cascada de fosforilación, por ejemplo, la cinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina y la MAP cinasa. Esta última puede inducir cambios en la arquitectura celular junto con la fosforilación de otras proteínas estructurales. Adicionalmente, otras moléculas reguladoras, incluyendo ras y proteínas de transcripción de protooncogenes son fosforiladas cuando el factor se une al receptor. La fosforilación de estas últimas podría servir para promover la translocación al núcleo y la transcripción de genes necesarios para la proliferación celular (Podolsky, 1994). Uno de los sustratos que primero se fosforila por la activación de EGFR es la licocortina I (también llamada calpactina II). Esta proteína controla la generación de mediadores de la vía intracelular de las fosfoinosítoles y la producción de varios de los productos del metabolismo del ácido araquidónico, así, esta proteína inhibe la fosfolipasa A2 y la producción de araquidonato (Mitchell, 1987). La implicación en la vía intracelular de los fosfoinosítoles está mediada por la fosforilación de la fosfolipasa C, que es la enzima responsable de la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato para generar IP3 y diacilglicerol, el cual estimula un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y en la proteína cinasa C. Estas observaciones ponen de manifiesto la íntima relación entre las principales vías intracelulares y su activación interconectada en respuesta al estímulo de un único factor de crecimiento (Podolsky, 1994).

Por último, las respuestas celulares a la estimulación por factores de crecimiento están mediadas a través de la modulación de la transcripción de genes en el núcleo. Así se ha confirmado la modificación del ratio de transcripción de muchos genes en respuesta a la unión de alguno de estos factores con el EGFR. Entre estos genes se incluyen algunos relacionados con respuestas mitogénicas así como otros no relacionados con el crecimiento. Entre estos últimos se incluyen el gen de la gastrina en células antrales G y el gen de la  $\text{H}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPasa en las células parietales gástricas, que podría tener influencia en la capacidad de los péptidos de la familia del EGF para inhibir la secreción ácida gástrica (Zandomenighi y cols., 1991). Además, los factores de la familia del EGF también pueden influir en la transcripción de genes de elementos controlados por la vía de la proteína cinasa C (Podolsky, 1994).

La actividad mitogénica del EGF y sus péptidos relacionados está mediada por la regulación de la expresión de genes relacionados con el crecimiento. Estos genes incluyen tanto algunos que controlan la proliferación celular o que la inducen y genes que son regulados por el estado de proliferación. Estos últimos incluyen genes que

codifican enzimas glicolíticas, constituyentes de la matriz extracelular, activador del plasminógeno, etc. (McDonnell y cols., 1990). El incremento en la expresión de estas proteínas se observa tras varias horas después de la exposición. La inducción de genes necesarios para la proliferación celular por el EGF se produce rápidamente y probablemente utiliza tanto la vía del AMPc como la de la proteína cinasa C. Estos genes incluyen varios factores de transcripción, llamados genes de expresión rápida, entre los que destacan c-jun y c-fos (McDonnell y cols., 1990).

### *Factor de Crecimiento Epidermal (EGF).*

Como ya se vio anteriormente el EGF fue el primer péptido de esta familia en ser identificado. Está constituido por una cadena polipeptídica de 53 aminoácidos que se libera por proteólisis desde su precursor (Carpenter y Cohen, 1990). Se ha comprobado que el EGF se encuentra en las glándulas submaxilares, en las glándulas de Brunner del duodeno, en la leche y también aparecen pequeñas cantidades en el páncreas exocrino (Konturek y cols., 1989). En las glándulas salivales y en el páncreas el EGF se almacena dentro de gránulos de las células tubulares o ductulares y desde ahí se secreta a la saliva o al jugo pancreático donde puede alcanzar concentraciones de 16.8 ng/ml y 2.5 ng/ml respectivamente. Esta secreción exocrina provoca una elevada concentración de EGF en el lumen de la mayor parte del tracto gastrointestinal de muchos mamíferos adultos (Kong y cols., 1992). Esta presencia de concentraciones significativas de EGF en el lumen del tracto gastrointestinal sugiere que este factor podría ejercer su efecto trófico mediante la interacción con la superficie de la mucosa (Reeves y cols., 1991). Además, este fenómeno puede ser importante durante el periodo postnatal, ya que se han encontrado grandes cantidades de EGF tanto en la leche como en el calostro (hasta 600 ng/ml y 850 ng/ml, respectivamente) (Schaudies y cols., 1990).

Su principal función biológica es la actividad mitogénica en general, estimulando la proliferación y la diferenciación celular debido a que estimula la síntesis de DNA.

En el tracto gastrointestinal sus efectos biológicos se pueden resumir como sigue:

1.- En el estómago: disminuye la secreción ácida gástrica (Konturek y cols., 1990); aumenta la proliferación celular (Rutten y cols., 1991); promueve la cicatrización y la prevención de úlceras gástricas (Okita y cols., 1991).

2.- En el intestino: aumenta la proliferación celular (Challacombe y Wheeler, 1991); estimula la producción de disacaridasas (Goodlad y col., 1991); incrementa la maduración del intestino en fase postnatal (Berseth, 1987), y favorece el crecimiento

del intestino en fase fetal (O'Loughlin y cols., 1985; Ménard y cols., 1988).

En resumen, todas estas evidencias sugieren tanto un papel trófico como un efecto modificador de la capacidad funcional de la mucosa del tracto gastrointestinal del EGF (Ulshen y cols., 1986). Además, hay evidencias que sugieren, aunque no prueban concluyentemente, un papel central del EGF en la maduración postparto de la mucosa del tracto gastrointestinal. Sin embargo, el modo de acción (autocrino, paracrino o yuxtacrino), aún no ha sido definido. Es probable que el EGF actúe en la superficie apical para regular la integridad de la mucosa desde el lumen (Podolsky, 1994).

#### *Factor de crecimiento transformante $\alpha$ (TGF $\alpha$ ).*

El TGF $\alpha$  es un polipéptido de 50 aminoácidos que se produce inicialmente como un preproTGF $\alpha$  de 160 aminoácidos (Lee y cols., 1985). Desde que se aisló en 1976 de líneas celulares transformadas (Todaro y De Larco, 1976), se ha identificado como producto de múltiples tipos celulares. De esta manera, el TGF $\alpha$  y su mRNA se han encontrado en estómago, intestino y epitelio del colon. También se han detectado bajas concentraciones en el páncreas y en el hígado (Thomas y cols., 1992).

El TGF $\alpha$  actúa a través del mismo receptor que el EGF, por tanto, es razonable pensar que los efectos biológicos del EGF puedan también ser reproducidos por el TGF $\alpha$ . Se ha demostrado que el TGF $\alpha$  estimula la proliferación de las mucosas gástrica, intestinal y del colon. Además se ha descrito la implicación del TGF $\alpha$  en el crecimiento del páncreas exocrino y en el crecimiento neoplásico de determinadas partes del tracto gastrointestinal (Podolsky, 1994). En el estómago el TGF $\alpha$  estimula la proliferación e inhibe la secreción ácida gástrica. Incluso el TGF $\alpha$  protege a la mucosa gástrica de las lesiones producidas por etanol y aspirina (Romano y cols., 1992).

Se ha demostrado un posible papel del TGF $\alpha$  en la estimulación del crecimiento neoplásico en diferentes partes del tracto gastrointestinal (Huang y cols., 1992). Así, se ha descrito que existe sobreexpresión de los niveles de TGF $\alpha$  en líneas celulares derivadas de cáncer de páncreas y también en tejidos pancreáticos cancerosos (Korc y cols., 1991; 1992).

### 2.4.2.3 *Familia del factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF $\beta$ ).*

Esta familia está constituida por un elevado número de miembros entre los que se incluyen tres péptidos encontrados en tejidos de mamíferos ( y que son el TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3), dos péptidos adicionales encontrados en tejidos de aves y anfibios (TGF $\beta$ 4 y 5), y otros péptidos relacionados con las funciones reproductoras (activinas e inhibinas), con el desarrollo del sistema reproductor (sustancia inhibidora Mülleriana) y con la morfogénesis tanto de vertebrados como de invertebrados (Massagué, 1990). Todos estos péptidos parecen tener funciones reguladoras de muy diversos procesos biológicos. Entre ellos se incluyen: 1) la modulación de la actividad proliferativa de la mayoría de las poblaciones celulares estudiadas; 2) la diferenciación celular; 3) el desarrollo embriológico de muchos tejidos; y 4) la formación de matriz extracelular (Massagué, 1990).

Los péptidos de la familia del TGF $\beta$  ejercen sus funciones a través de la unión a diversos receptores. Al contrario que los receptores de la familia del EGF, los TGF $\beta$ s se unen a muy diversas proteínas de la superficie celular que utilizan un elevado rango de mecanismos de señalización intracelular (Cheifetz y cols., 1987).

Las características estructurales de los miembros de esta familia las vamos a ver estudiando al péptido prototipo de la misma, el TGF $\beta$ 1. Este factor se aisló inicialmente de plaquetas como un dímero de 25.000 daltons compuesto por dos subunidades de 12.500 dalton unidas por puentes disulfuro. Su ADN codifica un gran polipéptido de 391 aminoácidos, de los que los 112 residuos que forman el TGF $\beta$ 1 biológicamente activo se encuentran en el extremo C-terminal del propéptido. Además existe una secuencia de 4 aminoácidos básicos que sirve de sitio de corte proteolítico para liberar el monómero y que se encuentra inmediatamente antes que el dominio activo. Todos los miembros de esta superfamilia comparten esta estructura (Podolsky, 1994).

Los factores de esta familia se agrupan en cuatro subfamilias dependiendo de sus similitudes estructurales y funcionales. Así, tenemos la subfamilia del TGF $\beta$ , la subfamilia de la inhibina, la subfamilia de la proteína decapentaplégica y la familia de la sustancia inhibidora Mülleriana. Los TGF $\beta$ s individuales están muy conservados genéticamente entre especies y además, la estructura genómica entre los diferentes miembros de una familia se encuentra igualmente conservada, lo que sugiere que los diversos genes que codifican estos factores proceden de la duplicación de un único gen ancestral (Podolsky, 1994).

### *Receptores y mecanismos de acción.*

Se ha demostrado que el TGF $\beta$ 1 se une al menos a 5 moléculas específicas de la superficie celular denominadas como tipos I-V (Massagué, 1992). Típicamente, cada célula puede expresar más de uno de estos receptores simultáneamente, y además, varios de los miembros de la familia pueden unirse al mismo tipo de receptor, aunque con diferente afinidad (Wakefield y cols., 1987). Los receptores tipo I y II se han identificado por purificación molecular y por clonación como dos diferentes glicoproteínas de 53 y 100 kD, respectivamente. Están presentes en relativamente poca cantidad en casi todas las células de aves y mamíferos (aproximadamente 4000 receptores por célula) (Massagué, 1992).

Los receptores tipo I y II posiblemente son los únicos responsables de provocar alteraciones en la proliferación celular y/o en las características funcionales (Laiho y cols., 1989). El receptor tipo II, que contiene un dominio transmembrana, posee actividad serina/treonina cinasa en su dominio citosólico que es capaz de autofosforilarse. Parece ser que el receptor tipo II es especialmente importante en la mediación de la inhibición de la proliferación celular (Geiser y cols., 1992). Con esta única excepción, ninguna de las vías conocidas de señalización intracelular están directamente unidas a la acción del TGF $\beta$ . Sin embargo, estudios recientes sugieren que los receptores tipo I y II trabajan de forma cooperativa: la unión de un factor al receptor tipo I facilita la activación de la asociación con el tipo II (Segarini y cols., 1992).

La estructura del receptor de tipo III es diferente a la de los anteriores. Es un proteoglicano de membrana muy escaso en la célula. Este receptor es estructuralmente muy similar al receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Es posible que el receptor tipo III no sea por sí mismo el responsable de las respuestas celulares al TGF $\beta$ , pero podría actuar como un pseudoreceptor secuestrando el TGF $\beta$  de los receptores que generan las señales intracelulares (Wang y cols., 1991).

El receptor tipo IV, una proteína de 60.000 kD, ha sido únicamente identificada en células pituitarias. El tipo V se ha encontrado en hígado bovino y es una glicoproteína de 400 kD. El papel de ambos receptores en la señalización intracelular es muy poco conocido. Por tanto, podemos decir que la mayoría de las actividades biológicas de las proteínas de la familia del TGF $\beta$  pueden ser atribuidas a los receptores de los tipos I y II (Podolsky, 1994).

Existe muy poca información acerca de las vías de señalización intracelular utilizadas por los TGF $\beta$ s. La presencia de actividad serina/treonina cinasa intrínseca en el receptor de tipo II apoya la idea de que esta actividad pueda servir como un disparador inicial de la cascada de señales. La inducción de la expresión de c-sis en

algunos fibroblastos puede ser inhibida tanto por un incremento en la acumulación de AMPc como por la toxina pertusis, indicando por tanto la participación de proteínas G en esta respuesta celular al TGF $\beta$  (Ohtsuki y Massagué, 1992). En algunas células, la modulación del crecimiento por TGF $\beta$  se acompaña por un incremento en el movimiento de fosfoinositoles, mientras que en otras células no se producen cambios ni en el movimiento de inositoles, ni en el calcio intracelular, ni en el pH, ni en la actividad de la proteína cinasa C ni en la fosforilación de proteínas, en respuesta al tratamiento con TGF $\beta$  (Howe y cols., 1989). Además, el TGF $\beta$  ejerce la mayoría de sus efectos biológicos mediante la modulación de la expresión de una gran variedad de genes. Muchos de estos genes cuya expresión es regulada por el TGF $\beta$  son por sí mismos factores reguladores de la transcripción (c-jun, fos, myc, etc), por tanto el TGF $\beta$  puede indirectamente causar amplios cambios en la expresión de muchos genes (Li y cols., 1990).

#### *Efectos biológicos del TGF $\beta$ .*

Los distintos miembros de la familia del TGF $\beta$  poseen un amplio rango de efectos biológicos tanto *in vivo* como *in vitro*. El TGF $\beta$  fue inicialmente identificado por su capacidad para modular el crecimiento y la proliferación celular. Aunque inicialmente se describió su capacidad para estimular la proliferación en fibroblastos no transformados, actualmente se sabe que el TGF $\beta$  inhibe la proliferación de todas las poblaciones de células epiteliales estudiadas (Barnard y cols., 1990). El TGF $\beta$  anula los efectos de mitógenos como el EGF (Massagué, 1985). Posiblemente la inhibición de la proliferación que ejerce el TGF $\beta$  se deba a que prolonga la fase G1 del ciclo celular (Podolsky, 1994).

El TGF $\beta$  también modula la expresión de diversos constituyentes de la matriz extracelular en una gran variedad de tipos celulares. Los cambios en la composición de la matriz celular y de los receptores celulares que interaccionan con los componentes de la matriz extracelular conduce a alteraciones en la adhesión celular y consecuentemente provoca alteraciones en los procesos de migración celular. Estos procesos juegan un papel fundamental en el desarrollo de los tejidos durante las fases embriológica y fetal y también intervienen en la reparación de los tejidos y en muchos aspectos del crecimiento tumoral y de la diseminación de esos tumores (Chiquet-Ehrismann y cols., 1989).

Adicionalmente a estos efectos en la proliferación celular y en la matriz extracelular, se ha encontrado que el TGF $\beta$  altera las propiedades funcionales de muchas poblaciones celulares, entre ellas las del sistema inmune. Así, el TGF $\beta$  inhibe la proliferación tanto de linfocitos B y T (Cross y Cambier, 1990).

En el tracto gastrointestinal se han encontrado las tres principales isoformas del TGF $\beta$  tanto en el intestino adulto como en el fetal. En el animal adulto el TGF $\beta$  se ha detectado en todos los tejidos del tracto gastrointestinal y en los órganos accesorios. Existe poca información disponible acerca de los efectos del TGF $\beta$  en el estómago y en el páncreas. El TGF $\beta$ 1 se ha demostrado que inhibe el crecimiento de las células acinares pancreáticas y presumiblemente tiene el mismo efecto sobre el epitelio gástrico (Logsdon y cols, 1992). Haciendo un pequeño resumen podemos enumerar los efectos biológicos del TGF $\beta$  sobre las distintas partes del tracto gastrointestinal:

a) Sobre el estómago: disminuye la proliferación celular (Logsdon y cols., 1992).

b) Sobre el intestino: Disminuye la proliferación del epitelio (Suemori y cols., 1991); aumenta la formación de matriz extracelular y la producción de colágeno (Graham y cols., 1990); aumenta la quimiotaxis de los neutrófilos, disminuye la activación de los macrófagos y disminuye la actividad de los linfocitos NK (natural killer) (Podolsky, 1994).

#### ***2.4.2.4 Familia del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF).***

Esta familia engloba a tres péptidos que interaccionan de una manera solapada con una compleja variedad de receptores de la superficie celular (Rechler y Nissley, 1991). Los tres miembros de esta familia, la insulina, el factor de crecimiento similar a la insulina I y el II (IGF I e IGF II, respectivamente), son codificados por tres genes contiguos. La insulina fue el primero en ser identificado mediante la purificación de islotes pancreáticos y como sabemos regula la glucosa sanguínea y el metabolismo. Por el contrario, los IGFs se identificaron primeramente como somatomedinas, es decir, proteínas producidas en el hígado en respuesta a la hormona del crecimiento y que mediaban los efectos de la hormona en los órganos diana. Recientemente, se han encontrado estos factores en diversos tejidos, incluyendo el tracto gastrointestinal, donde poseen actividad intrínseca (Podolsky, 1994).

Los factores IGF I y II son homólogos estructurales del precursor de la insulina, la proinsulina. Cada uno está compuesto por una cadena polipeptídica simple. Los IGFs maduros se encuentran en el extremo aminoterminal del precursor y poseen 70 y 67 aminoácidos respectivamente. Estos IGFs tienen una secuencia muy parecida entre especies distintas. Los diferentes precursores pueden tener actividad biológica aunque mucho menos potente que la de los factores maduros (Podolsky, 1994).

### *Receptores y mecanismos de acción.*

Los IGFs median sus efectos biológicos a través de la interacción con al menos tres receptores de la superficie celular. Estos receptores poseen relativa afinidad por la insulina y los IGFs. El receptor de la insulina y el receptor del IGF I poseen una porción intracelular con actividad tirosina cinasa. Probablemente esta sea la llave para el desencadenamiento de las señales intracelulares, que implicarían la fosforilación de proteínas incluyendo la autofosforilación del receptor. Sin embargo, al menos algunas respuestas celulares parecen estar asociadas con un incremento en los niveles de diacilglicerol, que podría estimular a la proteína cinasa C, indicando la participación de la fosfolipasa C en algunas respuestas mediadas por IGF I (Okamoto y cols., 1991). La comparación de las curvas dosis-respuesta del IGF I e IGF II *in vitro*, indican que se requieren mayores concentraciones de IGF II para alcanzar la misma respuesta que la observada para las concentraciones de IGF I que se han ensayado, de manera que la potencia del IGF I es mayor que la del IGF II e incluso que la de la insulina (Podolsky, 1994).

Al contrario que el receptor del IGF I, el receptor del IGF II no posee dominio con actividad tirosina cinasa. Okamoto y cols. en 1991 demostraron que el receptor del IGF II está acoplado a canales de calcio a través de proteínas G, y que el IGF II estimula la entrada de calcio.

### *Efectos biológicos de los IGFs.*

En términos generales, los IGFs poseen tanto propiedades mitogénicas como morfogénicas. Estas propiedades se deben a la acción de los IGFs sobre una gran variedad de actividades celulares. El IGF II parece jugar un papel dominante durante el desarrollo fetal. Así, un buen número de investigaciones han demostrado la presencia de elevadas cantidades de IGF II en los tejidos del tracto gastrointestinal durante el desarrollo fetal tanto de humanos como de roedores (Soares y cols., 1985), lo que sugiere que el IGF II facilita el crecimiento y desarrollo del tracto gastrointestinal. Sin embargo el papel de los IGFs en el tracto gastrointestinal maduro no está muy claro. Es probable que estos factores participen en la modulación de su crecimiento y diferenciación. Se han encontrado cantidades similares de IGFs en el estómago, intestino delgado, ciego y colon. Igualmente se han encontrado receptores de los IGFs en hepatocitos (Podolsky, 1994).

Los efectos tróficos del IGF I en el intestino se han ensayado directamente mediante la infusión del factor en el íleon de roedores. Los resultados indican que el IGF I estimula la proliferación celular. Además, la continua infusión de IGF I conduce a un incremento en el peso de la mucosa intestinal y en otros parámetros del

crecimiento (Olanrewaju y cols., 1992). De forma similar, el IGF I produce significativos incrementos en el peso de todos los órganos del sistema gastrointestinal. También se han demostrado efectos regenerativos en el páncreas de rata (Podolsky, 1994).

Recientes observaciones sugieren que la regulación autocrina del crecimiento por el IGF I y II puede contribuir a la proliferación de carcinomas de colon en humanos y de otros tipos de tumores, asociados todos ellos a hipoglucemia (Daughada, 1990). Otro efecto demostrado para el IGF es que inhibe la secreción ácida gástrica estimulada por pentagastrina (Mulholland y Debas, 1988).

#### **2.4.2.5 Familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).**

Esta familia incluye al menos siete péptidos diferentes. Entre ellos se encuentran los dos factores típicos de esta familia, los factores ácido y básico (aFGF y bFGF, respectivamente). Estos dos miembros comparten una similitud estructural de más del 50%. El bFGF está formado por una cadena de 146 aminoácidos y posee un peso molecular de 16,5 kD; el aFGF está constituido por 140 aminoácidos y posee un peso molecular de 15,5 kD (Podolsky, 1994).

Estos dos factores son los más estudiados de la familia, y se ha comprobado que pueden actuar como mitógenos, principalmente en poblaciones celulares derivadas de tejido mesodérmico, y también poseen propiedades neurotróficas y angiogénicas. Adicionalmente, todos los miembros de esta familia comparten la capacidad para unirse a la heparina o a otros proteoglicanos. *In vivo*, los proteoglicanos son proteínas de unión que parece ser que regulan el acceso de los FGFs a sus receptores de la superficie celular (Podolsky, 1994).

Los FGFs poseen un amplio espectro de actividades biológicas. Ellos fueron reconocidos inicialmente por sus potentes efectos mitogénicos en fibroblastos y células endoteliales. Pero también se han demostrado estos mismos efectos mitogénicos en muchos otros tipos celulares, incluyendo células mesenquimáticas, neurales y epiteliales (Podolsky, 1994). Además de estos efectos mitogénicos, los FGFs ejercen un amplio espectro de efectos funcionales. Así, estos factores pueden jugar un papel fundamental tanto en la angiogénesis normal como en la patológica: estos péptidos son los más potentes factores en la inducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de la estimulación de la proliferación endotelial y de su reorganización. Así, estos factores favorecen la migración de las células endoteliales, la producción de colagenasa y activador de plasminógeno y la producción de nuevos constituyentes de la matriz extracelular (Flaumenhaft y cols., 1992). Esta inducción de

nuevos vasos es una parte importante de la respuesta normal a los daños en los tejidos, pero también constituye un mecanismo fundamental en muchos procesos patológicos, incluyendo la formación de tumores y la metástasis. También parece ser que estos factores intervienen en los procesos de formación del mesodermo durante los estadios tempranos del desarrollo embrionario. La capacidad de los FGFs, especialmente del bFGF, para inducir la formación del mesodermo es paralela a su capacidad para estabilizar la expresión fenotípica de las células mesodérmicas cultivadas. Esto último está relacionado con su capacidad para regular la síntesis de componentes de la matriz extracelular (Podolsky, 1994).

### *Receptores y mecanismos de acción.*

Los FGFs ejercen sus efectos biológicos a través de la unión a receptores de la superficie celular cuyo dominio intracelular posee actividad tirosina cinasa (Givol y Yayon, 1992). De esta forma, estos receptores comparten algunas homologías con los receptores de otros factores que también poseen esta actividad (por ejemplo, el receptor del EGF). Sin embargo la porción extracelular de muchos de los receptores de los FGFs contiene dos o tres dominios similares a inmunoglobulinas. Se han encontrado cinco genes diferentes que codifican estos receptores. Los productos de estos genes poseen especificidad diferente para cada factor. Esta especificidad viene determinada por el extremo aminoterminal del dominio similar a inmunoglobulina más próximo a la región transmembrana (Dell y Williams, 1992).

Pero los FGFs también pueden unirse a proteoglicanos tanto secretados a la matriz extracelular como unidos a la membrana. Estas moléculas están constituidas por una parte proteica que está unida a una cadena de glicosaminoglicanos. Los proteoglicanos que se encuentran unidos a la membrana están anclados a ella por un dominio transmembrana y una corta cola intracitoplasmática que probablemente está desprovista de cualquier capacidad para generar señales intracelulares, al menos mediante los mecanismos conocidos. Aunque la capacidad de los proteoglicanos para unir FGFs podría servir para competir con los receptores "verdaderos", lo cierto es que parece ser que lo que hacen es facilitar la presentación de los factores a sus receptores. Por el contrario, los proteoglicanos presentes en la matriz extracelular pueden servir para secuestrar a los FGFs, constituyendo un reservorio de los mismos (Moscatelli, 1992).

La señal inicial de transducción depende principalmente de la actividad tirosina cinasa de receptor. Los receptores poseen sitios de unión de ATP además de secuencias capaces de autofosforilarse. Los receptores fosforilan muchos de los substratos que también son susceptibles de ser fosforilados por otros receptores (por

ejemplo, el receptor del EGF) que poseen actividad tirosina cinasa. Entre estos sustratos se encuentran la fosfolipasa C $\gamma$  y GTPasas activadas por proteínas. Además los FGFs conducen a la expresión de protooncogenes como fos y myc. Sin embargo, hay que tener presente que en diferentes tipos celulares los FGFs pueden provocar diferentes mecanismos de señalización intracelular. Entre estos se incluyen la activación de la adenilato y la guanilato ciclasa así como de la cascada desencadenada por la hidrólisis de los fosfoinositoles. Adicionalmente, la modulación del “antiporte” Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y de otros transportes de iones pueden ser fundamentales para la actividad de los FGFs. Finalmente, hay que tener en cuenta que el FGF que ha sido internalizado tras su unión con el receptor de membrana puede ser translocado al núcleo, aunque los efectos funcionales de esta internalización son desconocidos (Podolsky, 1994).

#### *Efectos biológicos de los FGFs.*

Es presumible que los FGFs ejerzan los mismos efectos en las poblaciones celulares mesenquimáticas del tracto gastrointestinal que los observados en otros tejidos. Por tanto, en el tracto gastrointestinal es probable que los FGFs jueguen un papel importante en la neovascularización y en la proliferación así como en la modulación del fenotipo funcional de los fibroblastos que sigue a las lesiones. Estas funciones pueden ser fundamentales para la reparación de las mucosas después de un proceso ulceroso o después de la resección quirúrgica. Recientes estudios han demostrado que el FGF luminal puede facilitar la curación de úlceras pépticas en roedores (Folkman y cols., 1991).

Se ha detectado la presencia de bFGF inmunoreactivo en el colon y el intestino (Nice y cols., 1991). También se ha encontrado en la matriz extracelular así como en las paredes de los vasos sanguíneos. Nice y cols. (1991) han aislado el bFGF de la mucosa del colon en cerdos donde parece tener efectos mitogénicos para líneas celulares epiteliales derivadas de carcinomas de colon. New y Yeoman, en 1992, también encontraron este efecto mitogénico del bFGF en líneas celulares derivadas de carcinomas de colon en humanos. De hecho, este efecto mitogénico del bFGF enmascara la inhibición del crecimiento inducida por TGF $\beta$ , desmintiendo el hecho de que los efectos moduladores del TGF $\beta$  son dominantes sobre los efectos estimuladores de otros factores de crecimiento. Estas células también poseen la capacidad de unir específicamente al FGF y de producir FGF inmunoreactivo, sugiriendo que este péptido podría servir como un factor de crecimiento autocrino en estas líneas celulares (Podolsky, 1994).

#### ***2.4.2.6 Familia del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).***

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es un péptido modulador del crecimiento que se identificó por su capacidad de estimular el crecimiento en cultivos de hepatocitos (Nakaruma, 1991). El HGF maduro tiene un peso aparente de 82 kD, y es un heterodímero compuesto por una gran subunidad alfa (69 kD) y una cadena beta más pequeña (34 kD). Se forma a partir del corte proteolítico de un péptido precursor. Las dos cadenas están unidas por un puente disulfuro. El HGF presenta una homología de un 38% con el plasminógeno, aunque no se ha detectado actividad proteasa en él (Podolsky, 1994).

Más recientemente se ha demostrado que el HGF es el ligando natural del protooncogén met. Este oncogén codifica a una tirosina cinasa transmembranal y heterodimérica, que actuaría como receptor del HGF. Este receptor está formado por una cadena alfa extracelular en su totalidad y por una cadena beta que posee tres dominios, extracelular, transmembrana y un dominio tirosina cinasa así como sitios para la autofosforilación. El HGF estimula específicamente la fosforilación de este receptor (Podolsky, 1994).

#### ***Efectos biológicos del HGF.***

El HGF ha sido detectado en el suero de ratas hepatectomizadas y en el suero de pacientes con deficiencias hepáticas (Selden y cols., 1986). También se han encontrado altas concentraciones de HGF en el suero de pacientes sometidos a la resección hepática. El HGF se expresa en el hígado, aunque es probable que las células parenquimáticas sean su principal fuente (Zarnegar y cols., 1991). En el hígado sano se han detectado bajas cantidades del ARN mensajero del HGF, sin embargo, estos niveles se ven ampliamente incrementados después de un tratamiento químico o de una hepatectomía. También parece ser que el HGF se produce en otros tejidos y células, como los macrófagos y células relacionadas. De hecho, algunos autores sugieren que los macrófagos de los pulmones pueden ser la principal fuente de HGF que sirve para incrementar los niveles de este factor tras la resección hepática (Matsumoto y cols., 1992). Otros estudios han demostrado la presencia de HGF y su receptor en un amplio abanico de tejidos, incluyendo el estómago, intestino delgado y colon (Tajima y cols., 1992). Así, un incremento en la expresión del receptor se ha comprobado en tumores gástricos (Di Renzo y cols., 1991).

Parece ser, por tanto, que el HGF es un potente agente mitogénico en el hígado. Sin embargo, paradójicamente, se ha encontrado que el HGF es capaz de bloquear el crecimiento de líneas celulares derivadas de carcinomas hepáticos y de inhibir la

formación de tumores en ratones transgénicos (Shiota y cols., 1992).

La presencia del receptor del HGF a lo largo del tracto gastrointestinal sugiere que este factor puede ejercer su actividad en más sitios. Además, se ha demostrado que el HGF estimula la migración de una gran variedad de tipos celulares, incluyendo células epiteliales y mesenquimáticas (Bussolino y cols., 1992). Parece probable que el HGF y otros péptidos relacionados puedan ejercer su papel en la morfogénesis del tracto gastrointestinal y en su remodelación después de lesiones. Sin embargo, se necesitaran más estudios para aclarar este posible papel (Podolsky, 1994).

#### *2.4.2.7 Otros factores de crecimiento.*

Además de los factores que hemos visto hasta ahora, existen otras proteínas moduladoras del crecimiento que se expresan en el tracto gastrointestinal, aunque sus funciones específicas en la regulación de la proliferación del sistema gastrointestinal aún no ha sido bien definidas. Entre estas proteínas se incluyen factores producidos en el intestino y cuya primera función es modular las poblaciones de células sanguíneas (por ejemplo, los factores hematopoyéticos). Otros péptidos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) realiza sus funciones en células del sistema gastrointestinal, aunque su importancia en la fisiología de los órganos de este sistema todavía no está bien establecida. Por último, existe un amplio conjunto de péptidos denominados citocinas, expresados por múltiples tipos celulares del tracto gastrointestinal que pueden afectar a la proliferación de sus células diana incluso aunque estos péptidos han sido bien definidos por su papel en la regulación de otras características de estas células (Podolsky, 1994).

Los factores hematopoyéticos juegan un papel fundamental en la hematopoyesis, por tanto su principal lugar de actuación es la médula ósea en el adulto, aunque también pueden producirse en otros órganos. Así, se ha demostrado su producción en el hígado (Konishi y cols., 1991).

El PDGF se libera de las plaquetas durante el proceso de coagulación. Sus acciones están mediadas por su unión a un receptor que contiene un dominio con actividad tirosina cinasa en su porción intracelular. Es un potente mitógeno para fibroblastos y otras células mesenquimáticas, por tanto es presumible que regule a estas mismas poblaciones celulares en el tracto gastrointestinal. Es probable que el PDGF contribuya a la cicatrización de las heridas después de una resección y posiblemente después de la fibrosis asociada a las heridas (Podolsky, 1994).

### ***2.4.3 Efectos de los factores de crecimiento sobre el páncreas exocrino.***

Diversos estudios han demostrado la existencia de receptores específicos para el EGF en el páncreas de rata y ratón (Logsdon y Williams, 1983a). En acinos pancreáticos de rata el receptor del EGF tiene una alta afinidad por el EGF (Korc y cols., 1983). En estudios *in vivo* los resultados de la acción de EGF son contradictorios: mientras Morisset y cols. en 1989 observaron que la administración de EGF en ratas crónicas no alteraba el peso del páncreas y además disminuía el contenido de ADN en un 20 %, otros autores demostraron que, tras la inyección intraperitoneal de EGF durante 5 días cada 8 horas, aumentó significativamente el peso del páncreas y el contenido de ARN y ADN (Dembinski y cols., 1982). Por otra parte, también se ha observado que la administración crónica de EGF en ratas incrementa el contenido de amilasa, quimotripsinógeno y proteínas, incrementando, además, la acción trófica de la ceruleína (Morisset y cols., 1989). Jaworek y Konturek (1990) demostraron también que en ratas conscientes con reinfusión de jugo pancreático, la administración de EGF subcutáneamente aumenta la producción de proteínas. Finalmente, en perros con fístula crónica el EGF no modifica la secreción pancreática ni a la CCK ni a la secretina, pero inhibe la respuesta a la comida ya que disminuye la acidificación duodenal (Konturek y cols., 1984).

Sobre la secreción de amilasa *in vitro* también existen resultados contradictorios. Así, en cultivos celulares de células acinares de ratón o en exposiciones relativamente largas al EGF (superiores a 1 hora) se ha observado que es capaz de incrementar la secreción enzimática basal, potenciar la secreción enzimática estimulada por CCK e incrementar la incorporación de H3leucina a las proteínas, sin embargo no modifica ni la secreción basal ni la estimulada por CCK en acinos frescos (Logsdon y Williams, 1983a; 1983b). En acinos de ratas pretratadas con EGF durante 3 horas, este factor es capaz de incrementar la liberación de amilasa basal de una manera dosis-dependiente y potenciando, además, la secreción de amilasa evocada por ceruleína (Jaworek y Konturek, 1990). Sin embargo, otros autores observan que el EGF a dosis de 16.5 nM no tiene efecto en la secreción de amilasa, aunque incrementa ligeramente la acumulación de IP3 basal y provoca un pequeño movimiento del calcio intracelular (Chandrasekar y Korc, 1991). El grupo de Stryjek y cols han demostrado en sucesivos trabajos que la acción del EGF sobre la secreción de amilasa depende de la dosis utilizada. Así, 17 nM de EGF no modifica la secreción basal de amilasa en acinos de rata, mientras que 90 nM incrementa esta secreción aunque no modifica el contenido de IP3. Además, demuestran que bajas concentraciones de EGF inhiben la

producción de IP3 y la secreción de amilasa estimulada por CCK, mientras que altas concentraciones de EGF estimulan la liberación de amilasa provocada por CCK (Stryjek-Kamiska y cols., 1993). El EGF a la concentración de 17 nM reduce la liberación de amilasa estimulada por bombesina, carbacol y CCK, al igual que la producción de IP3 estimulada por estos secretagogos (Stryjek-Kaminska y cols., 1994 y 1995a). Esta misma dosis inhibe también la liberación de amilasa estimulada por agonistas que median su mecanismo de acción a través de la vía del AMPc (VIP, forskolina y dibutililAMPc), aumenta la producción de AMPc basal pero reduce la estimulada por VIP y forskolina (Stryjek-Kaminska y cols., 1995c). La estimulación de la liberación basal de amilasa producida por 90 nM de EGF es reducida por la erbstatina, un inhibidor de las tirosinas cinasas. Esta misma dosis de EGF, sin embargo, no modifica la producción de inosítoles basales, pero aumenta la fosforilación de proteínas en membranas de células acinares (Piiper y cols., 1994). Estos mismos autores, en 1997, destacan que la dosis de 85 nM de EGF también inhibe la secreción de amilasa y la producción de IP3 estimulada por bombesina, aunque esta inhibición puede revertirse con toxina pertussis (Piiper y cols., 1997). Al igual que el grupo de Stryjek, Profrock y cols en 1991 demostraron que 100 ng/ml de este factor no modifica la producción basal de IP3 ni la concentración intracelular de calcio basal, aunque reduce tanto la producción de IP3 como el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por CCK. El EGF provoca un aumento dosis-dependiente en los niveles de fosfoinositol,4,fosfato al igual que el carbacol, aunque a diferencia de éste, no induce disminución de los niveles de PIP2 (Conway y cols., 1991). En células A431, línea celular de carcinoma epidermoide humano que sobreexpresa el receptor del EGF, este factor a una concentración de 30 nM es capaz de inducir un pico de calcio procedente de dos orígenes, intracelular por redistribución de calcio y extracelular por entrada desde el exterior celular (Pandiella y cols., 1987). Además en estas células el EGF induce hidrólisis de fosfoinosítoles con acumulación estimulada de inositol 1,3,4 fosfato e IP4. En este mismo tipo celular el EGF estimula la producción de IP3 demostrando que activa la fosfolipasa C, además produce una señal bifásica de calcio que se mantiene en ausencia de calcio extracelular, aunque el EGF no es capaz de liberar  $Ca^{2+}$  después de tapsigargina (Hughes y cols., 1991). En otros tipos celulares, como células AR42J, Simeone y cols, sin embargo demuestran que 100 nM de EGF no aumenta la hidrólisis de fosfoinosítoles, aunque el pico de calcio que produce procede de almacenes intracelulares (Simeone y cols., 1995).

Las acciones del EGF se deben a su unión con el receptor de membrana. Según Profrock y cols el EGF interacciona con las mismas proteínas  $G_i$  que la CCK y además también interacciona con 9 proteínas  $G_s$ . Estas proteínas G estarían implicadas en la potenciación que el EGF ejerce sobre la secreción estimulada por CCK (Profrock

y cols., 1991a). Además demuestran que la interacción entre el receptor del EGF y las proteínas G es directa y no se debe a una acción indirecta por fosforilación mediada por la actividad tirosina cinasa intrínseca del receptor.

En 1991 se propuso un modelo de interacción entre el receptor del EGF y las proteínas G activadas por la CCK: el receptor del EGF podría activar una proteína G inhibidora o inhibir una proteína G estimuladora de manera que no se produjera la sobreestimulación de la PLC que provoca la curva bifásica de liberación de amilasa inducida por CCK (Piiper y cols., 1991; Zeuzem y cols., 1994).

En diversos tipos celulares se ha descrito la activación de la PLC por EGF: en células A431 el EGF estimula la fosforilación de la PLC II (también llamada PLC $\gamma$ ) en residuos de tirosina y serina y esta fosforilación ocurre antes que la formación de IP3 (Wahl y cols., 1989). También se produce un aumento de la fosforilación de la PLC II en respuesta a EGF en fibroblastos NIH 3T3. Esta fosforilación de la PLC $\gamma$  debida a la activación del receptor del EGF y también del PDGF conduce a la activación de la PLC $\gamma$  y a un consecuente aumento del metabolismo de los fosfoinositoles (Meisenhelder y cols., 1989). Margolis y cols en 1989 utilizando células A431 y HER14 demuestran que dosis entre 1 y 80 nM induce fosforilación de la PLC $\gamma$ , mediante la asociación del receptor del EGF con la PLC $\gamma$ . La tirfostina, un inhibidor de las tirosinas cinasas, es capaz de bloquear la unión del EGF con su receptor y la fosforilación de la PLC $\gamma$ , el incremento de la concentración de calcio intracelular y la síntesis de DNA provocada por EGF (Margolis y cols., 1989). En células acinares también se ha demostrado la acción del EGF sobre la PLC: utilizando membranas acinares se ha demostrado que el EGF aumenta la fosforilación de la PLC total y ligeramente la fosforilación de la PLC $\gamma$ 1. Estas fosforilaciones son inhibidas por pp60src, un inhibidor de las tirosinas cinasas. En este mismo estudio se demuestra que la toxina pertussis reduce la actividad de la PLC inducida por EGF, por tanto la proteínas Gi $\alpha$ 1 y Gi $\alpha$ 2 están implicadas en esta activación, aunque no en la fosforilación de la PLC $\gamma$ 1 estimulada por EGF. También se ha observado que el EGF induce asociación entre la PLC $\gamma$ 1 y las proteínas Gi y que esta asociación necesita la fosforilación en residuos de tirosina. Asimismo hay asociación entre el receptor del EGF y las proteínas Gi, y esta asociación no se produce en presencia de pp60src. En un trabajo similar se observa que el EGF es capaz de inhibir la activación de la PLC $\beta$ 1 estimulada por bombesina vía proteínas Gi1-2. La PLC $\beta$ 1 se asocia transitoriamente, por acción del EGF, con proteínas Gi y esta asociación corre paralela a la autofosforilación del receptor del EGF y a la asociación de las proteínas Gi con el receptor del EGF (Piiper y cols., 1997).

También se ha demostrado la implicación de los factores de crecimiento en el pH intracelular: en fibroblastos el EGF induce entrada de Na<sup>+</sup> que es sensible a

amilorida (un inhibidor del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ), y se eleva por acidificación del citoplasma. El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  está implicado en la regulación del pH intracelular y la activación de este intercambiador por EGF provoca un rápido y persistente aumento en el pH intracelular. Para esta activación del intercambiador no es esencial una elevación del calcio intracelular. El TPA atenúa la activación del intercambiador por EGF, inhibe la formación de DAG y la movilización de calcio inducida por EGF, de manera que la PKC además de activar el intercambiador puede antagonizar el “breakdown” de fosfoinosítoles que sigue a la adición de EGF a las células (Moolenaar, 1986).

En relación a los factores de crecimiento de fibroblastos, se ha demostrado que tanto el aFGF como el bFGF estimulan activación de tirosinas cinasas en células intactas Swiss 3T3. En estas células los dos factores provocan una rápida fosforilación de una proteína de 90 KDa que es el sustrato para la tirosina cinasa estimulada por los FGFs. Esta proteína no es el receptor ya que estudios de “cross-linking” demuestran que el receptor posee un peso de 145-210 KDa (Coughlin y cols., 1988). En acinos pancreáticos de rata se ha demostrado que tanto aFGF como bFGF poseen efectos tróficos ya que estimulan la incorporación de  $^3\text{H}$ timidina de forma dosis-dependiente, por tanto son potentes estimulantes de la síntesis de DNA (Hoshi y Logsdon, 1993). En estas mismas células, se ha observado que el bFGF incrementa la producción de  $\text{IP}_3$  e induce un rápido aumento en los niveles de calcio intracelular, siendo este aumento dosis-dependiente. Este incremento no fue alterado ni por EGTA ni por TPA, aunque no es capaz de movilizar calcio después de la administración de carbacol. En este mismo trabajo, el bFGF aumenta la secreción de amilasa de manera dosis-dependiente. Según estas observaciones, el bFGF es un agonista que moviliza calcio (Chandrasekar y Korc, 1991; Stryjek-Kaminska y cols., 1995a). Igualmente se ha demostrado el efecto del bFGF sobre la movilización de calcio intracelular en células AR42J, línea celular derivada de un tumor del páncreas exocrino inducido por azaserina y que es un modelo muy útil para estudiar respuestas mediadas por receptores (Simeone y cols., 1995). En 1996 Piiper y colaboradores indicaron que existe una comunicación entre el receptor del bFGF y proteínas  $\text{G}_i$ , y que estas proteínas  $\text{G}_i$  ejercen un efecto inhibitor en la activación de la PLC inducida por el bFGF (Piiper y cols., 1996). También se ha observado la acción del bFGF sobre la PLD: el bFGF produce un aumento dosis-dependiente en la acumulación de ácido fosfatídico en presencia de propranolol, un inhibidor de la ácido fosfatídico hidrolasa. Esta acumulación fue inhibida en presencia de genisteína, demostrando que el bFGF puede operar para inducir sus efectos en la activación de la PLD en asociación con la actividad tirosina cinasa de su receptor (Rydzewska y Morisset, 1995). Igualmente se ha demostrado que el bFGF estimula la DAG lipasa y la liberación de ácido

araquidónico en acinos pancreáticos de rata y que esta liberación depende de la acción secuencial de la tirosina cinasa, la PLC, la PKC y la DAG lipasa, pero no depende de la activación ni de la PLA2 ni de la PLD (Hou y cols., 1996b).

#### ***2.4.4 Tirosinas cinasas y secreción.***

Numerosos estudios han demostrado que la activación de receptores acoplados a proteínas G de membrana, los cuales carecen de actividad tirosina cinasa intrínseca, da lugar a un incremento en la fosforilación de residuos de tirosina de un gran número de proteínas intracelulares (Lutz y cols., 1993; Zachary y cols., 1993; Duan y cols., 1994; Rozengurt., 1995). La cascada de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina posiblemente es una ruta intracelular de transducción de señales que juega un papel muy importante en diferentes procesos celulares, entre los que se incluyen el crecimiento, la motilidad y la morfología celular (Shattil y cols., 1994; Rozengurt., 1995). Pero ¿qué sucede con los procesos secretores?.

Se han llevado a cabo diferentes estudios para comprobar la relación entre las tirosinas cinasas y la secreción. Así, se ha comprobado que las tirosinas cinasas son necesarias para la secreción de catecolaminas en células cromafines de glándula adrenal en bóvidos (Cox y cols., 1996), así como para la regulación de la liberación de prostaciclina por células endoteliales humanas (Wheeler-Jones y cols., 1996). Ambos estudios sugieren que el papel de las tirosinas cinasas en la secreción está mediado por el calcio intracelular (Cox y cols., 1996; Wheeler-Jones y cols., 1996). Estudios realizados en células  $\beta$  por Konrad y cols. (1996) han puesto de manifiesto que el inhibidor de las tirosinas cinasas AG879 produce una inhibición dependiente de la concentración tanto de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina como de la secreción de insulina, sugiriendo además que la fosforilación de una proteína, aún no bien identificada y denominada p125 de células  $\beta$ , podría ser necesaria para la secreción de insulina. Por el contrario, estudios realizados en células acinares de glándula parótida han demostrado que existe una relación entre las tirosinas fosfatasas y la secreción de amilasa, indicando que la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina inhibe la secreción de amilasas estimulada por secretagogos (Kinoshita y cols., 1996). Asimismo, el pretratamiento de plaquetas con genisteína (un inhibidor de las proteínas tirosinas cinasas), que redujo la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, provocó un incremento en la secreción de serotonina estimulada por ionomicina (Dallas y cols., 1996).

En células acinares pancreáticas se han realizado diversos estudios para caracterizar el papel de las tirosinas cinasas en la secreción enzimática, con resultados muy dispares. Piiper y cols. (1994) han descrito que la genisteína inhibe parcialmente

la secreción enzimática estimulada por bombesina o carbacol. Lutz y cols. (1993) han demostrado que la genisteína inhibe la secreción enzimática dependiente de los incrementos en  $[Ca^{2+}]_i$  y la secreción de amilasas estimulada por CCK-8. Por otro lado, se ha comprobado que la genisteína carece de efecto en la secreción enzimática estimulada por VIP o secretina (Duan y cols., 1994). Piiper y cols. (1994) comprobaron que el efecto de la inhibición de las tirosinas cinasas en la secreción enzimática estimulada por CCK-8 o carbacol se produce únicamente a bajas concentraciones de estos secretagogos, sugiriendo que la secreción enzimática estimulada por dosis supramáximas de carbacol o CCK podría ser regulada por las tirosinas cinasas de un modo distinto. Las tirosinas cinasas también participan en la producción de  $Ins(1,4,5)P_3$  estimulada por carbacol, CCK-8 o bombesina, como lo demuestra la inhibición que la genisteína ocasiona en la capacidad de estos agonistas para incrementar la concentración de  $Ins(1,4,5)P_3$  (Piiper y cols., 1994). Por el contrario, Jena y cols. (1991) han observado que la adición de tirosinas fosfatasa a células acinares pancreáticas permeabilizadas incrementa la secreción de amilasas dependiente de calcio.

Estudios recientes han demostrado que el tratamiento con genisteína no tiene efecto en la secreción de amilasas estimulada por TPA, pero inhibe parcialmente la secreción estimulada por el ionóforo del calcio A23187 (Lutz y cols., 1993; Duan y cols., 1994), sugiriendo que la movilización de calcio intracelular estimulada por CCK está relacionada con la activación de las tirosinas cinasas, en tanto que la activación de la PKC no (Lutz y cols., 1993; Duan y cols., 1994). Otros estudios han puesto de manifiesto que diferentes inhibidores de las tirosinas cinasas disminuyen la entrada de calcio en la célula sin afectar la liberación de calcio desde el retículo endoplasmático, hecho que sugiere que las alteraciones producidas por los inhibidores de las tirosinas cinasas en la entrada de calcio podrían ser las responsables de la inhibición de la secreción de amilasas estimulada por los secretagogos ensayados (Yule y cols., 1994).



***3.- Efecto de los Factores de Crecimiento  
sobre el Páncreas Exocrino: Experimentos  
"in vivo"***



## **3.1. Metodología**

---

### ***3.1.1. Animales de estudio.***

Para los estudios *in vivo* se han utilizado ratas de ambos sexos de la raza Wistar con peso aproximado de 200 g , y que procedían del Servicio de Animalario de la UEX. En estas instalaciones los animales se hallaban estabulados en habitaciones con ciclos controlados de luz-oscuridad de 12 horas y bajo condiciones constantes de temperatura (23° C), estando alimentados con una dieta comercial estándar para animales de laboratorio permitiéndoles el acceso libre al agua.

### ***3.1.2. Preparación quirúrgica.***

Previamente a la preparación quirúrgica los animales se sometieron a un periodo de ayuno de 8 horas, permitiéndoles en todo momento el acceso al agua.

Todos los experimentos comenzaron a las 10:00 h con el fin de sincronizar las variaciones circadianas de la secreción pancreática (Salido y cols., 1984).

Los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de uretano (Serva) disuelto al 20% en solución salina (NaCl al 0.9%) a la dosis de 0.5-1 g/kg. de peso corporal. El control de la profundidad anestésica se realizó mediante la observación del reflejo faríngeo y del tono muscular de la mandíbula. Siempre que fue necesario se administraron dosis suplementarias de uretano para mantener la profundidad de la anestesia.

Una vez anestesiado, se fijó al animal en posición decúbito supino sobre la mesa de quirófano bajo una fuente de calor, vigilándose en todo momento la temperatura corporal mediante la colocación de un termómetro en la ampolla rectal, ya que la hipotermia modifica la composición y flujo del jugo pancreático (De Dios y cols., 1986). Para proceder a la preparación quirúrgica se afeitó el campo operatorio. En todos los animales se practicó una traqueotomía de rutina para asegurar una correcta ventilación pulmonar a lo largo del experimento.

Posteriormente se procedió a diseccionar la arteria carótida derecha y se introdujo un catéter (0.5x0.9 mm de diámetro, Braum, N.R) con una solución anticoagulante

(Heparina LEO al 0.05%) cuyo extremo se situó en el cayado de la aorta que se utilizó para el registro de la presión arterial a través de un transductor de presión (TRA 021) conectado a un polígrafo (UNI-GRAPH 50, Letica). Seguidamente se disecó la vena yugular izquierda y se implantó un catéter que se usó para la administración endovenosa de las distintas soluciones ensayadas en este estudio.

Para el acceso a la cavidad abdominal se practicó una laparotomía ventral media y se prececió a ligar el píloro, procurando que los vasos epigastroduodenales quedasen libres para no interferir el riego del duodeno. Esta labor tenía como finalidad aislar el estómago del intestino y evitar que el vaciamiento del contenido gástrico a duodeno pudiera modificar la secreción pancreática a través de cambios en los niveles circulantes de hormonas gastrointestinales.

En la rata los jugos pancreático y biliar drenan al duodeno a través de un mismo conducto, el conducto biliar común. Por tanto, se procedió a canular este conducto en su desembocadura en el duodeno. A continuación se canuló el conducto biliar en un punto próximo a su salida del hígado, y se ligó dicho conducto por debajo del punto de entrada de la cánula. De este modo nos aseguramos que lo recogido en la cánula colocada en su desembocadura en duodeno era exclusivamente jugo pancreático.

La cánula situada en el conducto biliar se introdujo a continuación en el duodeno, permitiendo así la circulación enterohepática de las sales biliares, evitando que la ausencia de las mismas en el duodeno pudiera inducir cambios en la secreción pancreática.

La posición del paquete intestinal se modificó ligeramente con el fin de que el jugo pancreático fluyese libremente hacia el exterior. Todas las incisiones se cubrieron con gasas humedecidas en solución salina isotónica a 37° C, manteniéndose los animales en normotermia a lo largo del experimento.

Los animales se sacrificaron al final de los experimentos por dislocación cervical, tras lo cual se procedió a extraer el páncreas. Este se lavó con solución salina para eliminar la mayor cantidad de sangre del tejido. Posteriormente se retiró el tejido graso y los nódulos linfáticos, pesando el tejido resultante, que se dividió en dos fragmentos para la determinación de los contenidos en proteína total, amilasa, ADN y ARN. Estos fragmentos se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80° C hasta su análisis.

### **3.1.3. Recogida de muestras y control de parámetros.**

La recogida de muestras se inició 60 minutos después de realizada la intervención quirúrgica, para permitir durante este tiempo la estabilización de la secreción de jugo pancreático. Una vez transcurrido este tiempo el jugo pancreático se recogió, en tubos Eppendorf previamente pesados, en intervalos de 20 minutos durante un período total de 240 minutos. El jugo pancreático recogido en los 40 primeros minutos se utilizó para calcular el valor basal de la secreción.

La infusión de EGF (2 $\mu$ g/kg/h) (EGF humano recombinante, Calbiochem) o de solución salina comenzó tras los 40 minutos de recogida de muestras basales y continuó durante 180 minutos. Tras finalizar la infusión se recogieron 2 muestras más para caracterizar el retorno a los valores basales.

Tanto EGF como la solución salina se administraron a la misma velocidad (2 ml/min) y el volumen final infundido fue de 360 ml. El EGF se preparó cada día en solución salina que contenía 0.3% de seroalbúmina bovina (Sigma).

Las muestras de jugo pancreático recogidas se almacenaron a -30° C para su posterior análisis enzimático.

En las distintas muestras de jugo pancreático se controlaron los siguientes parámetros:

- Flujo ( $\mu$ l/min.)
- Producción de proteína total ( $\mu$ g/min.)
- Producción de amilasa (mUAA/min.).

### **3.1.4. Diseño experimental.**

Para los estudios *in vivo* dividimos a los animales en 2 grupos de estudio:

#### **3.1.4.1. Animales con tratamiento agudo:**

##### Controles:

Animales a los que tras la intervención quirúrgica se les administró a través de la cánula yugular solución salina siguiendo el protocolo experimental anteriormente

descrito.

**EGF:**

Animales a los que se les administró EGF a la dosis de 2µg/kg/h durante un tiempo total de 180 minutos.

***3.1.4.2. Animales con tratamiento crónico:***

**Tratamiento durante 1 día**

A los animales se les inyectó intraperitonealmente EGF a la dosis de 10 µg/kg cada 8 horas durante 1 día.

**Tratamiento durante 5 días**

Se les inyectó intraperitonealmente EGF a la dosis de 10 µg/kg cada 8 horas durante un período total de 5 días.

**Tratamiento durante 7 días**

A los animales se les inyectó subcutáneamente EGF a la dosis de 10 µg/kg cada 12 horas durante 7 días.

Al finalizar el tratamiento con EGF, a los animales de los tres grupos experimentales se les sometió al procedimiento quirúrgico detallado anteriormente, administrándoles EGF a través de la cánula en la vena yugular, siguiendo el protocolo experimental descrito para los animales con tratamiento agudo.

***3.1.5. Técnicas analíticas empleadas***

***3.1.5.1. Determinación del flujo de jugo pancreático:***

Para el registro del flujo de jugo pancreático la secreción se recogió en tubos Eppendorf previamente pesados, de tal forma que su pesado posterior nos permite conocer la cantidad de jugo secretado en el período de 20 minutos. Esta cantidad

secretada se transformó en unidades de volumen considerando la densidad del jugo pancreático igual a 1g/ml. Las unidades en las que expresamos el flujo fueron ml/min.

### ***3.1.5.2. Determinación de proteína total:***

El contenido de proteína total en el jugo pancreático se determinó por el método BRADFORD (1976), técnica colorimétrica basada en la existencia de dos formas diferentes de Coomassie Brilliant Blue G-250, una roja y otra azul. La forma roja se convierte en azul por la unión a las proteínas.

Para preparar el reactivo de Bradford se disolvieron 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva) en 50 ml de etanol (Panreac) al 95%, añadiendo 100 ml de ácido ortofosfórico (Panreac) al 85% y diluyendo hasta un volumen final de 1 litro con agua bidestilada.

Un volumen de 0.05 ml de la muestra, diluida 1:80, se llevó a 2.5 ml de reactivo de Bradford. Después de 15 minutos y antes de 1 hora se procedió a su lectura en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer Lambda 3B UV/VIS) a 595 nm frente a un blanco preparado con 0.05 ml de agua bidestilada y 2.5 ml de reactivo de Bradford.

Las lecturas de densidad óptica correspondientes a las muestras se compararon con una curva estándar preparada con seroalbúmina bovina (Sigma) disolviendo 2 mg en 1 ml de agua bidestilada y desionizada.

Los resultados se expresaron en mg/ml y, a partir de los valores de flujo, se calculó la producción de proteína total en µg/min.

### ***3.1.5.3. Determinación de la actividad amilásica***

La actividad amilásica se determinó utilizando el método de Noelting y Bernfeld (1948), modificado por Hickson (1970), que se basa en medir colorimétricamente la producción de maltosa liberada a partir de un sustrato de almidón soluble, cuando es incubado con jugo pancreático.

El reactivo de maltosa se preparó disolviendo 2 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Panreac). El color de la disolución cambia de amarillo a rojo cuando se hierve en presencia de un azúcar reductor.

El sustrato fue una solución al 2% (p/v) de almidón (Merck) soluble en un buffer de pH 7.05. Este buffer consistía en fosfato sódico 0.02 M a un pH 7.05. La solución contenía 0.0067M de NaCl (Panreac) para satisfacer los requerimientos de amilasa para los iones cloruro. Este buffer se utilizó para la dilución del jugo

pancreático problema (siempre que fue necesario) y como disolvente para las soluciones estándar de maltosa.

Se añadían 0.05 ml de la muestra, previamente diluida 1:80, a 5 ml de la solución de almidón al 2% en la solución amortiguadora de fosfato, filtrado al vacío con filtro poroso de porcelana, e incubado en un baño a 37° C durante 5 minutos para liberar la maltosa. A continuación se tomó 0.5 ml del contenido de los tubos problema y se añadieron sobre 2.5 ml de reactivo de maltosa.

Paralelamente se hizo un tubo blanco de sustrato con 0.5 ml de almidón al 2% para determinar la cantidad de maltosa libre en la solución de almidón utilizada; asimismo se hizo un tubo blanco de reactivo de maltosa con buffer. Todos los tubos se taparon con torundas de algodón y se sumergieron en agua en ebullición durante 10 minutos. Posteriormente se dejaron enfriar rápidamente y se diluyó 0.5 ml del contenido de cada uno de los tubos en 5 ml de agua bidestilada. Por último se procedió a medir el color desarrollado en un espectrofotómetro a 520 nm, ajustando el cero de absorción con el blanco de reactivo frente al blanco de sustrato.

Las lecturas de densidad óptica correspondientes a los tubos problema se compararon con una curva estándar de maltosa (Merck) preparada a partir de una solución madre que contenía 14 mg de maltosa en solución buffer.

La actividad enzimática se expresó en unidades de actividad amilásica por ml (UAA/ml). A partir de estos valores y los de flujo se obtuvo la producción de amilasa por unidad de tiempo en mUAA/min.

Los valores de flujo, producción de proteínas y producción de amilasa se expresaron como porcentaje respecto de los niveles basales.

#### ***3.1.5.4. Análisis del tejido pancreático***

Para la determinación del contenido de proteína total, amilasa, ADN y ARN el páncreas extraído tras los experimentos de infusión se dividió en dos fragmentos. El primer fragmento (aproximadamente 250 mg) fue homogeneizado en solución salina para las determinaciones de proteína total y de amilasa, utilizando la metodología detallada anteriormente.

El segundo fragmento (300-600 mg) se utilizó para las determinaciones de ADN y ARN total.

#### **Método de extracción de ADN total.**

La determinación de la cantidad de ADN total del páncreas se realizó de acuerdo con el método de Maniatis y cols (1989). El tejido se homogeneizó en 2 ml de tampón de extracción con la siguiente composición: Tris-HCl 10 mM (pH 8.0); EDTA 0.1 M (pH 8.0); RNAasa pancreática 20 µg/ml; SDS 0.5%. Una vez homogeneizado se completó con tampón de extracción hasta 10 volúmenes y se incubó durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se añadió proteinasa K a una concentración final de 100 µg/ml y se mezcló suavemente por inversión durante 1-2 minutos. Se incubó 3 horas a 50°C removiendo periódicamente y se dejó enfriar a temperatura ambiente añadiendo 1 volumen de fenol/cloroformo (1:1 vol:vol) neutralizado a pH 8.0. Las dos fases que aparecen se mezclaron suavemente por inversión durante 10 minutos. A continuación se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a 4°C y se recogió la fase acuosa densa en un tubo limpio repitiéndose la extracción con fenol/cloroformo dos veces más. Una vez realizado esto, se transfirió de nuevo la fase acuosa a un tubo de centrifuga y se añadieron 0.2 volúmenes de acetato potásico 2.5 M y 2 volúmenes de etanol y se mezcló por inversión durante 10 min para favorecer la aparición del precipitado de ADN. Se centrifugó seguidamente a 2500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, lavándose el precipitado de ADN dos veces con etanol al 70% y finalmente se recogió el ADN por centrifugación en las mismas condiciones anteriores. Se dejó evaporar el etanol durante 30-60 min en una estufa a 37°C. Se añadieron entonces 500 µl de TE (10 mM Tris-HCl; 1 M EDTA; pH 8.0) y se dejó la solución toda la noche en un baño orbital a 37°C para conseguir la completa disolución del ADN. Finalmente se midió la absorbancia del ADN a 260 y 280 nm. El ratio 260/280 debe ser mayor de 1.75. Un ratio menor indica la existencia de contaminación con proteínas, en cuyo caso hay que añadir SDS a la preparación y volver a repetir los pasos desde la adición de proteinasa K.

La concentración de ADN se calcula a partir de los valores de densidad óptica. Una densidad óptica a 260 nm de 1 significa que existen aproximadamente 50 µg de ADN por ml.

#### **Método de extracción de ARN total.**

La cantidad de ARN total en las muestras de páncreas se realizó por el método descrito por Serrano en 1991. El tejido se trituró para homogeneizarlo y se añadieron 3 ml de tampón TCES (0.2 M Tris; 0.2 M NaCl; 50 mM EDTA; 2% SDS; pH 8.0) suplementado con β-mercaptoetanol a una concentración final de 1% y 3 ml de fenol/cloroformo (1:1, vol:vol). Se filtró el homogeneizado por una gasa para eliminar

la mayoría de los residuos y se centrifugó durante 10 min a 3000 rpm para separar las fases. Se reextrajo la fase acuosa con 3 ml de fenol/cloroformo, volviendo a centrifugar 5 min en las mismas condiciones. Se eliminaron las pectinas por precipitación de la fase acuosa con 0.5 volúmenes de etanol frío, dejando 5 min en hielo y centrifugando 5 min a 10000 rpm. Se precipitaron los ácidos nucleicos del sobrenadante con 2 volúmenes de etanol frío, incubando 30 min en hielo y centrifugando 10 min a 10000 rpm. Posteriormente se resuspendió en 2.5 ml de agua agitando y calentando unos minutos a 56°C, y se eliminó el material insoluble centrifugando 10 min a 10000 rpm.

A continuación se tomó el sobrenadante y se precipitó el ARN con 2.5 ml de LiCl 6 M, dejando 1 hora en hielo y centrifugando 10 min a 10000 rpm. Se lavó el pellet dispersándolo con un agitador con 4 ml de LiCl 3 M y recentrifugando en las mismas condiciones. Posteriormente, se resuspendió en 1.4 ml de agua y 0.1 ml de acetato potásico 3 M (concentración final de 0.2 M), agitando y calentando unos minutos a 56°C y se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm para eliminar el material insoluble. El pellet se precipitó con 3.75 ml de etanol absoluto, incubando 15 minutos a -80°C y centrifugando como antes. Se lavó con etanol al 70% y se secó al vacío. Finalmente se disolvió con 100 µl de agua, agitando y calentando unos minutos a 56°C.

La concentración de ARN se obtuvo midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. El ratio 260/280 debe ser 1.9-2.0. Si esto se cumple el ARN está libre de sustancias que interfieren en la espectrofotometría y una absorbancia a 260 nm de 1 equivale a 40 µg/ml.

### ***3.1.6. Tratamiento estadístico de los resultados.***

Los valores de los parámetros secretores estudiados se normalizaron a los niveles previos a la estimulación y se calculó el porcentaje de cambio. Para ello, los datos correspondientes al período de infusión, expresados en valores porcentuales, se multiplicaron por el tiempo de control de los mismos (20 minutos), sumando posteriormente cada uno de los datos así obtenidos. Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). La normalidad de los datos se comprobó con el test de Kolmogorov-Smirnov. El análisis estadístico utilizado para determinar diferencias significativas entre grupos fue el análisis de la varianza (ANOVA). Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de P fue menor de 0.05.

## 3.2 Resultados.

### 3.2.1 Respuestas secretoras al EGF.

Los valores basales de flujo de jugo pancreático, producción de proteína total y producción de amilasa en las ratas con tratamiento agudo y en ratas con tratamiento crónico con EGF durante 1 día (10 µg/kg, cada 8 horas), 5 días (10 µg/kg, cada 8 horas) y 7 días (10 µg/kg, cada 12 horas) se muestran en la Tabla I.

**Tabla I: Efecto de los diferentes tratamientos sobre distintos parámetros secretores del páncreas de rata.**

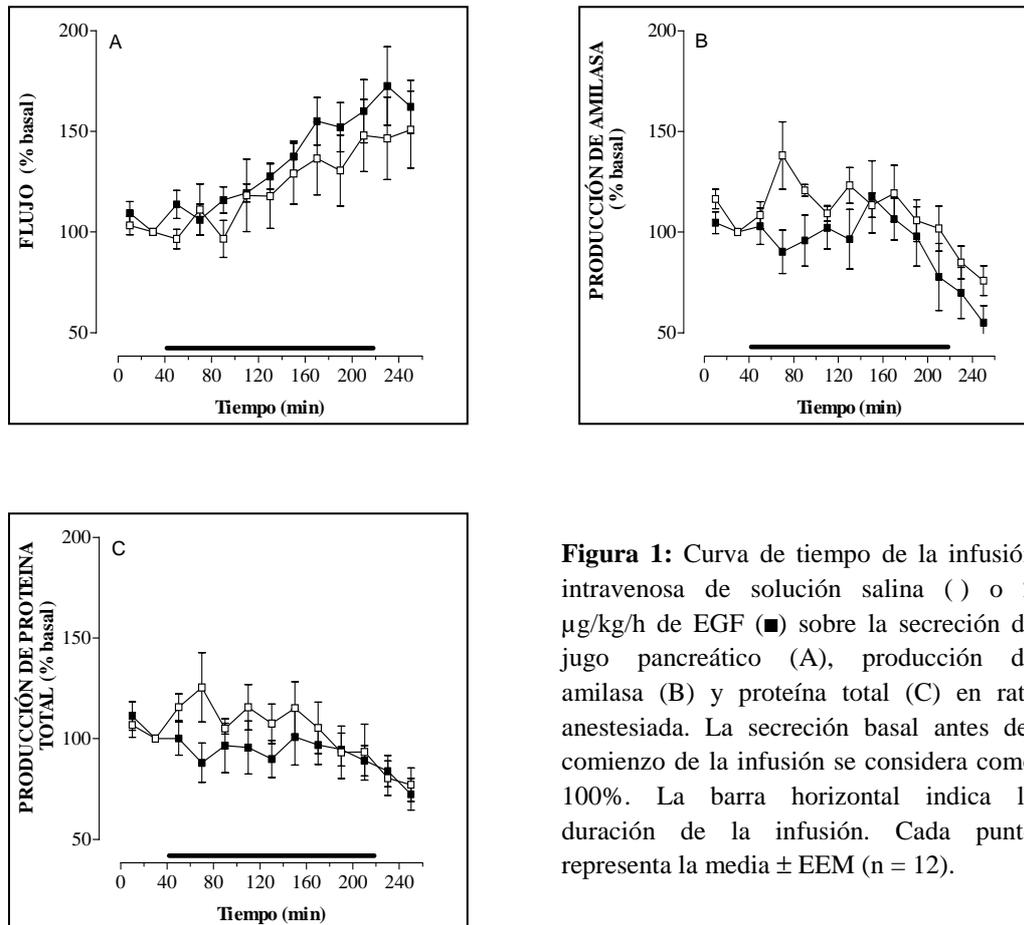
Tratamiento	Flujo (µl/min)	Producción Proteína Total (µg/min)	Producción Amilasa (mUAA/min)	n
Agudo	0.66 ± 0.09	16.44 ± 3.27	29.20 ± 2.99	12
Crónico 1 día	0.75 ± 0.09	15.73 ± 1.95	30.23 ± 4.13	6
Crónico 5 días	0.49 ± 0.14	12.77 ± 0.79	26.66 ± 11.06	5
Crónico 7 días	0.55 ± 0.13	15.28 ± 2.47	33.21 ± 13.02	6

Los valores de la tabla son la media ± EEM de n experimentos diferentes.

Como puede observarse, el pretratamiento de las ratas con EGF durante 1, 5 ó 7 días no modifica significativamente los valores basales de los parámetros secretores estudiados comparados con los valores de los animales agudos (sin pretratamiento con EGF), si bien, y como puede apreciarse en la Tabla I, la producción de amilasa es ligeramente superior en ratas pretratadas con EGF durante 7 días cuando se compara con los observados en animales agudos o sometidos a cualquiera de los otros tratamientos. Igualmente se observa que el flujo de secreción en las ratas con tratamiento crónico durante 1 día es ligeramente mayor que en el resto de tratamientos, mientras que la producción de proteína total es similar en todos los casos.

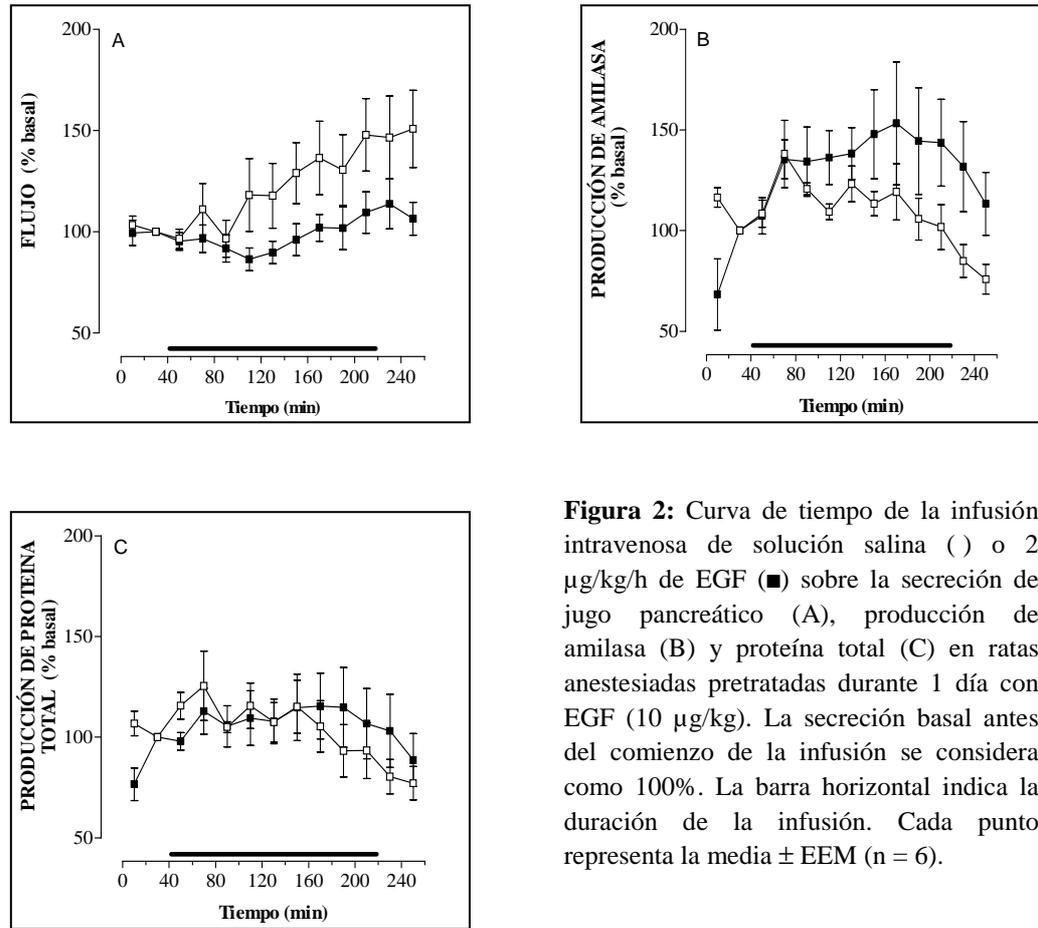
De acuerdo con estudios previos (González y cols., 1993; Pozo y cols., 1995), nuestros resultados en los experimentos controles de los 4 grupos experimentales (agudas y crónicas de 1, 5 y 7 días) demuestran que la velocidad de flujo con la

infusión de solución salina durante un período de tres horas se incrementó, aunque no significativamente, comparado con los valores basales antes de la infusión. Los cambios observados en el flujo se acompañaron por una disminución en la producción de amilasa durante el mismo período, mientras que la producción de proteína total no varía (Figuras 1, 2, 3 y 4).



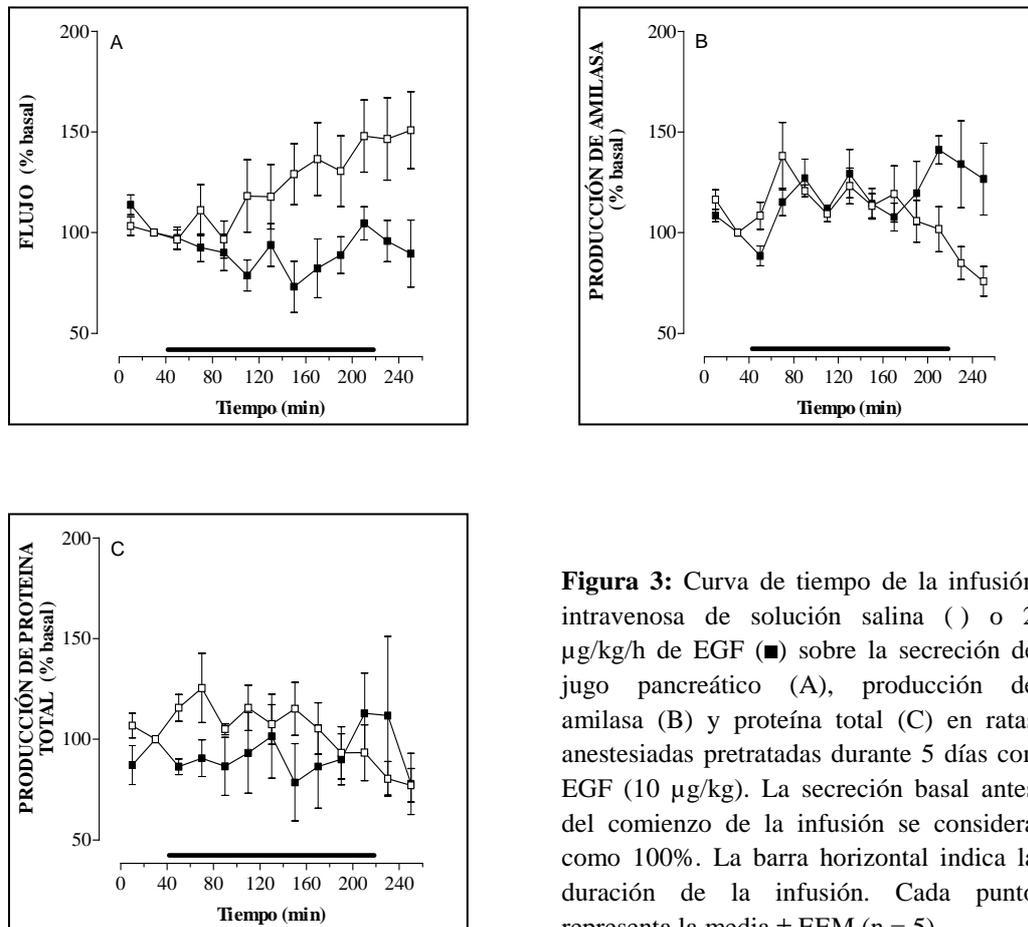
**Figura 1:** Curva de tiempo de la infusión intravenosa de solución salina (□) o 2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  de EGF (■) sobre la secreción de jugo pancreático (A), producción de amilasa (B) y proteína total (C) en rata anestesiada. La secreción basal antes del comienzo de la infusión se considera como 100%. La barra horizontal indica la duración de la infusión. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM ( $n = 12$ ).

La Figura 1 muestra la modificación que, a lo largo del tiempo, induce la infusión intravenosa de EGF (2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ) sobre el flujo de secreción, la producción de amilasa y la producción de proteína total en ratas con tratamiento agudo. Como se puede observar la administración de EGF no modifica significativamente el flujo de jugo pancreático, ni la producción de proteína total durante el tiempo de infusión comparado con el control. Sin embargo, la producción de amilasa es ligeramente inferior que la observada en las ratas controles durante los primeros minutos de la infusión.



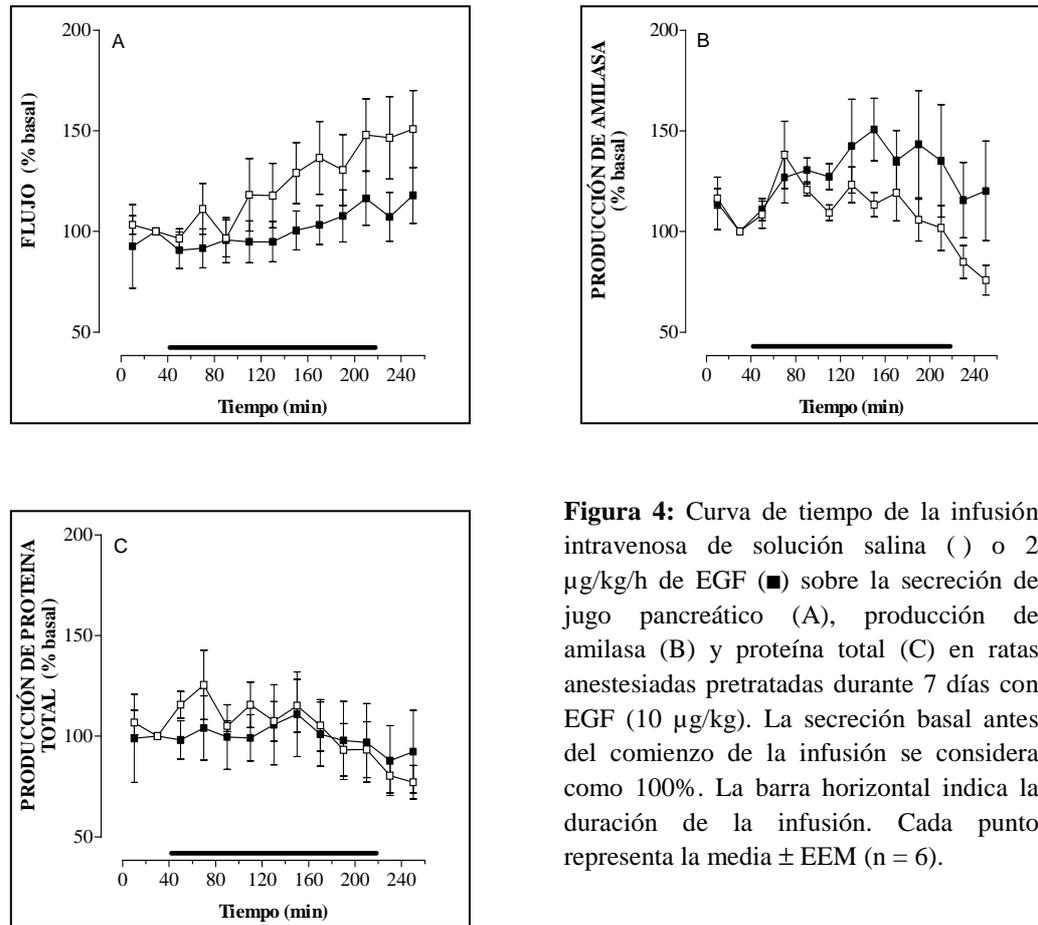
**Figura 2:** Curva de tiempo de la infusión intravenosa de solución salina (□) o 2 µg/kg/h de EGF (■) sobre la secreción de jugo pancreático (A), producción de amilasa (B) y proteína total (C) en ratas anestesiadas pretratadas durante 1 día con EGF (10 µg/kg). La secreción basal antes del comienzo de la infusión se considera como 100%. La barra horizontal indica la duración de la infusión. Cada punto representa la media ± EEM (n = 6).

En la Figura 2 se presentan los resultados obtenidos con la infusión intravenosa de EGF (2 µg/kg/h) en ratas tratadas previamente durante 1 día con EGF (10 µg/kg, cada 8 horas). Bajo estas condiciones experimentales, la infusión de EGF provoca un ligero descenso en el flujo de jugo pancreático a partir de la primera hora de infusión. Esta disminución en la velocidad de secreción está acompañada por un ligero, aunque no significativo, aumento en la producción de amilasa durante el mismo período. Por el contrario, la producción de proteína total no muestra ninguna variación a lo largo del tiempo de infusión comparado con el grupo control.



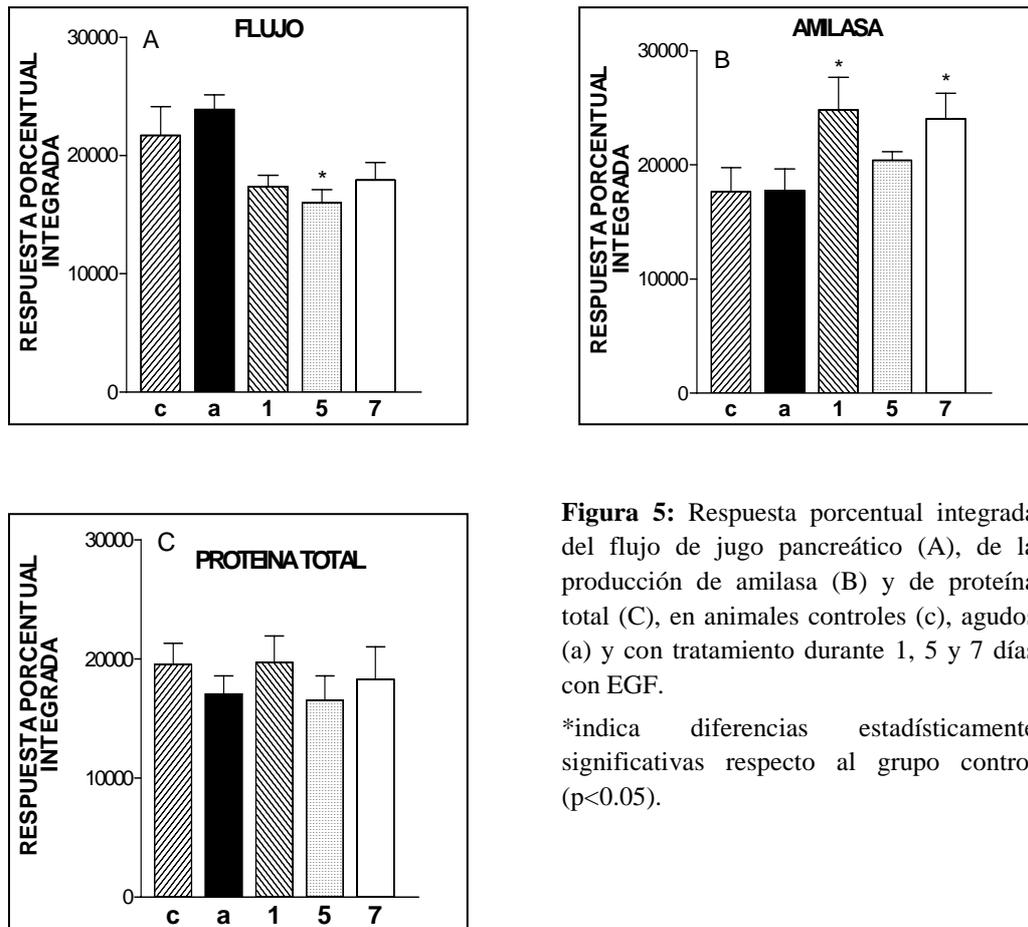
**Figura 3:** Curva de tiempo de la infusión intravenosa de solución salina (○) o 2 µg/kg/h de EGF (■) sobre la secreción de jugo pancreático (A), producción de amilasa (B) y proteína total (C) en ratas anestesiadas pretratadas durante 5 días con EGF (10 µg/kg). La secreción basal antes del comienzo de la infusión se considera como 100%. La barra horizontal indica la duración de la infusión. Cada punto representa la media ± EEM (n = 5).

Los resultados de la infusión intravenosa de EGF (2 µg/kg/h) sobre los parámetros secretores estudiados en ratas pretratadas con EGF durante 5 días (10 µg/kg, cada 8 horas) se representan en la Figura 3. Como puede observarse, la infusión de EGF causa una disminución en el flujo de jugo pancreático después de 1 hora de infusión, comparado con los valores de ratas controles. La producción de amilasa, sin embargo, sufre un aumento después de 160 minutos de iniciarse la infusión con EGF, mientras que la producción de proteína total parece no modificarse sustancialmente a lo largo de todo el período experimental.



**Figura 4:** Curva de tiempo de la infusión intravenosa de solución salina (□) o 2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  de EGF (■) sobre la secreción de jugo pancreático (A), producción de amilasa (B) y proteína total (C) en ratas anestesiadas pretratadas durante 7 días con EGF (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). La secreción basal antes del comienzo de la infusión se considera como 100%. La barra horizontal indica la duración de la infusión. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM (n = 6).

La Figura 4 representa la curva de tiempo del efecto de la infusión intravenosa de EGF (2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ) sobre el flujo de secreción, la producción de amilasa y la producción de proteína total en ratas tratadas previamente con EGF durante 7 días (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , cada 12 horas). Los resultados son similares a los observados en las ratas con tratamiento crónico durante 1 y 5 días, es decir, el EGF es capaz de disminuir ligeramente la velocidad de secreción a partir de la primera hora de infusión. Sobre la secreción de amilasa la infusión de EGF provoca un ligero aumento tras los primeros 40 minutos, siendo muy similar al incremento que se produce en las ratas tratadas durante 1 día y más rápido que en las ratas con tratamiento crónico de 5 días. La producción de proteína total en las ratas tratadas previamente durante 7 días con EGF no sufre modificaciones apreciables durante todo el período de infusión, tal y como sucede en las ratas con tratamiento crónico durante 1 y 5 días.



**Figura 5:** Respuesta porcentual integrada del flujo de jugo pancreático (A), de la producción de amilasa (B) y de proteína total (C), en animales controles (c), agudos (a) y con tratamiento durante 1, 5 y 7 días con EGF.

\*indica diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

La Figura 5 muestra la media de la respuesta porcentual integrada (RPI) del flujo de jugo pancreático (Figura 5A), de la producción de amilasa (Figura 5B) y de la producción de proteína total (Figura 5C) en respuesta a la infusión con EGF (2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ) en los 4 grupos experimentales y en el grupo control. La velocidad de flujo en ratas pretratadas con EGF fue menor que en los animales control, siendo esta disminución solamente estadísticamente significativa en las ratas pretratadas durante 5 días con EGF. También se observa un incremento en la producción de amilasa en los animales con tratamiento crónico con EGF, siendo este aumento estadísticamente significativo en las ratas tratadas durante 1 y 7 días. La producción de proteína total, como se representa en la figura 5C, no sufre modificaciones significativas en ninguno de los grupos experimentales estudiados.

### 3.2.2 Efectos del EGF sobre diferentes parámetros tróficos.

En la Tabla II se observan los efectos de la administración crónica de EGF (10 µg/kg P.C., i.p. tres veces al día durante 1 y 5 días o 10 µg/kg P.C., s.c. dos veces al día durante 7 días) sobre distintos parámetros tróficos del páncreas de rata. Como se observa, el peso del páncreas, el contenido de proteína total y los contenidos totales de ADN y ARN no sufren modificaciones con ninguno de los tres tipos de tratamiento estudiado. Únicamente el contenido de amilasa fue significativamente mayor en las ratas tratadas con EGF durante 7 días comparada con los animales controles.

**Tabla II: Efectos del pretratamiento con EGF sobre diferentes parámetros tróficos del páncreas de rata.**

Parámetros	Control	1 día	5 días	7 días
Peso páncreas (g/kg PC)	6.49 ± 0.21	6.57 ± 0.24	6.77 ± 0.34	6.23 ± 0.49
Proteína total (mg)	178.71 ± 23.30	159.97 ± 22.86	203.23 ± 9.45	205.01 ± 5.36
Amilasa total (U)	122.42 ± 11.89	101.33 ± 16.68	105.23 ± 7.29	192.59 ± 18.08*
ADN total (mg)	310.02 ± 65.67	235.38 ± 27.34	284.23 ± 79.11	202.12 ± 33.75
ADN total (mg)	0.132 ± 0.045	0.12 ± 0.04	0.065 ± 0.016	0.056 ± 0.010

Los valores de la tabla son la media ± EEM. Estos valores se expresan como contenido total por gramo de páncreas. (n = 4-6 ratas por grupo).

\* indica diferencia significativa respecto al control ( $P < 0.05$ ).



### 3.3 Discusión.

---

La hipótesis de que el EGF puede jugar un papel importante en el control de la secreción pancreática exocrina viene apoyada por el hecho de la existencia de receptores específicos para el EGF en acinos pancreáticos (Korc y cols., 1983) y por la observación de que el EGF modula la secreción pancreática exocrina *in vitro* (Logsdon y Williams, 1983a). Además, el EGF se encuentra ampliamente distribuido por todo el tracto gastrointestinal, incluido el páncreas (Jaworek y cols., 1992). El tejido pancreático tiene un contenido medio de EGF de 21.4 µg/g; valor que es nueve veces el contenido de EGF en la mucosa duodenal y la mitad del contenido en las glándulas salivales (Jaworek y cols., 1992). En el hombre, el jugo pancreático también contiene pequeñas cantidades de EGF y la secretina es capaz de producir un ligero incremento en la producción de este factor de crecimiento (Konturek y cols., 1992).

Nuestros resultados demuestran que la infusión intravenosa del EGF puede provocar un ligero incremento en la secreción de amilasa pancreática en ratas pretratadas con EGF (Figuras 2, 3, 4 y 5B). Este efecto estimulador es parcialmente similar al observado por Jaworek y Konturek (1990) en ratas conscientes infundidas subcutáneamente durante 9 horas con EGF, aunque hay que tener en cuenta que nosotros hemos observado una menor estimulación del componente enzimático, un efecto que es posiblemente debido al diferente comportamiento de estas preparaciones. Además, el EGF provoca un ligero descenso en el flujo de jugo pancreático, mientras que la producción de proteína total no varía (Figuras 5A y 5C). Estudios previos de Logsdon y Williams (1983b) junto con nuestros propios resultados indican que el EGF no es capaz de influir en la secreción enzimática durante tratamientos agudos (Figura 1). Así, se requieren exposiciones prolongadas al EGF para poner de manifiesto su efecto estimulador sobre la secreción pancreática exocrina. En este sentido, los trabajos de Logsdon y Williams (1983a; 1983b) demuestran que la exposición prolongada al EGF puede modificar la respuesta secretora en cultivos de acinos pancreáticos. En el presente trabajo, sin embargo, se obtienen resultados similares tras 3 horas de infusión con EGF en ratas pretratadas con este factor durante 1, 5 o 7 días (Figuras 2, 3 y 4). Nuestros resultados también indican que el efecto del EGF sobre la secreción pancreática no puede ser debido a un efecto inespecífico, ya que no hubo cambios en la presión sanguínea arterial durante la duración de los experimentos. No obstante, no podemos descartar que una parte de los efectos observados en este estudio puedan ser debidos a cambios en la circulación

mesentérica, parámetro que no fue estudiado.

Por otra parte, estos resultados sugieren que, en general, la administración crónica de EGF no ejerce efectos estimuladores ni en el crecimiento del páncreas ni en la secreción basal (Tabla II). Nuestras observaciones confirman, al menos en parte, los resultados obtenidos por Morisset y cols. (1989), pero mantienen discrepancias con los datos *in vivo* mostrados por Dembinski y cols. (1982) quienes encuentran un incremento significativo en el peso del páncreas y en los contenidos de ARN y ADN después del tratamiento durante 5 días con EGF 10 µg/kg cada 8 horas. Por el contrario, Morisset y cols. (1989) no encuentran ningún cambio ni en el peso del páncreas ni en el contenido de proteína total. Sin embargo, observan un descenso significativo en el contenido de ADN y un incremento en el contenido de amilasa tras 4 días de tratamiento con la misma dosis de EGF. Resultados similares han sido demostrados previamente en ratas pretratadas durante 5 días (Löser y Fölsch, 1994) y en conejos lactantes después de 14 días de tratamiento con EGF (O'Loughlin y cols., 1985).

La razón de estas observaciones tan contradictorias no está clara y puede estar relacionada con varias diferencias, que pueden incluir la ruta de administración del EGF (subcutánea o intraperitonealmente), la dosis de EGF ensayada, las especies animales utilizadas así como las condiciones experimentales del estudio. Una de las razones más probables podría ser la diferencia en el estado de ayuno o alimentación que presenta el animal cuando se le administra el factor de crecimiento. En el estudio de Dembinski (1982) los animales permanecieron en ayunas 24 horas antes del sacrificio, es decir, durante las tres últimas inyecciones de EGF, que podría inducir un efecto estimulador del crecimiento a corto plazo en los animales en ayunas comparado con los animales alimentados normalmente. Efectos similares después de un período de ayuno han sido descritos en el intestino (Tsujikawa y cols., 1990; 1992). Esto podría demostrar que el estado de ayuno o alimentación tiene una gran influencia en los efectos del EGF incluso en el páncreas (Brannon y cols., 1986; Langlois y Morisset, 1991).

***4.- Estimulación de la Vía de las Tirosinas  
Cinasas en el Páncreas Exocrino:  
Experimentos "in vitro"***



## 4.1. Metodología.

---

### *4.1.1. Lista de reactivos y soluciones.*

- A-23187: Ionóforo del calcio. Sigma Chemical Corporation.
- aFGF: Forma ácida del factor de crecimiento de fibroblastos, humano recombinante. Calbiochem
- Acido plurónico: ácido plurónico F127. Molecular Probes Inc.
- bFGF: Forma básica del factor de crecimiento de fibroblastos, humano recombinante. Calbiochem.
- bFGF fragmento: Fragmento del aminoácido 1 al 24 de la forma básica del factor de crecimiento de fibroblastos. Sigma Chemical Corporation.
- BME aminoácidos: Basal Medium Eagle solución de aminoácidos (x 100). Sigma Chemical Corporation.
- BME vitaminas: Basal Medium Eagle solución de vitaminas (x 100). Sigma Chemical Corporation.
- BSA: Albúmina sérica bovina. Fracción V. Sigma Chemical Corporation.
- CCK-8: Colecistocinina octapéptido (CCK 26-33). Peninsula Laboratories, Inc.
- Colagenasa CLSPA: Worthington Biochemical Corporation.
- Defostatin, Calbiochem.
- Digitonina: Sigma Chemical Corporation.
- DMSO: Dimetilsulfóxido. Merck-Schuchardt.
- DTT: Ditiotreitól. Bio-Rad.
- EDTA: Acido etilendiaminotetraacético. Sigma Chemical Corporation.
- EGF: Factor de crecimiento epidermal, humano recombinante. Calbiochem.
- EGTA: Acido etilenglicol-bis (b-aminoetiléter) N, N, N', N-tetraacético. Sigma Chemical Corporation.
- Fumarato sódico: ácido fumárico sal disódica anhidra. Fluka.
- Fura-2AM: fura-2 acetoximetil éster (cell permeant). Molecular Probes Inc, Sigma Chemical Corporation.
- Genisteína: (4,5,7-Trihidroxiisoflavona). Sigma Chemical Corporation.
- GF109203X: Calbiochem.
- Glutamato sódico: ácido L-glutámico sal monosódica. Fluka.

- Glutamina: L-glutamina. Sigma Chemical Corporation.
- Hepes:(ácido N-[Hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico]). Sigma Chemical Corporation.
- Inhibidor de tripsina. Sigma Chemical Corporation.
- Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>: ortovanadato sódico. Sigma Chemical Corporation.
- PAO: oxido de fenilarsina. Calbiochem.
- Phadebas: Phadebas amylase test. Pharmacia LKB Biotechnology Inc.
- Piruvato sódico: ácido pirúvico sal sódica. Fluka.
- SDS: lauril sulfato sódico. Sigma Chemical Corporation.
- Tapsigargina: Biomol, Calbiochem.
- Tirfostina A25: Sigma Chemical Corporation.
- TPA: 13, acetato de 12, O-tetradecanoil forbol. Sigma Chemical Corporation.

Los demás reactivos utilizados rutinariamente en el laboratorio para la preparación de soluciones han sido de grado analítico.

A continuación aparecen tablas en las que se detalla la composición de las soluciones empleadas para la obtención de acinos pancreáticos:

Reactivos	Concentración final
NaCl	120 mM
KCl	1,2 mM
Piruvato sódico	6 mM
Fumarato sódico	7,1 mM
Glutamato sódico	6 mM
D-glucosa	14 mM
Inhibidor de tripsinas	1 mg/ml
Solución de aminoácidos	25 ml/l
Hepes	24 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,2 mM
Solución de vitaminas	1 %
Glutamina	0,03 %
Albumina sérica bovina	0,2 %
CaCl <sub>2</sub>	2 mM

**Tabla 1:** Composición de la solución de lavado. Se ajusta el pH a 7.45 con NaOH 10 N.

Reactivos	Concentración final
NaCl	120 mM
KCl	1,2 mM
Piruvato sódico	6 mM
Fumarato sódico	7,1 mM
Glutamato sódico	6 mM
D-glucosa	14 mM
Inhibidor de tripsinas	1 mg/ml
Solución de aminoácidos	25 ml/l
Hepes	24 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,2 mM
Solución de vitaminas	1 %
Glutamina	0,03 %
Albumina sérica bovina	4 %
CaCl <sub>2</sub>	2 mM

**Tabla 2:** Composición de la solución de parada. Se ajusta el pH a 7.45 con NaOH 10 N.

Reactivos	Concentración final
NaCl	120 mM
KCl	1,2 mM
Piruvato sódico	6 mM
Fumarato sódico	7,1 mM
Glutamato sódico	6 mM
D-glucosa	14 mM
Inhibidor de tripsinas	1 mg/ml
Solución de aminoácidos	25 ml/l
Hepes	24 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,2 mM
Solución de vitaminas	1 %
Glutamina	0,03 %
Albumina sérica bovina	1 %
CaCl <sub>2</sub>	0,5 mM

**Tabla 3:** Composición de la solución de incubación. Se ajusta el pH a 7.45 con NaOH 10 N.

---

---

Reactivos	Concentración final
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
SDS (lauril sulfato sódico)	0,1 %
Albumina sérica bovina	0,1 %
CaCl <sub>2</sub>	4mM

---

**Tabla 4.** Composición de la solución de lisis. Se ajusta el pH a 7.8 con NaOH 10 N.

---

Reactivos	Concentración final
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM
NaCl	50 mM
Azida sódica	0,02 %

---

**Tabla 5.** Composición del Reactivo de amilasas. Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 10 N.

---

Reactivos	Concentración final
NaCl	140 mM
KCl	4,7 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,13 mM
HEPES	10 mM
Glucosa	10 mM
Inhibidor de Tripsina	0,01 %
CaCl <sub>2</sub>	1,1 mM

---

**Tabla 6.** Composición del Na-HEPES. Esta solución se preparó con agua de calidad Milli-Q. Se ajusta el pH a 7.3-7.4 con NaOH 10 N.

#### **4.1.2. Animales de estudio.**

Se han utilizado ratas Wistar de ambos sexos y pesos corporales comprendidos entre 200 y 300 g. Los animales han sido suministrados por el Servicio de Animalario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, en condiciones de acuerdo al Instrumento de Ratificación del Convenio Europeo sobre protección de animales vertebrados utilizados con fines científicos (B.O.E. nº 256 de 25 de octubre de 1990).

Las ratas se mantenían a la temperatura ambiental de 25°C, con ciclo luz-oscuridad de 12 horas. Ocho horas antes de su utilización experimental eran privadas de alimento, permitiéndoseles el libre acceso al agua.

#### **4.1.3. Método de aislamiento de acinos pancreáticos.**

Para el aislamiento de acinos pancreáticos se siguió el método descrito por Peikin y cols en 1978, modificado posteriormente por Jensen y cols en 1982.

Las ratas Wistar fueron sacrificadas mediante dislocación cervical, tras lo cual se situaron en decúbito costal derecho y se les practicó una laparotomía retrocostal izquierda a través de la cual se procedió al abordaje de la cavidad abdominal. Tras seccionar el peritoneo se accedió al páncreas y se separó del bazo, de la curvatura mayor del estómago, del colon transversal y del duodeno.

El páncreas se depositó en una placa de disección donde inicialmente se retiró todo el tejido graso periférico, los ganglios linfáticos y los vasos sanguíneos; posteriormente se fijó sobre dicha placa y se procedió a la inyección de una solución de colagenasa disuelta en solución de lavado (35 unidades de colagenasa/ml).

El páncreas se introdujo en un matraz Erlenmeyer, junto con el volumen de solución de colagenasa que no se pudo introducir en el tejido pancreático mediante la inyección, se gasificó con oxígeno al 100% y se incubó en un baño orbital a 150 ciclos/min y 37° C durante 10 min. Tras este período de tiempo se retiró la solución de colagenasa sobrante, sustituyéndola por 5 ml de solución de colagenasa nueva, se oxigenó de nuevo y se incubó durante 10 min en las mismas condiciones anteriores. Transcurrido este tiempo se repitió la operación de vertido de la solución de colagenasa, se añadieron 8 ml de solución nueva y se volvió a oxigenar, incubando nuevamente durante 10 min. Al término de este período se agitó vigorosamente el matraz Erlenmeyer, con objeto de disgregar totalmente el tejido pancreático.

La suspensión obtenida se transfirió a tres tubos cónicos de plástico de 15 ml de

capacidad donde se le añadió solución de parada a 4° C, con la finalidad de detener la digestión de la colagenasa.

El siguiente paso consistió en limpiar la suspensión de todos aquellos restos de la digestión así como de los agregados de acinos demasiado grandes. Para ello la suspensión se centrifugó a 50 g durante 2 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y los acinos se resuspendieron en solución de lavado. Se repitió el proceso de centrifugado y se resuspendieron en solución de incubación. En esta solución las células acinares permanecen viables durante el tiempo necesario para la realización de los experimentos, debiendo ser oxigenadas a intervalos de 30 min.

Periódicamente se realizaron pruebas para comprobar la viabilidad de las células acinares. Para ello se empleó la técnica de la exclusión del azul tripán, una prueba fácil de realizar, y que permite detectar las células que han sido dañadas irreversiblemente durante el proceso de aislamiento (Baur y cols., 1975). La técnica se basa en que el colorante penetra en todas las células; sin embargo, aquellas células que mantienen íntegros los mecanismos de transporte activo de sus membranas, expulsan el colorante, en tanto que las que han sido dañadas no lo expulsan, quedándose el colorante en el interior celular y mostrando color azul al microscopio.

#### ***4.1.4. Determinación de la secreción de amilasas.***

Para determinar la secreción de amilasas en acinos pancreáticos de rata, se diluyó la suspensión acinar obtenida por el método descrito anteriormente hasta un volumen final aproximado de 100 ml en solución de incubación .

En ciertos protocolos experimentales fue necesaria la preincubación de los acinos con los diferentes inhibidores ensayados durante un período de tiempo que dependía del inhibidor empleado. Todos los experimentos que se realizaron con el método de la determinación de amilasas se llevaron a cabo por duplicado.

En el instante previo a la incubación de los acinos se tomó una pequeña muestra de la suspensión, 300 µl, que se centrifugó a 350 g durante dos minutos, con objeto de detener la secreción de amilasas de los acinos que se encontraban en dicha muestra de la suspensión. Estas muestras, denominadas muestras cero, servían para conocer posteriormente la cantidad de amilasas que había en el sobrenadante de la solución acinar previo al inicio de la incubación con los distintos secretagogos; este valor fue restado de todos los demás en el momento de realizar los cálculos. Se tomaron dos muestras para cada serie de experimentos.

A continuación se llevó a cabo la incubación de los acinos pancreáticos con los

agonistas estudiados. Para ello se incubaron 500  $\mu$ l de la suspensión de células acinares, durante 30 min, con los distintos secretagogos, a temperatura constante de 37°C, gasificados con O<sub>2</sub> 100% al inicio de la incubación y con agitación de 60 ciclos/min. Con el fin de conocer la secreción de amilasas en ausencia de estímulo, es decir, la secreción basal, se incubaron en las condiciones anteriormente descritas una serie de muestras sin los secretagogos estudiados, las cuales se localizaron al inicio, en medio y al final de las muestras incubadas con agonistas.

De la suspensión acinar empleada para la realización de los experimentos se tomaron 2 muestras de 500  $\mu$ l, a las que se les añadieron 5 ml de solución de lisis y se agitaron. Esta solución es capaz de lisar las membranas citoplasmáticas de la células acinares, permitiendo que el contenido total de amilasas que hay en cada célula sea liberado. Estas muestras se denominaron muestras totales y nos permitieron conocer la cantidad total de amilasas que las células de la suspensión acinar tenían en los gránulos de zimógeno. Así pues, los resultados se expresaron como tanto por ciento de secreción respecto a la cantidad total de amilasas de la suspensión acinar.

Al finalizar el período de incubación se detuvo la secreción de amilasas centrifugando 300  $\mu$ l de cada muestra a las mismas condiciones que las muestras cero.

La determinación de la cantidad de amilasas que se había secretado durante la incubación de la suspensión acinar con y sin secretagogos se llevó a cabo por el Phadebas<sup>®</sup> Amylase Test (Gardner y Jackson, 1977; Jensen y cols, 1982), método colorimétrico muy adecuado para el análisis cuantitativo de la  $\alpha$ -amilasa en una solución o líquido biológico. El reactivo es un sustrato polímero de almidón insoluble, portador de un colorante azul. Este sustrato se hidroliza por acción de la  $\alpha$ -amilasa dando lugar a fragmentos azules solubles en agua. La absorbancia de la solución azul es función lineal de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa en la muestra.

La mezcla del reactivo se preparó suspendiendo el sustrato a razón de 1 tableta de Phadebas<sup>®</sup> Amylase Test por cada 20 ml de Reactivo de amilasas. La mezcla se mantuvo en agitación para que la suspensión del reactivo fuera uniforme, ya que el sustrato es insoluble en agua.

Se añadieron 200  $\mu$ l de la solución de lisis a 100  $\mu$ l de las muestra cero y de las muestras incubadas. Los 300  $\mu$ l resultantes de las muestras cero, de las muestras problemas y de las muestras de totales se incubaron con 2 ml de la mezcla del reactivo de Phadebas a 37°C y sin agitación, durante un período aproximado de 5 min. Una vez transcurrido este tiempo se detuvo la reacción con NaOH, (para ello se añadieron 500  $\mu$ l de NaOH 0,5 N a cada tubo). Seguidamente se diluyó el contenido de los tubos añadiendo 8 ml de agua destilada a cada uno de ellos, tras lo cual se centrifugaron a 700 g durante 4 minutos para separar el sustrato del sobrenadante y poder determinar colorimétricamente la cantidad de colorante liberado en cada tubo.

Finalizado todo el proceso se leyó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a 620 nm de longitud de onda, se calculó la liberación de amilasas y se representaron los resultados como el porcentaje de la actividad amilásica total, presente en los acinos al inicio de la incubación, liberado al medio extracelular durante la misma, frente a la concentración del secretagogo (como logaritmo de la concentración molar).

#### *Cálculo de la secreción de amilasas*

La secreción de amilasas se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Secreción de amilasa} = [(A_i - A_o) / (K \times A_T - A_o)] \times 100$$

Donde :

$A_i$  : absorbancia del tubo de incubación del experimento.

$A_o$  : absorbancia de los tubos cero del mismo par de la serie experimental (media de los dos que se realizan)

$A_T$  : absorbancia de los tubos totales del mismo par de la serie experimental (media de los dos que se realizan).

$K$  : 3,67 (Factor de corrección debido a que la dilución final de los tubos totales al añadir 500  $\mu$ l de suspensión acinar a 5 ml de solución de lisis fue 1/11 pero se añadió 3 veces más cantidad (300  $\mu$ l) que de los tubos de incubación (100  $\mu$ l) para la incubación con el reactivo de Phadebas, por lo tanto el factor de corrección es 11/3 o 3,67).

Los datos se representan como valores sobre la secreción basal, para lo cual a todos los valores obtenidos con el método descrito anteriormente se les resta el valor del basal con objeto de simplificar la realización de comparaciones entre los distintos tratamientos.

### ***4.1.5. Determinación de la concentración de calcio intracelular.***

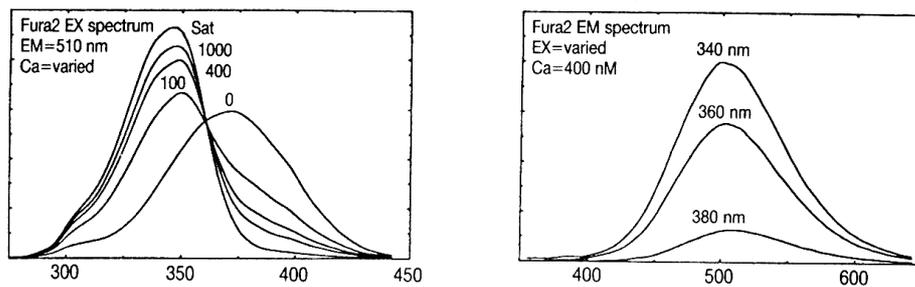
#### ***4.1.5.1 Introducción.***

El desarrollo de indicadores fluorescentes de la concentración de calcio que pueden cargarse dentro de las células marcó un hito en los estudios de la homeostasis

del calcio celular, y se deben principalmente a Tsien y cols en los años 80. Estos autores popularizaron el uso del indicador quin-2 para los estudios de la concentración intracelular de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) y contribuyeron al desarrollo de nuevas sondas útiles en estudios de la regulación de la  $[Ca^{2+}]_i$  por hormonas y otros agonistas.

Para el desarrollo de nuestro trabajo hemos utilizado el indicador fura-2 para las medidas de la  $[Ca^{2+}]_i$ . El fura-2 es la sonda fluorescente más empleada para el calcio. Este compuesto es alrededor de 30 veces más fluorescente que el quin-2, tiene una mayor  $K_d$  para el calcio, menor sensibilidad al magnesio, es más fotoestable y además puede utilizarse en forma de cociente entre la fluorescencia emitida por las 2 longitudes de onda de excitación. El fura-2 se usa a concentraciones intracelulares del orden de micromolar, contrariamente al quin-2 que se emplea a concentraciones del orden de milimolar, y por tanto el fura-2 tiene mucho menor efecto quelante de calcio. Con una  $K_d$  para el calcio comprendida entre 150-225 nM, este indicador es capaz de detectar concentraciones de calcio de hasta micromolar, aunque su sensibilidad disminuye al superar concentraciones de calcio de aproximadamente 600 nM. El principal problema que presenta esta sonda es que la forma acetoxi-metil éster (forma de carga en las células) no se hidrolice completamente, además de su tendencia a compartimentalizarse en orgánulos subcelulares durante el proceso de carga.

Cuando el fura-2 se une al calcio, su máximo de excitación se desplaza hacia bajas longitudes de onda, con un desplazamiento despreciable de la emisión máxima. Esto permite que el fura-2 sea utilizado como un indicador de doble excitación. El fura-2 libre se excita a 380 nm mientras que la forma unida al calcio se excita a 340 nm. El fura-2 tiene un punto isobéptico (punto de isofluorescencia) a 360 nm que es útil para monitorizar la fluorescencia no dependiente de calcio o para apreciar el “quenching” (pérdida de fluorescencia cuando el fura-2 se une a determinados compuestos) debido a iones de metales pesados (Figura II).



**Figura II:** Espectros de excitación y emisión del Fura-2. Tomado de *Cellular Calcium: A practical approach*. The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells. Andrew P Thomas and Fernando Delaville. Oxford University Press. 1991, pp: 1-54.

#### 4.1.5.2 *Carga con el indicador.*

Una vez obtenida la suspensión de células acinares realizábamos una partición del volumen total, destinando una parte para la determinación de la autofluorescencia, células que no se incubaban en presencia del indicador, y el resto se incubaban a temperatura ambiente (20-23°C) en Na-Hepes 0.5% (p/v) BSA con una concentración 4  $\mu\text{M}$  de fura-2/AM (acetoxi-métil éster del indicador fura-2) y ácido plurónico (concentración final no superior al 0.025% v/v) durante 40 minutos en agitación (100 ciclos/min) y constante aireación con  $\text{O}_2$  100% saturado en agua. Concluida esta primera incubación se practicaba una centrifugación suave (50g) a 4°C durante 4 minutos, se decantaba el sobrenadante y se resuspendía el pellet en Na-Hepes que no contenía BSA. Seguidamente se incubaban nuevamente, esta vez a 37°C con oxigenación y en un baño con agitación (100 ciclos/min), durante 30 minutos. Esta etapa estaba dirigida a dar tiempo para que se produjera la completa deesterificación de la forma éster del indicador a cargo de las esterasas citosólicas, lo que genera que el indicador quede en forma iónica (fura-2) y que se conoce con el nombre de "cleaving".

Al término de esta última incubación se centrifugaba la suspensión de células (50 g a 4°C durante 4 minutos) y tras decantar el sobrenadante se resuspendía el pellet en Na-Hepes sin BSA. Esta suspensión final de células acinares pancreáticas se mantenía sobre hielo hasta su utilización.

La viabilidad de las células se ensayaba, tanto al comienzo de los experimentos como al final de cada sesión, mediante extrusión de azul tripán manteniéndose viables en un número superior al 95%.

Todos los experimentos fueron realizados dentro de las 2 horas siguientes a la incubación con el indicador.

#### **4.1.5.3 Seguimiento continuo de la fluorescencia en células aisladas.**

Se colocaban alícuotas de la suspensión celular sobre un cubreobjetos circular de 22 milímetros de diámetro y 0.17 milímetros de grosor dentro de una cámara de perfusión fabricada para este propósito; el volumen total interno de la misma no superaba los 250  $\mu$ l. A su vez la cámara de perfusión estaba montada sobre la platina de un microscopio invertido de fluorescencia Diaphot 300 de NIKON, equipado con un objetivo NIKON Fluor X40 para fluorescencia. Las células acinares pancreáticas se perfundían con un tampón Na-Hepes, a una velocidad de flujo de 1.5 ml/min, lo que permitía renovar completamente el contenido de la cámara cada 10-15 segundos, o con soluciones que contenían los agentes que se querían ensayar.

Para el análisis de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  se utilizaron dos sistemas de detección:

a.- sistema de detección multipunto (Camera System) suministrado por Newcastle Photometric Systems (NPS), y

b.- sistema digital ArgusHisCa desarrollado por Hamamatsu.

Ambos sistemas nos permitían detectar cambios en la fluorescencia emitida por el indicador en respuesta a su excitación con luz procedente de una lámpara de xenon de arco corto de 100 vatios. La excitación cambiaba alternativamente mediante el empleo de una rueda de filtros, bien de NPS o bien procedente de Sutter Instruments, (modelo Lambda 10-2) capaz de cambiar las posiciones de cada uno de los filtros, para excitar sucesivamente a 340 o a 380 nm. La luz de longitud de onda deseada se dirigía hacia la muestra mediante el empleo de un espejo dicroico (DM 400). La fluorescencia emitida se recogía a una longitud de onda por encima de 505 nm por medio de un filtro barrera situado bajo el espejo dicroico y se dirigía hacia la cámara.

La autofluorescencia determinada en las células aisladas representaba menos del 3-5% de la señal emitida y, por tanto no era sustraída en los cálculos.

#### **4.1.5.4 Análisis digital de la $[Ca^{2+}]_i$ .**

##### **El sistema de detección y el software.**

El sistema de detección multipunto NPS emplea una cámara de integración refrigerada (Peltier Cooled Slow Scan CCD, modelo EEV CCD02-06 de Wright Instruments UK, de 16 bits), permitiendo capturar fotones de imágenes con bajo nivel de fluorescencia. Los tiempos de exposición pueden variar desde 50 milisegundos hasta varios segundos, lo que permite una mejora considerable en la relación

señal/ruido.

El sistema está manejado por un software específico (Camera System, versión 6.61, O Newcastle Photometric Systems) que capta la fluorescencia emitida por hasta 16 regiones de interés en el campo de estudio y muestra los valores en tiempo real. Las 16 regiones de interés se seleccionan mediante el uso del ratón. Una vez comenzado el experimento es posible realizar un seguimiento continuo de la fluorescencia emitida en cada región empleando hasta 4 longitudes de onda de excitación diferentes. El sistema está particularmente adaptado para el trabajo con fluoróforos de dos longitudes de onda de excitación (fura-2, mag-fura-2, BCECF, SBFI,...).

Mediante el empleo del teclado se manejan las instrucciones necesarias para la consecución de los experimentos, permitiendo definir el tiempo de exposición de la cámara, las combinaciones de los filtros, la ganancia, la duración del experimento y el tipo de gráfico (ratio y/o longitudes de onda) que se quiere observar durante el experimento.

Durante la marcha del experimento el programa substrahe los valores de "background" a cada valor de fluorescencia y muestra la información numérica y gráficamente en tiempo real.

También es posible realizar marcas de tiempo para identificar las manipulaciones experimentales realizadas (por ejemplo, cambios de soluciones, administración de drogas, etc.). Esta información es almacenada automáticamente y puede ser editada en cualquier momento para su uso al término de cada sesión.

El sistema ArgusHisCa está provisto de una cámara Hamamatsu Hisca CCD, modelo C6790 de alta velocidad, que permite el análisis de imágenes de fluorescencia de diferentes regiones del campo del microscopio. El software ArgusHisCa permite un sencillo manejo, pudiéndose realizar las mismas operaciones que con el anterior. Su ventaja es que graba automáticamente las imágenes de fluorescencia, lo que permite detectar posibles artefactos en los registros del ratio, mientras que el sistema de NPS sólo graba imágenes concretas a petición del usuario durante el experimento

#### *Cuantificación de la fluorescencia y $[Ca^{2+}]_i$*

La cuantificación de la  $[Ca^{2+}]_i$  se basa en la transformación de los datos experimentales originales, esto es, el cociente F340/F380, que determina el ratio de la fluorescencia emitida cuando las células se excitan a 340 y 380 nm respectivamente. El cálculo de la  $[Ca^{2+}]_i$  se determina por el método de Grynkiewicz y cols (1985), utilizando la fórmula:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \times (R - R_{min} / R_{max} - R) \times Sf / Sb, \text{ donde:}$$

R<sub>min</sub> es el ratio de fluorescencia en medio libre de calcio,

R<sub>max</sub> es el ratio de fluorescencia en condiciones de saturación,

S<sub>f</sub> es la intensidad de fluorescencia sin calcio con excitación a 380 nm,

S<sub>b</sub> es la intensidad de fluorescencia a concentración saturante de calcio con excitación a 380 nm, y

K<sub>d</sub> es la constante de disociación del indicador fura-2 para el calcio.

El primer paso fue la realización de una calibración de nuestro sistema empleando para ello un kit de soluciones con diferentes concentraciones de Ca<sup>2+</sup> (Molecular Probes Inc.) para determinar la constante de disociación del indicador fura-2 para el ion Ca<sup>2+</sup> (K<sub>d</sub>) en nuestras condiciones experimentales. La K<sub>d</sub> de un indicador se define como el punto de saturación de su molécula al 50%, y se expresa como una concentración (nM). Usando la fluorescencia emitida por el indicador en presencia de diferentes concentraciones de calcio que presentan las soluciones de este kit podemos calcular el valor de esta constante. Así pues, alícuotas de 200 µl de cada una de las soluciones, en presencia de 10 µM de la sal pentapotasio de fura-2, se colocaban sobre un cubreobjetos encima de la platina del microscopio y se medía la fluorescencia emitida a 505 nm cuando se excitaba a 340 y 380 nm.

Representando los cambios en la fluorescencia emitida por las muestras frente a la concentración de calcio tenemos una representación lineal en la que el valor que adquiere la variable X cuando Y es igual a 0 nos da el logaritmo decimal de la K<sub>d</sub> del fura-2 para el ion Ca<sup>2+</sup>. De esta manera obtuvimos un valor para la K<sub>d</sub> de 219 nM, valor que sería empleado en lo sucesivo para la realización de los cálculos pertinentes.

Para la determinación de los restantes parámetros (R<sub>min</sub>, R<sub>max</sub> y S<sub>f</sub>/S<sub>b</sub>) las células se perfundieron con una solución de 10 µM de ionomicina en presencia de 10 mM de CaCl<sub>2</sub> para obtener el ratio máximo de fluorescencia mientras que para el R<sub>min</sub> se perfundieron con una solución de 10 µM de ionomicina que contenía 10 mM de EGTA. La intensidad de fluorescencia a 380 nm en condiciones de ausencia de calcio determinó el S<sub>f</sub>, mientras que la intensidad de fluorescencia a 380 nm en presencia de una concentración saturante de calcio nos da el valor de S<sub>b</sub>.

#### **4.1.6. Tratamiento estadístico.**

Los resultados obtenidos experimentalmente se han expresado como media ± error estándar de la media (EEM), y los hemos presentado gráficamente frente al logaritmo de la concentración del secretagogo empleado.

Los resultados de la secreción de amilasas se han presentado como porcentaje de la secreción de amilasas, respecto a la secreción total, frente al logaritmo de la concentración del estímulo. Todos los datos se expresan como valores sobre la secreción basal. Los resultados obtenidos empleando el método de la determinación de calcio intracelular se expresan como  $[Ca^{2+}]_i$  en molaridad.

En las curvas dosis-respuesta se llevó a cabo una regresión no lineal para ajustar una curva a los datos experimentales, obteniendo para cada curva los dos parámetros que la definen: Efecto máximo o EM (parámetro indicativo de la eficacia) y Concentración eficaz 50 o EC50 (parámetro indicativo de la potencia). Para comparar las curvas dosis-respuesta obtenidas con distintos tratamientos se emplearon estos parámetros, realizando para dicha comparación un análisis de la varianza o ANOVA cuando el número de grupos era superior a dos o una t de Student's cuando el número de grupos a comparar era de dos. En aquellos ANOVA que mostraron diferencias significativas entre los grupos comparados se realizaron posteriormente comparaciones dos a dos mediante el test de Scheffe. Todos los valores de p inferiores a 0,05 los hemos considerado como significativos.

## 4.2. Resultados de la estimulación directa de la vía de las tirosinas cinasas por factores de crecimiento.

### 4.2.1. Efectos de los factores de crecimiento sobre la secreción de amilasa.

En la Tabla III se recogen los resultados de la liberación de amilasa en respuesta a la estimulación de las células acinares con concentraciones crecientes de distintos factores de crecimiento, el factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). El FGF se ensayó en dos de sus formas, la forma ácida (aFGF) y la forma básica (bFGF), tanto la molécula entera como el fragmento inicial desde el aminoácido 1 al 24.

**Tabla III: Efecto de diferentes factores de crecimiento sobre la secreción de amilasa.**

Concentración	EGF	bFGF (fragmento)	bFGF	aFGF
Basal	3.45 ± 0.53	6.07 ± 0.78	4.86 ± 0.29	4.51 ± 0.65
320 nM	3.60 ± 0.62			
100 nM	3.58 ± 0.48			
32 nM	3.73 ± 0.43			
10 nM	3.49 ± 0.58			
3.2 nM	3.36 ± 0.50			
1 nM	3.53 ± 0.59	6.03 ± 0.95	4.77 ± 0.28	4.79 ± 0.73
320 pM	3.62 ± 0.41	5.51 ± 0.65	4.85 ± 0.35	4.64 ± 0.66
100 pM		6.29 ± 0.81	4.68 ± 0.30	4.65 ± 0.71
32 pM		5.51 ± 0.63	4.61 ± 0.29	4.58 ± 0.70
10 pM		5.79 ± 0.72	4.57 ± 0.25	4.35 ± 0.66
3.2 pM		5.69 ± 0.66	4.57 ± 0.29	4.68 ± 0.69
1 pM		5.91 ± 0.75	4.79 ± 0.33	4.60 ± 0.67

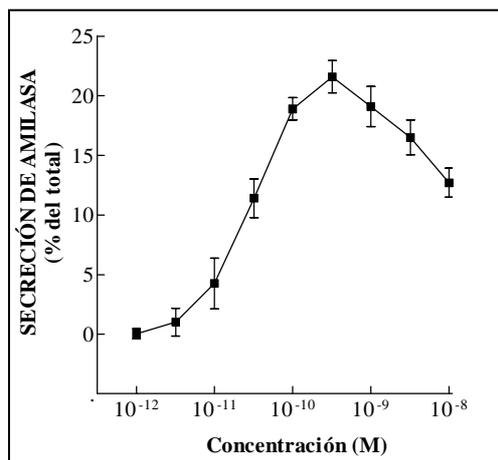
Los resultados son la media ± EEM de 6-7 experimentos y se expresan como porcentaje del contenido total de amilasa al comienzo de la incubación.

La secreción basal de amilasa en acinos pancreáticos de rata estuvo comprendida entre 3.5 y 6% del contenido total de amilasa al comienzo de la incubación. La estimulación de los acinos pancreáticos de rata con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) durante 30 minutos a concentraciones comprendidas entre 320 pM y 320 nM no modificó significativamente la secreción de amilasa cuando se comparó con su respectivo valor basal, mostrando la secreción unas oscilaciones que no siguen claramente ningún patrón estimulador o inhibidor.

De forma similar, ninguna de las formas de FGF estudiadas (aFGF y bFGF – molécula entera o fragmento-) modificó la liberación de amilasa en acinos pancreáticos de rata incubados durante 30 minutos con concentraciones crecientes de ambos factores comprendidas entre 1 pM y 1 nM, cuando se comparan con sus valores basales, correspondiendo las variaciones encontradas a las dispersiones que normalmente induce la metodología empleada.

#### 4.2.2. *Efectos de la colecistocinina sobre la secreción basal de amilasa.*

Con el fin de comprobar si alguno de los factores de crecimiento objeto de nuestro estudio podía modificar la secreción de amilasa estimulada por secretagogos que movilizan calcio, realizamos un serie de grupos experimentales en los que se determinó la liberación de amilasa en acinos pancreáticos de rata en presencia de CCK-8 y de cada uno de los factores de crecimiento. En primer lugar tratamos de caracterizar el efecto de la CCK sobre la secreción de amilasa en nuestras condiciones experimentales, para así determinar claramente las posibles modificaciones inducidas por los agentes en estudio.

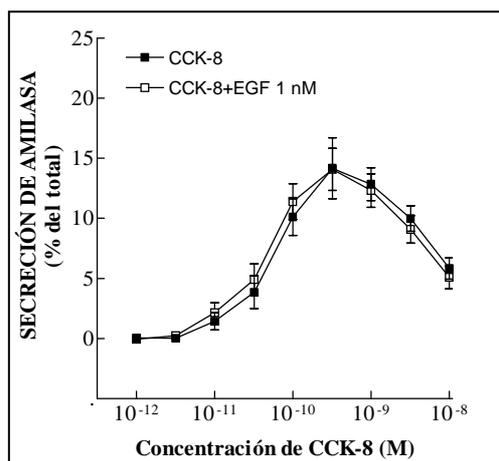


**Figura 6:** Liberación neta de amilasa en respuesta a concentraciones crecientes de CCK-8. Los resultados representados son la media  $\pm$  EEM sobre el valor basal ( $4.6 \pm 0.5\%$ ) de 11 experimentos.

Cuando estimulamos acinos pancreáticos de rata con el octapéptido de colecistocinina (CCK-8) durante 30 minutos a concentraciones comprendidas entre 1 pM y 10 nM, las respuestas secretoras obtenidas fueron dependientes de la concentración ensayada, como puede observarse en la Figura 6. El perfil de la curva mostró un efecto bifásico: a bajas concentraciones de CCK-8 la secreción de amilasa aumentó progresivamente hasta alcanzar un efecto máximo con la dosis de 320 pM, mientras que a concentraciones superiores a la máxima la secreción de amilasa comenzó a disminuir. La EC50 calculada para la CCK-8 fue de  $23.9 \pm 1.6$  pM con un efecto máximo de  $24.66 \pm 1.0\%$ , que se alcanzó con la dosis de 320 pM.

### 4.2.3. Interacciones de la CCK-8 con factores de crecimiento.

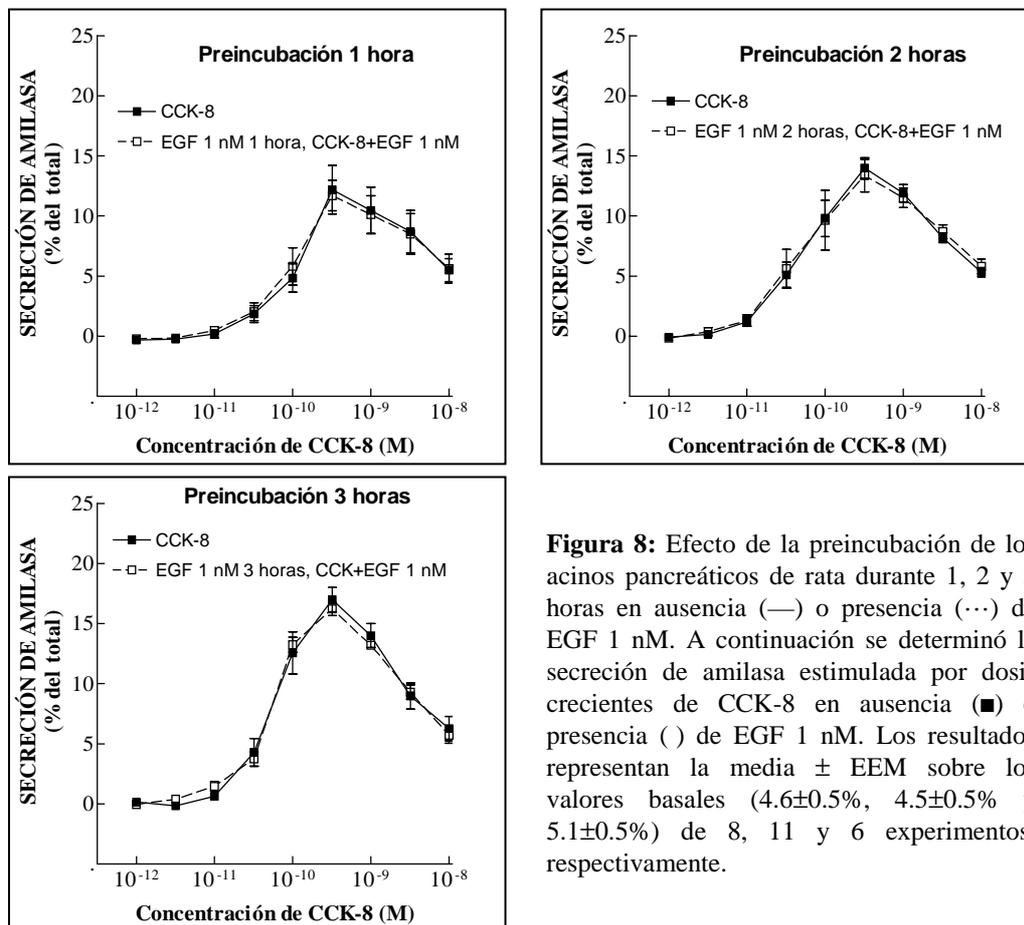
Estudios previos han demostrado que el EGF puede modificar alguna de las acciones biológicas de la CCK sobre las células acinares pancreáticas: inhibe la producción de IP3, el incremento de calcio intracelular y activación de la conductancia del Cl<sup>-</sup> en gránulos de zimógeno (Stryjek-Kaminska y cols., 1994; Pröfrock y cols., 1991; Piiper y cols., 1991). Sin embargo, la acción del EGF sobre la secreción de amilasa inducida por CCK-8 tiene un doble efecto: inhibición a bajas concentraciones de EGF y estimulación a altas concentraciones de este mismo factor de crecimiento (Stryjek-Kaminska y cols., 1993). Adicionalmente se ha demostrado que el EGF reduce tanto la amilasa liberada por concentraciones submáximas de bFGF (Stryjek-Kaminska y cols., 1995a) como la producción de AMPc inducida por secretagogos (Stryjek-Kaminska y cols., 1995c). Sin embargo, el efecto del bFGF sobre la secreción de amilasa y la movilización de calcio intracelular estimulada por CCK-8 no está clara. Por tanto, con el fin de clarificar estas observaciones contradictorias, hemos investigado el efecto del EGF y del bFGF sobre la secreción de amilasa estimulada por CCK-8.



**Figura 7:** Efecto del EGF sobre la secreción de amilasa estimulada por CCK-8. Los acinos se incubaron con CCK-8 en ausencia (■) o presencia (□) de EGF 1 nM. Los resultados representados son la media  $\pm$  EEM sobre el valor basal ( $3.7 \pm 0.4\%$ ) de 7 experimentos.

En la figura 7 se representa la curva dosis-respuesta de la liberación de amilasa estimulada por CCK-8 en presencia de 1 nM de EGF. Bajo estas condiciones experimentales, el valor de la secreción basal fue de  $3.68 \pm 0.44$  % de la liberación de amilasa respecto al total. Como puede observarse, el EGF, en nuestras condiciones experimentales, no tuvo ningún efecto significativo sobre la amilasa liberada por la CCK-8, manteniéndose el perfil bifásico de la curva, el efecto máximo a la concentración de 320 pM de CCK-8 y la EC50.

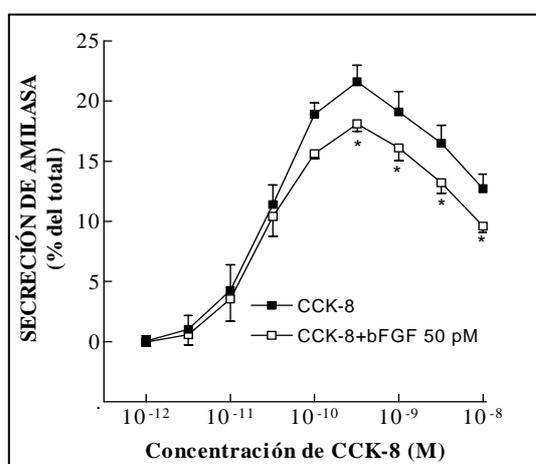
Como previamente se había demostrado que la incubación de cultivos de acinos pancreáticos de ratón con EGF a corto y medio plazo podía modificar diferentes funciones pancreáticas (aumento de la síntesis de ADN, aumento de la secreción basal de amilasa y de la estimulada por CCK-8 e incremento de la secreción de proteína total) (Logsdon y Williams, 1983b; Logsdon, 1986) decidimos comprobar si la preincubación de los acinos pancreáticos de rata a diferentes tiempos con EGF podía modificar la respuesta secretora a la CCK.



**Figura 8:** Efecto de la preincubación de los acinos pancreáticos de rata durante 1, 2 y 3 horas en ausencia (—) o presencia (---) de EGF 1 nM. A continuación se determinó la secreción de amilasa estimulada por dosis crecientes de CCK-8 en ausencia (■) o presencia (□) de EGF 1 nM. Los resultados representan la media  $\pm$  EEM sobre los valores basales ( $4.6 \pm 0.5\%$ ,  $4.5 \pm 0.5\%$  y  $5.1 \pm 0.5\%$ ) de 8, 11 y 6 experimentos, respectivamente.

Para ello, las células acinares pancreáticas se preincubaron durante 1, 2 y 3 horas con EGF 1 nM y después se realizó la determinación de la secreción de amilasa incubando los acinos con concentraciones crecientes de CCK-8 en presencia de EGF 1 nM. La Figura 8 muestra los resultados obtenidos. Como se puede observar, ninguna de las preincubaciones con EGF modificó el patrón de secreción estimulado por CCK-8, manteniéndose el perfil bifásico de la curva, el efecto máximo y la EC50.

La Figura 9 muestra el efecto del bFGF sobre la respuesta secretora inducida por CCK-8. En este caso, las células acinares se incubaron con concentraciones crecientes de CCK-8 en presencia de 50 pM de bFGF. Como se observa en la figura, el bFGF reduce el efecto secretor de la CCK-8, principalmente a altas concentraciones del secretagogo, sin modificar la sensibilidad de los acinos a la CCK-8, ya que no se observó un desplazamiento de la curva dosis-respuesta desencadenada por CCK-8.



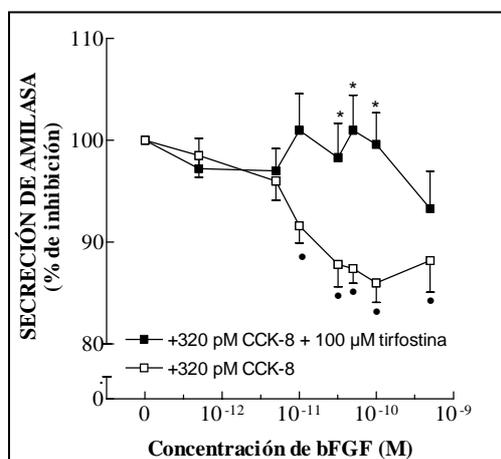
**Figura 9:** Efecto del bFGF sobre la secreción de amilasa estimulada por CCK-8. Los acinos se incubaron con CCK-8 en ausencia (■) o presencia (□) de bFGF 50 pM. Los resultados representados son la media  $\pm$  EEM sobre el valor basal ( $5.9 \pm 0.3\%$ ) de 11 experimentos.

\* indica diferencias significativas respecto a la curva de CCK-8 sola.

A continuación estudiamos el efecto de concentraciones crecientes de bFGF sobre la concentración de CCK-8 que provoca la máxima respuesta secretora, 320 pM de CCK-8. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 10 y están expresados como porcentaje de la máxima secreción de amilasa estimulada por 320 pM de CCK-8. El bFGF es capaz de atenuar la secreción de amilasa inducida por 320 pM de CCK-8 de manera dosis-dependiente. La dosis inhibitoria 50 (IC50) calculada para el bFGF fue de 7.5 pM.

Para tratar de averiguar si este efecto inhibitor del bFGF sobre la secreción de amilasa inducida por CCK-8 estaba asociada a la estimulación de la vía de las tirosinas cinasas, utilizamos el inhibidor de la actividad tirosina cinasa tirfostina A25. Los resultados aparecen en la Figura 10 y en la Tabla IV y muestran que la preincubación de las células acinares pancreáticas durante 30 minutos con 100  $\mu$ M de tirfostina fue

capaz de abolir completamente el efecto inhibitor que el bFGF ejerce sobre la secreción de amilasa estimulada por CCK-8, en todo el rango de concentraciones de bFGF ensayadas. Adicionalmente comprobamos que la tirfostina no tuvo efecto sobre la liberación basal de amilasa aunque inhibió ligeramente la respuesta secretora de la CCK-8 (Tabla IV).



**Figura 10:** Curva dosis-respuesta de la inhibición del bFGF sobre la secreción de amilasa estimulada por CCK-8. Los acinos pancreáticos se incubaron con dosis crecientes de bFGF (0.5-500 pM) más 320 pM de CCK-8 en ausencia (□) o presencia (■) de 100 μM de tirfostina A25. Los resultados son la media ± EEM de 13 experimentos y se expresan como porcentaje de la máxima respuesta secretora en presencia de CCK-8 sola. \* indica diferencias significativas respecto a CCK-8+bFGF. • indica diferencias significativas respecto a CCK-8 sola.

**Tabla IV: Efecto de diferentes agonistas sobre la liberación de amilasa.**

Tratamiento	Liberación de amilasa (% del máximo)	n
Control	20.66 ± 1.10	11
CCK-8 320 pM	100	11
bFGF 50 pM	19.89 ± 1.42	13
EGF 3.2 nM	20.45 ± 1.10	7
EGF 1 nM	21.10 ± 1.20	7
EGF 320 nM	22.77 ± 1.77	7
Tirfostina A25 100 μM	22.29 ± 1.72	20
CCK-8 320 pM + EGF 1 nM	97.80 ± 2.46	10
CCK-8 320 pM + bFGF 50 pM	87.41 ± 1.43 *	13
CCK-8 320 pM+bFGF 50 pM+Tirfostina A25 100 μM	101.02 ± 4.45 †	13
CCK-8 320 pM + Tirfostina A25 100 μM	96.87 ± 5.2	13

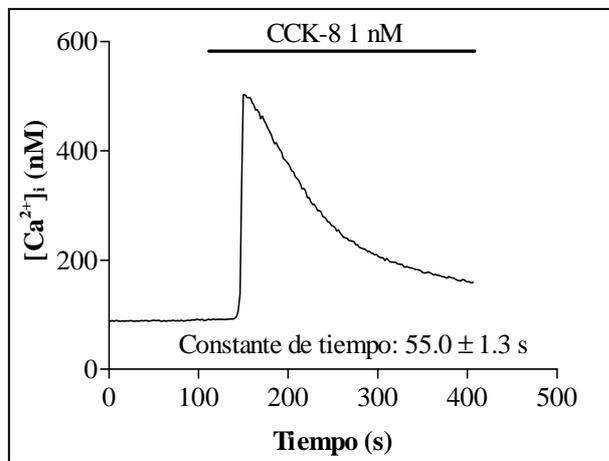
Los resultados son la media ± EEM de n experimentos y se expresan como porcentaje de la máxima respuesta secretora en presencia de 320 pM de CCK-8.

\* indica diferencia estadísticamente significativa con respecto a CCK-8 sola.

† indica diferencia estadísticamente significativa respecto a CCK-8 + bFGF.

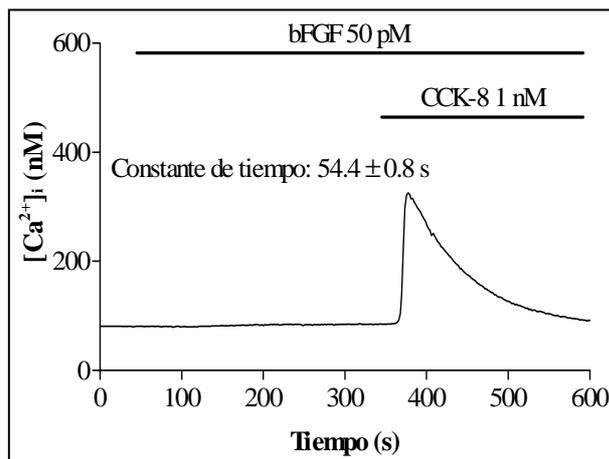
#### 4.2.4. Efecto del EGF y del bFGF sobre la concentración intracelular de calcio.

En concordancia con los resultados obtenidos en las determinaciones de la secreción de amilasa, el EGF no tuvo ningún efecto ni sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  basal ni en su movilización en respuesta a la CCK-8. Para estudiar si el efecto inhibitorio del bFGF sobre la liberación de amilasa estimulada por CCK-8 se correlacionaba con una inhibición de la movilización de calcio, analizamos el efecto del bFGF sobre el incremento de la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) inducido por CCK-8 en acinos pancreáticos.



**Figura 11:** Efecto de la CCK-8 sobre la  $[Ca^{2+}]_i$ . Los acinos pancreáticos se perfundieron con CCK-8 1 nM. La curva es representativa de los trazados obtenidos en 7 experimentos.

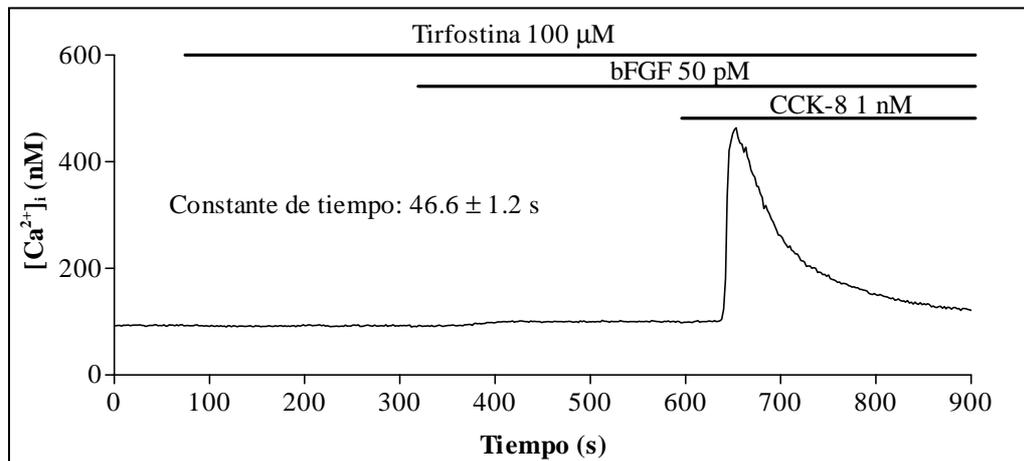
Como se observa en la Figura 11, la CCK-8 a una concentración de 1 nM, en medio normal de calcio ( $1 \text{ mM } [Ca^{2+}]_o$ ), provoca un incremento transitorio en la  $[Ca^{2+}]_i$  seguido por una lenta y gradual recuperación hasta los niveles basales.



**Figura 12:** Efecto del bFGF sobre el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  estimulado por CCK-8. Los acinos pancreáticos se perfundieron con bFGF 50 pM y posteriormente con CCK-8 1 nM. La curva es representativa de los trazados obtenidos en 8 experimentos.

Cuando las células acinares se pretrataron con 50 pM de bFGF (Figura 12), el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  estimulado por CCK-8 fue menor comparado con la respuesta producida por CCK-8 sola ( $384 \pm 12$  nM versus  $502 \pm 18$  nM, Tabla V). Esta reducción fue del 24% y se observó en 80 de las 112 células estudiadas.

Para comprobar si este efecto inhibitor del bFGF sobre el incremento de calcio intracelular estimulado por CCK-8 está relacionado con la vía de las tirosinas cinasas utilizamos nuevamente tirfostina A25. Las células acinares se perfundieron con tirfostina A25 a la dosis de 100  $\mu$ M, bFGF 50 pM y CCK-8 1 nM sucesivamente. La Figura 13 muestra los resultados obtenidos. El efecto inhibitor que el bFGF ejerce sobre el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  provocado por CCK-8 se abolió en 43 de las 52 células estudiadas en presencia de tirfostina. En la Tabla V también se aprecia que ni el bFGF ni la tirfostina modifican por sí mismos la  $[Ca^{2+}]_i$ .



**Figura 13:** Efecto de la tirfostina A25 sobre la reducción que el bFGF ejerce sobre la movilización de la  $[Ca^{2+}]_i$  estimulada por CCK-8. Los acinos pancreáticos se perfundieron primeramente con 100  $\mu$ M de tirfostina A25 y seguidamente con bFGF 50 pM y CCK-8 1 nM. La curva es representativa de los trazados obtenidos en 7 experimentos.

**Tabla V: Respuestas de calcio en células pancreáticas estimuladas por varios agonistas.**

Tratamiento	Pico $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	$[Ca^{2+}]_i$ Neta (nM) (sobre el valor basal)	n
Control	97 ± 4		232
CCK-8 1 nM	502 ± 18	404 ± 16	78
bFGF 50 pM	101 ± 4	3 ± 0.5	102
Tirfostina A25 100 μM	104 ± 4	7 ± 0.7	52
CCK-8 1 nM+ bFGF 50 pM	384 ± 12 *	287 ± 9 *	102
CCK-8 + bFGF + tirfostina A25	483 ± 20 †	386 ± 20 †	52

Los resultados son la media ± EEM de n células acinares.

\* indica diferencia estadísticamente significativa con respecto a CCK-8 sola.

† indica diferencia estadísticamente significativa respecto a CCK-8 + bFGF.

La Figura 13 también muestra que la aplicación de tirfostina antes de la estimulación con CCK-8 provoca una rápida recuperación de la  $[Ca^{2+}]_i$  hasta los niveles previos a la estimulación, sin modificar la liberación inicial de calcio estimulada por CCK-8. La velocidad de recuperación de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por tirfostina fue mucho más rápida que la velocidad obtenida con la dosis máxima de CCK-8 (Figura 13). La velocidad de recuperación se calculó por un ajuste exponencial simple de la caída en la  $[Ca^{2+}]_i$  200 segundos después de haberse producido el pico máximo de calcio, calculándose la constante de tiempo para cada célula. En presencia de tirfostina la constante de tiempo medida tras la estimulación con CCK-8 fue significativamente menor que la obtenida durante la estimulación con CCK-8 sola ( $46.6 \pm 1.2$  segundos y  $55.0 \pm 1.3$  segundos, respectivamente;  $p < 0.001$ ). Sin embargo, la aplicación de bFGF antes de la estimulación con CCK-8 no tiene ningún efecto sobre la caída en la  $[Ca^{2+}]_i$ , comparada con la obtenida durante la estimulación con CCK-8 sola ( $54.36 \pm 0.79$  segundos y  $55.0 \pm 1.3$  segundos, respectivamente).



#### ***4.2.5. Discusión sobre la estimulación directa de la vía de las tirosinas cinasas.***

En este trabajo hemos investigado el efecto de diferentes factores de crecimiento sobre la secreción pancreática exocrina y la movilización de calcio intracelular inducida por colecistocinina (CCK). Sin embargo no hemos podido detectar ningún efecto en la liberación de amilasa que sigue a la estimulación de los acinos pancreáticos con EGF, bFGF o aFGF por sí solos (Tabla III), aunque se había demostrado previamente que estos factores pueden inducir acumulación de IP<sub>3</sub>, liberación de calcio intracelular y secreción de amilasa (Chandrasekar y Korc, 1991). Estudios previos han demostrado que el EGF inhibe determinadas respuestas celulares inducidas por CCK tales como la producción de IP<sub>3</sub> (Stryjek-Kaminska y cols., 1994; 1993; 1995a; Pröfrock y cols., 1991b), la liberación de calcio desde almacenes intracelulares (Stryjek-Kaminska y cols., 1993), la activación de la conductancia del cloro en gránulos de zimógeno (Piiper y cols., 1991) y la secreción de amilasa (Stryjek-Kaminska y cols., 1994; 1993; 1995a; Pröfrock y cols., 1991b). En este estudio hemos demostrado por primera vez que el bFGF puede ejercer un efecto inhibitorio en la secreción de amilasa y en la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a un secretagogo que moviliza calcio, como es la CCK (Figuras 9 y 12). Pero a diferencia de lo encontrado para el bFGF, el EGF no fue capaz de modificar el patrón secretor en respuesta a CCK-8, ni siquiera en las preparaciones sometidas a preincubación con dicho factor de crecimiento, demostrando nuestros resultados, por tanto, la falta de efectos secretores de esta sustancia. El motivo de la divergencia entre nuestros resultados y los de la literatura no está claro. Es posible que las discrepancias puedan estar relacionadas con la raza y la edad de las ratas o por diferencias en los procesos de aislamiento de las células o en las condiciones experimentales. Nosotros hemos utilizado ratas Wistar, mientras que Chandrasekar y Korc utilizaron ratas Sprague-Dawley.

Puesto que el EGF y el bFGF se unen a similares receptores de membrana con actividad tirosina cinasa, era de esperar que tuvieran acciones parecidas. No obstante, nuestros resultados no apoyan esta observación, porque de acuerdo con estudios previos de otros autores (Chandrasekar y Korc, 1991; Stryjek-Kaminska y cols., 1994; 1995a), el EGF no tiene efectos significativos ni en la secreción basal de amilasa ni en la estimulada por CCK en nuestras condiciones experimentales (Tabla III y Figura 7). Estos resultados inesperados podrían ser explicados por el hecho de que el receptor del bFGF posee un dominio tirosina cinasa separado en dos regiones contiguas y un dominio extracelular que tiene regiones similares a insulina, mientras que el receptor

del EGF es monomérico (Yarden y Ullrich, 1988). Por tanto, es posible que la activación del receptor del bFGF pueda inducir diferentes efectos que aquellos activados por el receptor del EGF, ya que las interacciones con proteínas G de membrana podrían ser diferentes.

Nuestros resultados con EGF están en desacuerdo con los obtenidos por Styjek-Kaminska y cols quienes encuentran resultados contradictorios cuando estudian el efecto del EGF en acinos pancreáticos estimulados por CCK-8. Bajas concentraciones de EGF provocan una reducción en la liberación de amilasa estimulada por CCK-8, mientras que la amilasa secretada se incrementa en respuesta a altas concentraciones de EGF cuando se compara con CCK-8 sola (Stryjek-Kaminska y cols., 1993). Nuestra falta de efecto no puede ser debida a las dosis utilizadas, ya que hemos ensayado un amplio abanico de dosis que engloban a las estudiadas por otros autores. Por tanto, diferencias en el estado funcional de los acinos pancreáticos o en el método de preparación de las células acinares aisladas podrían ser las responsables de estos resultados contradictorios.

Para determinar si las tirosinas cinasas están implicadas en los efectos inhibidores del bFGF tanto sobre la secreción de amilasa como sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  estimuladas por CCK-8, hemos utilizado el inhibidor de las tirosinas cinasas tirfostina A25. Estudios previos confirman que la tirfostina es un potente, efectivo y específico inhibidor de las tirosinas cinasas (Piiper y cols., 1994). Nuestros resultados demuestran que la tirfostina utilizada revierte los efectos inhibidores del bFGF en las respuestas secretoras pancreáticas inducidas por CCK (Tabla IV y Figura 10). El receptor del bFGF en la superficie celular, posee un dominio citoplasmático cuya actividad tirosina cinasa intrínseca está regulada por la unión del ligando (Dionne y cols., 1991). Así, aunque el bFGF no provoca estimulación de la liberación de amilasa y de la  $[Ca^{2+}]_i$  en acinos pancreáticos, no es sorprendente que la tirfostina revierta el efecto atenuador que el bFGF ejerce sobre la secreción de amilasa y la movilización de calcio estimuladas por CCK-8.

Recientemente, se ha sugerido un posible papel de la fosforilación en residuos de tirosina en los mecanismos secretores estimulados por CCK-8 (Jena y cols., 1991; Lutz y cols., 1993; Duan y cols., 1994). Además se ha demostrado que los inhibidores de las tirosinas cinasas son capaces de atenuar la secreción enzimática en respuesta a agonistas en células acinares pancreáticas (Lutz y cols., 1993; Duan y cols., 1994; Lee y cols., 1993). La homeostasis del calcio podría ser un sitio de acción potencial de las tirosinas cinasas y la interconexión de ambas vías de acoplamiento. De hecho, la utilización de inhibidores de tirosinas cinasas atenúa la entrada de calcio en fibroblastos y plaquetas pero sin afectar a la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares (Lee y cols., 1993; Sargeant y cols., 1993). Nuestros resultados

demuestran que los efectos del bFGF en la respuesta secretora de la CCK-8 se deben a una reducción en la  $[Ca^{2+}]_i$  promovida por este secretagogo en presencia del factor de crecimiento, siendo debida ésta a la actividad tirosina cinasa estimulada por la administración del bFGF, ya que la administración previa de tirfostina revierte dichos efectos inhibidores. Por otro lado, la aplicación de tirfostina antes de la estimulación con CCK-8, además de revertir los efectos del bFGF, provoca una recuperación de la  $[Ca^{2+}]_i$  hasta niveles basales mucho más rápida que la detectada durante la estimulación con CCK sola, mientras que no tiene efecto sobre la liberación inicial de calcio (Figuras 11 y 13). Esta rápida recuperación podría deberse a un efecto inhibitor de la tirfostina sobre la entrada de calcio ("capacitative calcium entry") a la célula. Esta posibilidad está apoyada por los resultados de Yule y cols, quienes encuentran que otros inhibidores de las tirosinas cinasas, tales como la genisteína, inhiben la entrada de calcio inducida por el vaciamiento de los depósitos intracelulares tanto por tpsigargina como por carbacol de una forma dosis-dependiente y sin afectar a la liberación inicial de calcio (Yule y cols., 1994). Estos datos indican que la inhibición de la entrada de calcio podría en parte ser la razón de nuestros resultados y de los de otros autores (Lutz y cols., 1993; Duan y cols., 1994; Lee y cols., 1993), que muestran una inhibición de la secreción de amilasa estimulada por CCK en presencia de inhibidores de las tirosinas cinasas.

De forma resumida, estos resultados ponen de manifiesto los efectos inhibidores del bFGF sobre la secreción de amilasa y la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a la CCK, un secretagogo que moviliza calcio, mediante un mecanismo dependiente de la vía de las tirosinas cinasas. Nuestros datos, además, confirman el papel fisiológico de la fosforilación de tirosinas en la homeostasis del calcio durante las respuestas secretoras estimuladas por secretagogos en el páncreas exocrino.



### 4.3. Resultados de la estimulación indirecta de la vía de las tirosinas cinasas por inhibidores de tirosinas fosfatasas.

---

Una forma indirecta de estimulación de la vía de las tirosinas cinasas es el uso de inhibidores de las tirosinas fosfatasas. Puesto que las tirosinas fosfatasas defosforilan los residuos de tirosina que han sido fosforilados por acción de las tirosinas cinasas, su inhibición provoca un aumento en el número de residuos de tirosina fosforilados.

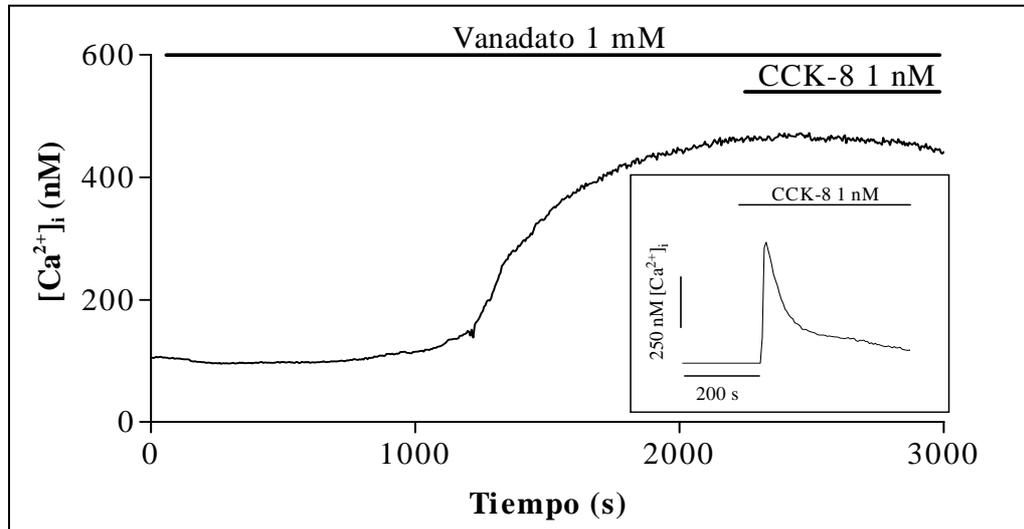
Los inhibidores utilizados han sido: ortovanadato sódico ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), óxido de fenilarsina ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{AsO}$ ) y defostatín ( $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ ). Todos ellos han sido utilizados tanto en medidas de la concentración intracelular de calcio, como en secreción de amilasa.

#### 4.3.1. Efectos del vanadato sobre la concentración intracelular de calcio.

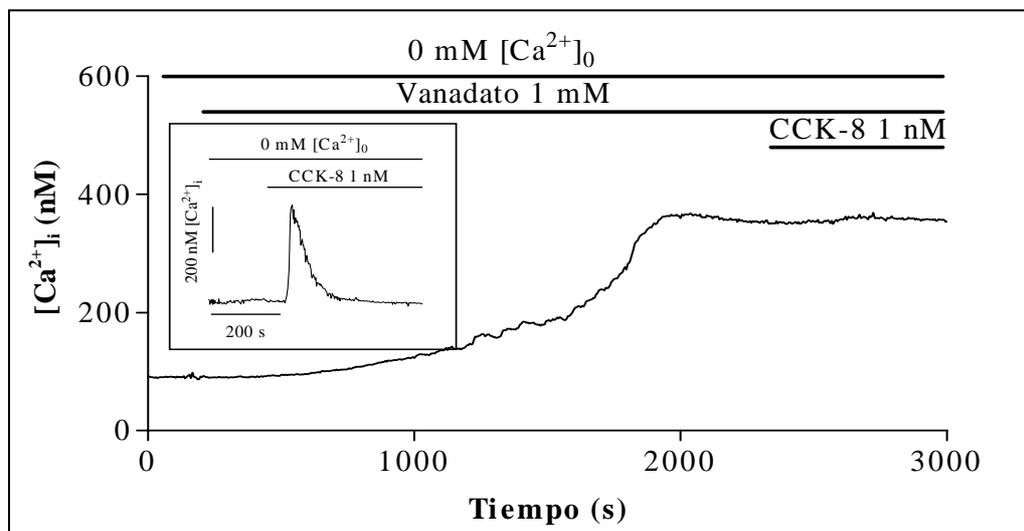
El ortovanadato sódico (a partir de ahora, vanadato) ha sido descrito como un potente inhibidor de proteínas con actividad tirosina fosfatasa en músculo liso (Swarup, 1982; Di Salvo y cols., 1993), si bien, en los mecanismos de acción de esta sustancia puede también participar la inhibición de la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$  y/o  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$  (Nayler y Sparrow, 1983; Bond y Hudgins, 1980).

Para comprobar si dicha sustancia tenía efecto sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  perfundimos los acinos pancreáticos de rata con vanadato a la concentración 1 mM, en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (1 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ). Los resultados se muestran en la Figura 14. La perfusión de las células acinares con vanadato provoca un lento y gradual aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , alcanzándose el valor máximo después de unos 25 minutos de perfusión. El valor basal de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  fue de alrededor de 100 nM, y el máximo después del tratamiento con vanadato llegó a superar los 400 nM. La posterior perfusión, en presencia de vanadato, de las células acinares con CCK-8 1 nM no produjo el típico

incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  evocado por este agonista. Este efecto se observó en 31 de las 40 células estudiadas de 4 experimentos. En el recuadro de la Figura 14 se muestra el típico perfil en la movilización intracelular de calcio que provoca la CCK-8 a la concentración de 1 nM.



**Figura 14:** Movilización de calcio en respuesta a CCK-8 en células acinares pretratadas con vanadato. Los acinos se perfundieron con vanadato 1 mM seguido por CCK-8 en medio normal de calcio (1 mM  $[Ca^{2+}]_o$ ). En el recuadro interior se muestra la respuesta típica a la CCK-8. Las curvas son representativas de los trazados obtenidos en 4 experimentos independientes.

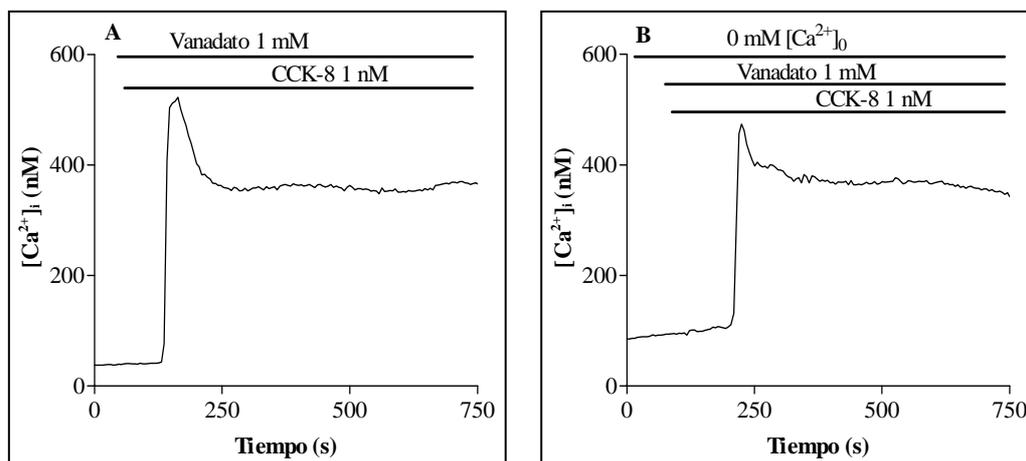


**Figura 15:** Movilización de calcio en respuesta a CCK-8 en células acinares pretratadas con vanadato. Los acinos se perfundieron con vanadato 1 mM seguido por CCK-8 en medio libre de calcio (0 mM  $[Ca^{2+}]_o$  + 0.5 mM EGTA). En el recuadro interior se muestra la respuesta típica a la CCK-8. Las curvas son representativas de los trazados obtenidos en 4 experimentos

independientes.

Resultados muy similares se obtuvieron cuando los acinos pancreáticos se perfundieron con la misma concentración de vanadato en ausencia de calcio extracelular (NaHEPES sin calcio que contenía 0.5 mM de EGTA) (Figura 15), es decir, el vanadato fue capaz de incrementar la  $[Ca^{2+}]_i$  e inhibir la movilización del calcio inducida por CCK-8. En el recuadro de la figura se muestra la respuesta típica que produce la CCK-8 1 nM en ausencia de calcio extracelular.

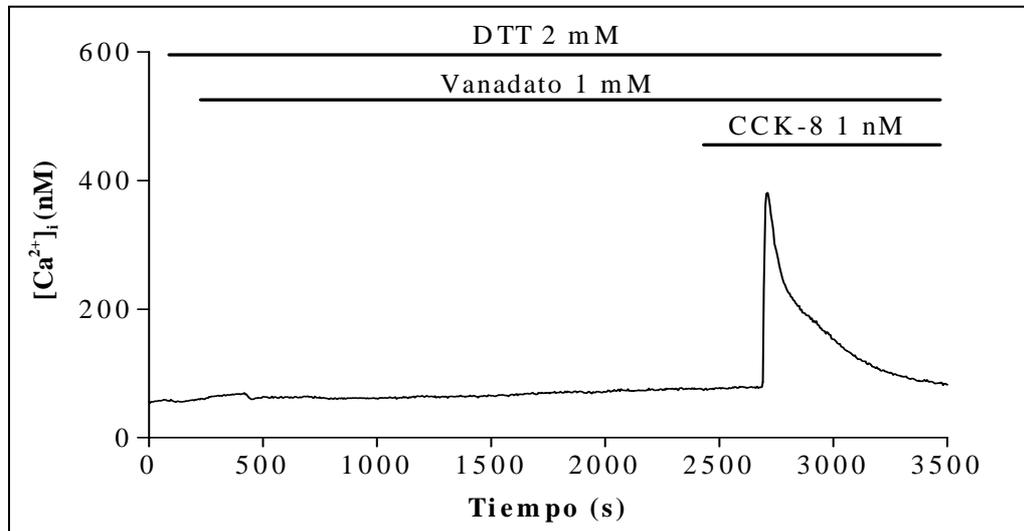
Cuando en otro grupo experimental los acinos pancreáticos se perfundieron al mismo tiempo con vanadato 1 mM y CCK-8 1 nM, el pico transitorio que produce la CCK-8 no se modificó significativamente, si bien, no se produjo la recuperación hasta niveles basales, es decir, la  $[Ca^{2+}]_i$  permaneció elevada en una fase de meseta, al menos durante los 10 minutos controlados por nosotros (Figura 16A). Resultados similares se observaron en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular (Figura 16B).



**Figura 16:** Efecto del vanadato sobre la fase de meseta de la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a CCK-8. Las células acinares pancreáticas se perfundieron conjuntamente con vanadato 1 mM y CCK-8 1 nM en presencia (A) o ausencia (B) de calcio extracelular. Las curvas son representativas de los trazados obtenidos en 4 experimentos independientes.

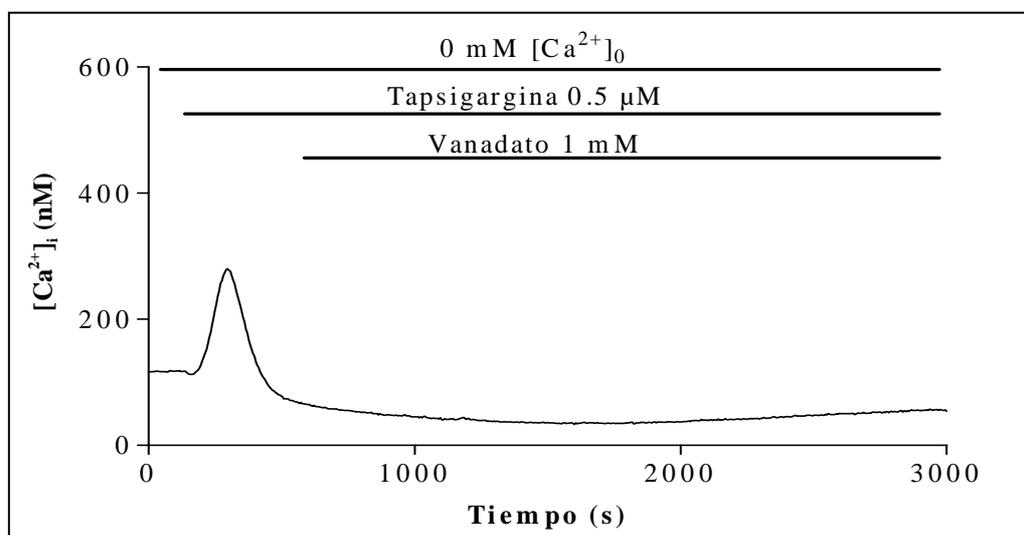
Como en estudios previos se había demostrado que el vanadato, además de ser un inhibidor de tirosinas fosfatasas, se comporta como un agente oxidante (Rubinson, 1981), decidimos comprobar si los efectos que ejercía sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  se debían a esta propiedad. Para ello estudiamos si el agente reductor de grupos sulfidrilos ditioneitol (DTT) podría prevenir el efecto del vanadato sobre la movilización del calcio intracelular. Como puede observarse en la Figura 17, el DTT no sólo revierte el

incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por vanadato, sino que además es capaz de prevenir el efecto inhibitor que el vanadato ejerce sobre la liberación de  $Ca^{2+}$  estimulada por CCK-8.



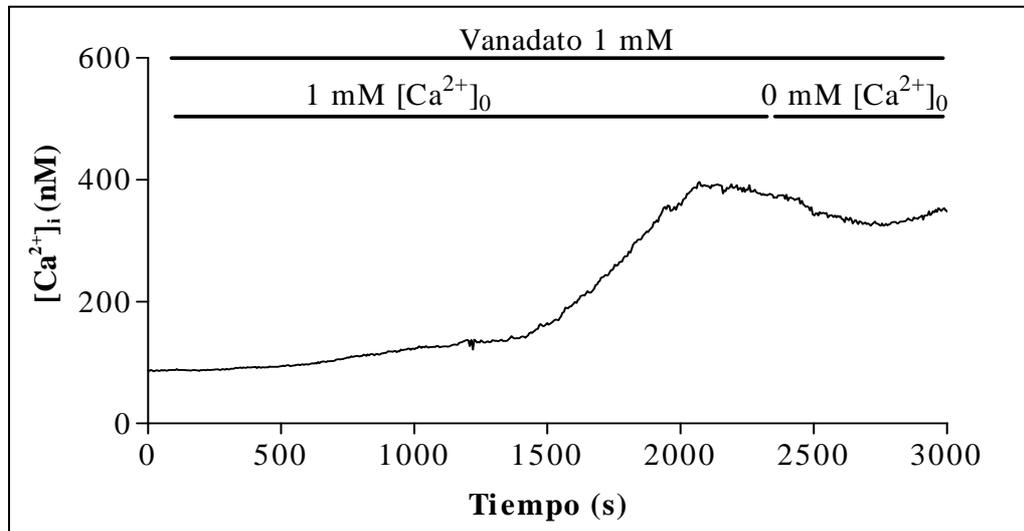
**Figura 17:** Efecto del ditiotreitól (DTT) sobre la movilización de calcio en respuesta al vanadato y la CCK-8. Las células acinares pancreáticas se perfundieron con DTT 2mM, vanadato 1 mM y CCK-8 1 nM en medio normal de calcio (1 mM  $[Ca^{2+}]_o$ ). La curva es representativa de los trazados obtenidos en 6 experimentos independientes.

Debido a que habíamos demostrado que el vanadato era capaz de liberar calcio desde depósitos intracelulares (ya que se producía movilización incluso en medio libre de calcio), quisimos caracterizar el depósito de calcio sensible a vanadato. Para ello utilizamos tapsigargina, un inhibidor de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de retículo endoplasmático. La tapsigargina bloquea la reentrada de calcio hacia los depósitos intracelulares una vez que estos han sido vaciados con agonistas. Como se observa en la Figura 18, la aplicación de 0.5  $\mu$ M de tapsigargina en un medio libre de calcio extracelular, induce un pronunciado y transitorio incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , seguido de una rápida recuperación en la  $[Ca^{2+}]_i$  hasta los valores basales como resultado de la liberación y vaciamiento del calcio desde los almacenes intracelulares. La administración de vanadato a células acinares cuyos almacenes de  $Ca^{2+}$  habían sido vaciados por tapsigargina fue incapaz de aumentar la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 18).

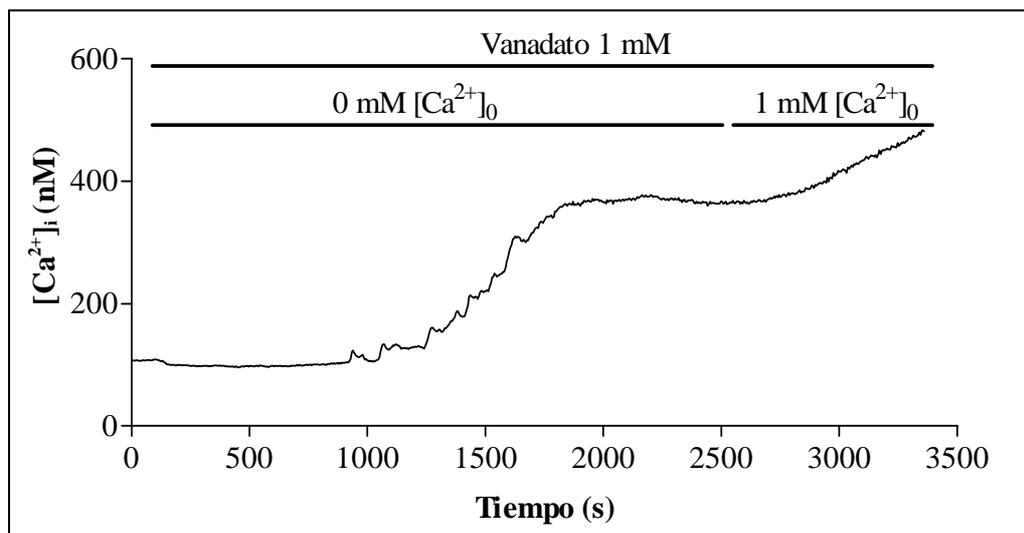


**Figura 18:** Efecto del vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio inducido por tapsigargina sobre el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  producido por vanadato. Las células acinares pancreáticas se perfundieron con  $0.5 \mu\text{M}$  de tapsigargina en medio libre de calcio ( $0 \text{ mM } [Ca^{2+}]_o + 0.5 \text{ mM EGTA}$ ) y a continuación con vanadato  $1 \text{ mM}$ . La curva es representativa de los trazados obtenidos en 5 experimentos independientes.

A continuación, intentamos determinar las necesidades de calcio extracelular en las respuestas de calcio inducidas por vanadato. Para ello realizamos los siguientes protocolos experimentales: se perfundieron las células con vanadato en medio normal de calcio y una vez alcanzada la meseta provocada por el vanadato se perfundieron con la solución libre de calcio. El segundo protocolo consistió en la perfusión de los acinos con vanadato en medio libre de calcio y a continuación adicionar calcio al medio extracelular una vez alcanzada la meseta. Los resultados obtenidos se representan en las Figuras 19 y 20. En presencia de un medio normal de calcio extracelular ( $1 \text{ mM } [Ca^{2+}]_o$ ), el vanadato provoca un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  y la subsecuente imposición de un medio libre de calcio produce una pequeña disminución en dicha  $[Ca^{2+}]_i$ . Sin embargo, cuando los acinos se perfundieron con vanadato en ausencia de calcio extracelular también se produce un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , que aumenta ligeramente tras la subsecuente aplicación de  $1 \text{ mM}$  de calcio en el medio extracelular.

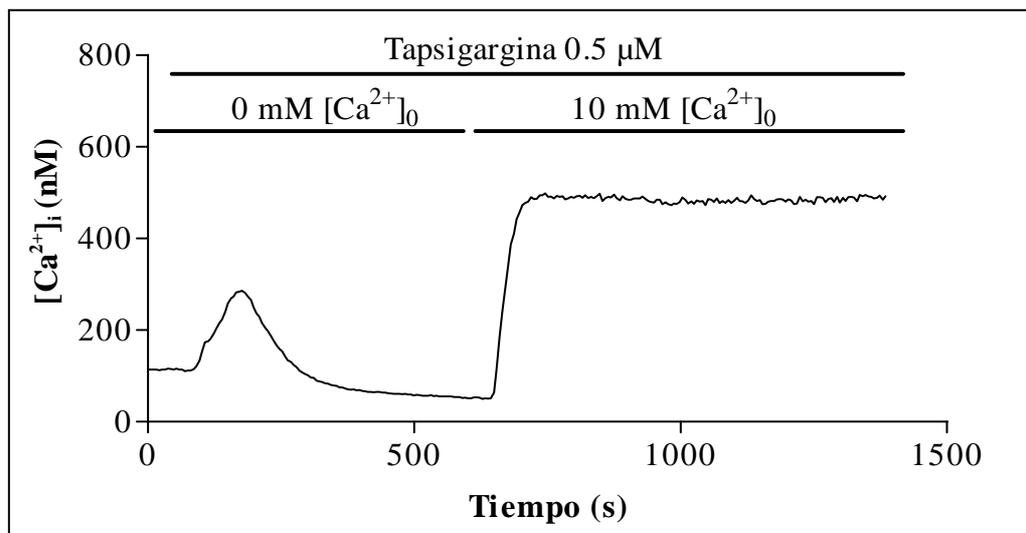


**Figura 19:** Efecto del calcio extracelular sobre la movilización de calcio estimulada por vanadato. Los acinos se perfundieron con vanadato 1 mM en medio normal de calcio (1 mM  $[Ca^{2+}]_o$ ) y a continuación con medio libre de calcio (0 mM  $[Ca^{2+}]_o$  + 0.5 mM EGTA). La curva es representativa de los trazados obtenidos en 3 experimentos independientes.



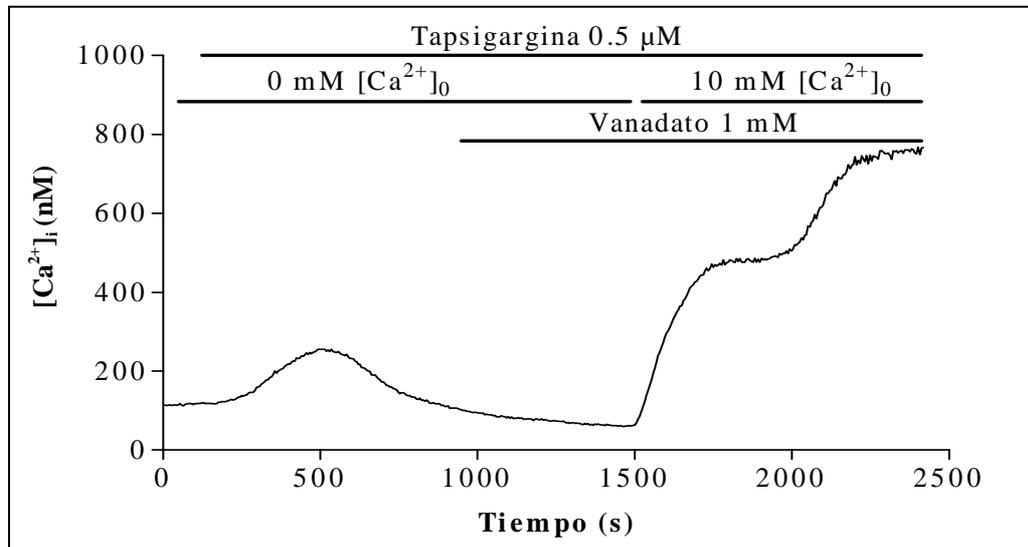
**Figura 20:** Efecto del calcio extracelular sobre la movilización de calcio estimulada por vanadato. Los acinos se perfundieron con vanadato 1 mM en medio libre de calcio (0 mM  $[Ca^{2+}]_o$  + 0.5 mM EGTA) y a continuación con medio normal de calcio (1 mM  $[Ca^{2+}]_o$ ). La curva es representativa de los trazados obtenidos en 5 experimentos independientes.

Debido a que se había descrito que el vanadato incrementa la captura de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  dentro de lóbulos pancreáticos (Proffitt y Case, 1984a), quisimos evaluar el efecto del vanadato en la entrada de calcio estimulada por el vaciamiento de los almacenes intracelulares inducido por tapsigargina. Para ello primeramente realizamos un protocolo control con el fin de evaluar la entrada de calcio tras el tratamiento con tapsigargina en medio libre de calcio y la posterior perfusión con 10 mM de calcio en el medio extracelular.

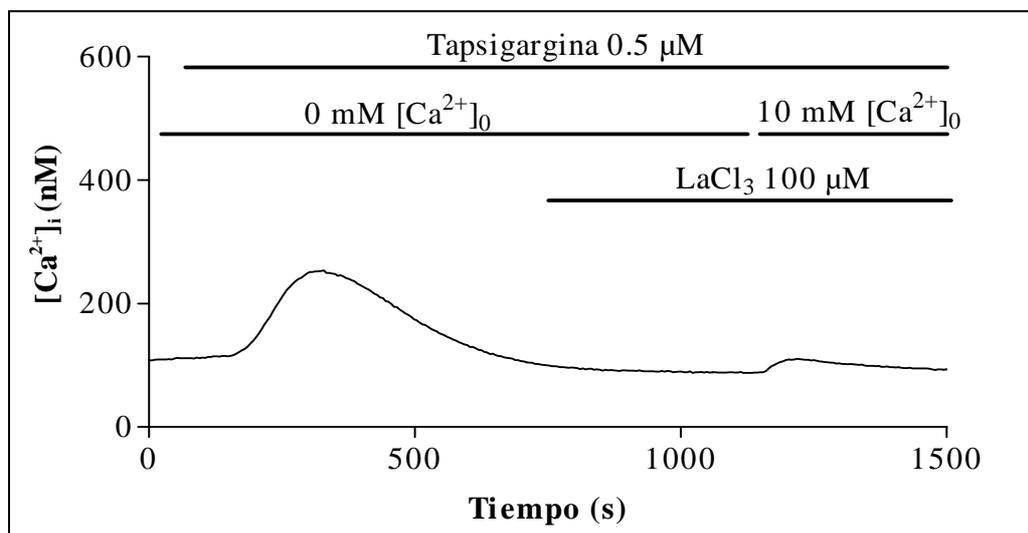


**Figura 21:** Efecto del vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio con tapsigargina sobre la entrada de calcio desde el medio extracelular. Los acinos se perfundieron con tapsigargina  $0.5 \mu\text{M}$  en medio libre de calcio ( $0 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_0 + 0.5 \text{ mM EGTA}$ ) y a continuación se añadió al medio de perfusión  $10 \text{ mM}$  de  $\text{CaCl}_2$ . La curva es representativa de los trazados obtenidos en 3 experimentos independientes.

La Figura 21 muestra que la respuesta a la tapsigargina se caracteriza, como ya dijimos antes, por un aumento transitorio en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  seguido por un rápido retorno hasta niveles basales. La perfusión con  $10 \text{ mM}$  de calcio extracelular provoca un nuevo y rápido incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que se mantuvo elevado mientras el calcio extracelular se mantuvo presente. Este aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tradicionalmente se utiliza como índice de la entrada de calcio desde el medio extracelular. Bajo estas condiciones experimentales, pudimos comprobar que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por el vaciamiento de los depósitos intracelulares tras la administración de tapsigargina, se incrementó cuando las células acinares se perfundieron previamente con  $1 \text{ mM}$  de vanadato (Figura 22).



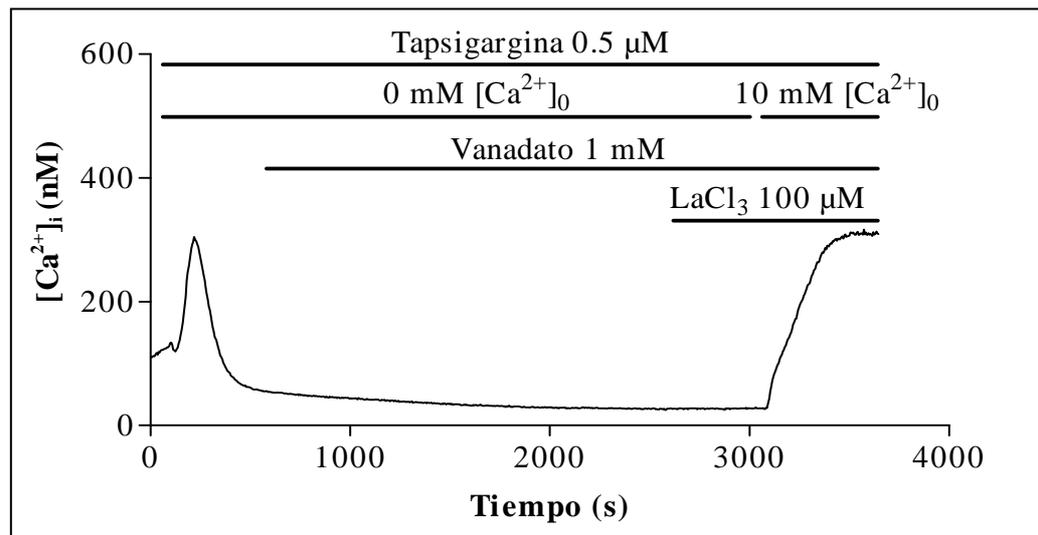
**Figura 22:** Efecto del vanadato sobre la entrada de calcio desde el medio extracelular inducida por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio con tapsigargina. Los acinos se perfundieron con tapsigargina  $0.5 \mu M$  en medio libre de calcio ( $0 mM [Ca^{2+}]_o + 0.5 mM$  EGTA) seguido por vanadato  $1 mM$  y  $10 mM$  de  $CaCl_2$ . La curva es representativa de los trazados obtenidos en 4 experimentos independientes.



**Figura 23:** Efecto del lantano sobre la entrada de calcio desde el medio extracelular inducida por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio con tapsigargina. Los acinos se

perfundieron con tapsigargina 0.5  $\mu\text{M}$  en medio libre de calcio (0 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  + 0.5 mM EGTA) seguido por 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{LaCl}_3$  y 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ . La curva es representativa de los trazados obtenidos en 3 experimentos independientes.

Para apoyar mejor la idea de que el vanadato modula la entrada de calcio desde el medio extracelular, quisimos investigar la inhibición de la entrada de calcio que produce el lantano en presencia y ausencia de vanadato. El lantano bloquea los canales de membrana plasmática que utiliza el calcio para entrar al interior celular (Kwan y cols., 1990). Como era previsible, la perfusión de los acinos con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{LaCl}_3$ , tras el vaciamiento de los depósitos con tapsigargina en medio libre de calcio, inhibe significativamente la entrada de calcio al interior celular (Figura 23). Sin embargo, cuando se administró vanadato antes de la perfusión con lantano se produjo entrada de calcio al interior celular (Figura 24), aunque esta entrada fue significativamente menor ( $p < 0.0001$ ) que la obtenida en ausencia de lantano ( $330 \pm 13$  nM y  $644 \pm 36$  nM, respectivamente).



**Figura 24:** Efecto del vanadato sobre la inhibición que el lantano ejerce sobre la entrada de calcio desde el medio extracelular inducida por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio con tapsigargina. Los acinos se perfundieron con tapsigargina 0.5  $\mu\text{M}$  en medio libre de calcio (0 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  + 0.5 mM EGTA) seguido por vanadato 1 mM, 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{LaCl}_3$  y 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ . La curva es representativa de los trazados obtenidos en 6 experimentos independientes.

### 4.3.2. Efectos del vanadato sobre la secreción de amilasa.

Como la principal función de las células acinares pancreáticas es la secreción de enzimas digestivas, también examinamos el efecto de concentraciones crecientes de vanadato (entre 0.1 mM y 10 mM) sobre la secreción de amilasa en condiciones basales y tras la estimulación con CCK-8. Los resultados se muestran en la Tabla VI.

**Tabla VI: Efecto del vanadato sobre la secreción de amilasa basal y estimulada por CCK-8.**

Tratamiento	Más Vanadato (mM)			
		0.1	1	10
Basal	4.6 ± 0.3	4.8 ± 0.3	5.8 ± 0.5 †	7.0 ± 0.5 †
CCK-8 320 pM	28.2 ± 1.1 †	26.4 ± 1.5	23.7 ± 1.4 *	18.5 ± 1.5 *
DTT 2 mM	4.3 ± 0.2	5.4 ± 0.5	5.1 ± 0.5	7.8 ± 1.2 †
CCK-8 320 pM + DTT 2 mM	27.5 ± 1.2 †	23.0 ± 1.3 *	23.8 ± 1.4 *	19.9 ± 2.0 *
GF109203X 5 µM	4.9 ± 0.4	4.1 ± 0.5	4.9 ± 0.6	6.2 ± 0.6
TPA 1 µM	16.1 ± 0.6 †			
GFX 5 µM + TPA 1 µM	10.3 ± 0.4 †‡			

La liberación de amilasa se expresa como porcentaje del contenido total de amilasa al comienzo de la incubación. Los resultados son la media ± EEM de 6 experimentos.

† indica diferencias estadísticamente significativas respecto al correspondiente valor basal.

\* indica diferencias estadísticamente significativas respecto al valor obtenido con CCK-8 sola.

‡ indica diferencias estadísticamente significativas respecto al valor obtenido con TPA solo.

De forma similar a los experimentos con calcio, el vanadato por sí solo provoca un aumento significativo en la secreción de amilasa, de una manera dosis-dependiente. Adicionalmente, el vanadato inhibe la estimulación de la secreción de amilasa inducida por 320 pM de CCK-8 (dosis de CCK-8 que produce el efecto máximo, Figura 6). Esta inhibición fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) a concentraciones elevadas de vanadato. Por el contrario, el tratamiento con DTT, que tuvo un efecto bloqueante tanto en el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  estimulado por vanadato

como en el efecto inhibitor del vanadato sobre la respuesta de calcio inducida por CCK-8, no abolió los efectos del vanadato ni en la secreción de amilasa basal ni en la estimulada por CCK-8.

Como previamente se había demostrado que en células acinares pancreáticas el vanadato estimula la secreción de amilasa por activación de la proteína cinasa C (PKC) (Hirohata y cols., 1998), evaluamos esta hipótesis estudiando el efecto del GF 109203 X (GFX), un potente y selectivo inhibidor de la PKC (Toullec y cols., 1991), sobre la secreción de amilasa estimulada por vanadato. En la Tabla VI se muestran los resultados obtenidos: la incubación de los acinos con GFX a la concentración de 5  $\mu$ M no provocó ningún cambio significativo en la secreción basal de amilasa, aunque ligeramente disminuyó la liberación de amilasa estimulada por vanadato de una forma no significativa. Sin embargo, y como era de esperar, el GFX fue capaz de inhibir significativamente la secreción de amilasa inducida por el éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA 1  $\mu$ M), un agente estimulador de la actividad de la PKC (Ansah y cols., 1986) (Tabla VI).



### **4.3.3. Discusión sobre los efectos del vanadato.**

Los resultados de nuestro estudio con vanadato muestran que este inhibidor de las tirosinas cinasas estimula un incremento tanto en la  $[Ca^{2+}]_i$  como en la secreción de amilasa en células acinares pancreáticas (Figura 14 y Tabla VI). Nuestros datos también indican que el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  es debido principalmente a la liberación de calcio desde depósitos intracelulares, ya que se observa incluso en un medio libre de calcio (Figura 15). Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos previamente por Proffitt y Case (Proffitt y Case, 1984a; 1984b), quienes encuentran que el vanadato estimula la secreción pancreática por un efecto sobre los depósitos de calcio intracelulares. Además se ha demostrado que el pervanadato, que se genera por peroxidación del vanadato en presencia de  $H_2O_2$ , incrementa la secreción de amilasa en células acinares pancreáticas de la línea AR42J (Feick y cols., 1998). Sin embargo, nuestros resultados son en parte similares a los obtenidos por Hirohata y cols en 1998, quienes muestran que el vanadato estimula la liberación de amilasa sin afectar a la movilización del calcio. Por otra parte, el vanadato bloqueó la liberación de calcio inducida por CCK-8 y este fenómeno se corresponde con su efecto inhibitor sobre la secreción de amilasa estimulada por este secretagogo (Figuras 14 y 15; Tabla VI). Adicionalmente, nosotros mostramos evidencias de que el vanadato actúa por un mecanismo que implica la oxidación de grupos sulfidrilos.

En las células acinares pancreáticas, el efecto estimulador del vanadato sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  y su efecto inhibitor sobre la movilización de calcio inducida por CCK-8 podrían ser debidos a un efecto directo sobre el proceso de liberación de calcio sensible a CCK y no a un efecto antagonico entre ambos agentes. Nuestros resultados, al demostrar que el vanadato libera calcio desde depósitos intracelulares sensibles a taptisgargina, sugieren que la falta de efecto de la CCK-8 para inducir movilización de calcio después de la aplicación durante un largo período de tiempo de vanadato está relacionada con el vaciamiento completo de los depósitos sensibles a agonistas por este agente. Nuestros datos también sugieren que el vanadato inhibe el relleno de los almacenes intracelulares con calcio, de ese modo elevaría la  $[Ca^{2+}]_i$  y aumentaría la liberación de amilasa. Puesto que el vanadato ha sido descrito como un agente eficaz en el bloqueo de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de retículo (Simon, 1979), este efecto podría explicar, en parte, nuestros resultados. El depósito de calcio sensible a vanadato es similar al depósito que liberan los agonistas, como nos demuestra el hecho de que el vanadato no es capaz de incrementar la  $[Ca^{2+}]_i$  después del tratamiento con taptisgargina en medio libre de calcio (Figura 18). Por otro lado, la coincubación de las células acinares con vanadato y CCK-8 potencia la fase de meseta de la respuesta de

calcio a la CCK-8 sin modificar significativamente el pico máximo alcanzado con este secretagogo (Figura 16). Esta observación concuerda con un estudio previo en una línea celular de tiroides de rata (Meucci y cols., 1995) donde el vanadato provoca una fase de meseta en la respuesta del calcio a la noradrenalina sin modificar el pico de calcio inicial debido a la activación del receptor adrenérgico. Resultados similares se han obtenido en células acinares pancreáticas (Hirohata y cols., 1998) donde el vanadato mantiene la fase de meseta del incremento de calcio inducido por CCK-8. Este efecto estimulador del vanadato sobre la fase de meseta de la respuesta de calcio a la CCK-8 podría ser debido a que bloquea los mecanismos de salida del calcio desde el citosol al exterior, como nos indica el hecho de que el vanadato fue capaz de mantener esta fase de meseta incluso en medio libre de calcio (Figura 16). De hecho, se ha demostrado que el vanadato es un inhibidor de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática en glóbulos rojos (Bond y Hudgins, 1980) y en membrana de músculo liso (Popescu e Ignat, 1983). Sin embargo, no podemos descartar que el mantenimiento de la fase de meseta en presencia de vanadato sea debido únicamente a su efecto bloqueante de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo. Por tanto nuestros datos sugieren que el vanadato inhibe tanto la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de depósitos, implicada en el secuestro intracelular de calcio dentro de los almacenes intracelulares, como la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática, incrementando, por tanto, la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Los efectos del vanadato sobre la movilización de calcio se bloquearon por la presencia del agente reductor de grupos sulfidrilos DTT (Figura 17). Se ha demostrado previamente que los agentes que oxidan grupos sulfidrilos son capaces de movilizar calcio en diferentes tipos celulares, como linfocitos T y células endoteliales (Fletcher y cols., 1993; Fleming y cols., 1996). En las células acinares pancreáticas, se ha demostrado que el timerosal, un agente oxidante de estos grupos sulfidrilos, induce picos de calcio que son bloqueados reversiblemente por el DTT (Thorn y cols., 1992). Además se sabe que los grupos sulfidrilos tienen un papel fundamental en la función de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y que los agentes oxidantes de estos grupos marcadamente inhiben el relleno de calcio dependiente de ATP en fracciones de membrana plasmática de hígado (Bellomo y cols., 1983). Nuestros datos sugieren que los efectos del vanadato sobre la movilización del calcio están mediados por un mecanismo que implica la oxidación de grupos sulfidrilos. Así, el DTT, que protege a los grupos sulfidrilos de la oxidación, bloquea los efectos del vanadato. Sin embargo, el DTT fue incapaz de bloquear los efectos del vanadato tanto sobre la secreción basal de amilasa así como sobre la estimulada por CCK-8 (Tabla VI). Muy recientemente se ha demostrado que el vanadato estimula la liberación de amilasa activando la PKC (Hirohata y cols., 1998). Nosotros hemos analizado esta hipótesis usando GF 109203 X (GFX), un inhibidor selectivo de esta enzima, sobre la secreción de amilasa estimulada por

vanadato. Nuestros resultados indican que el GFX no es capaz de inhibir el efecto estimulador del vanadato sobre la secreción basal de amilasa (Tabla VI). El vanadato podría, por tanto, tener múltiples sitios de acción y no podemos, con nuestros experimentos, excluir la posibilidad de que el vanadato pueda también actuar en alguno de los pasos finales del proceso de excitosis.

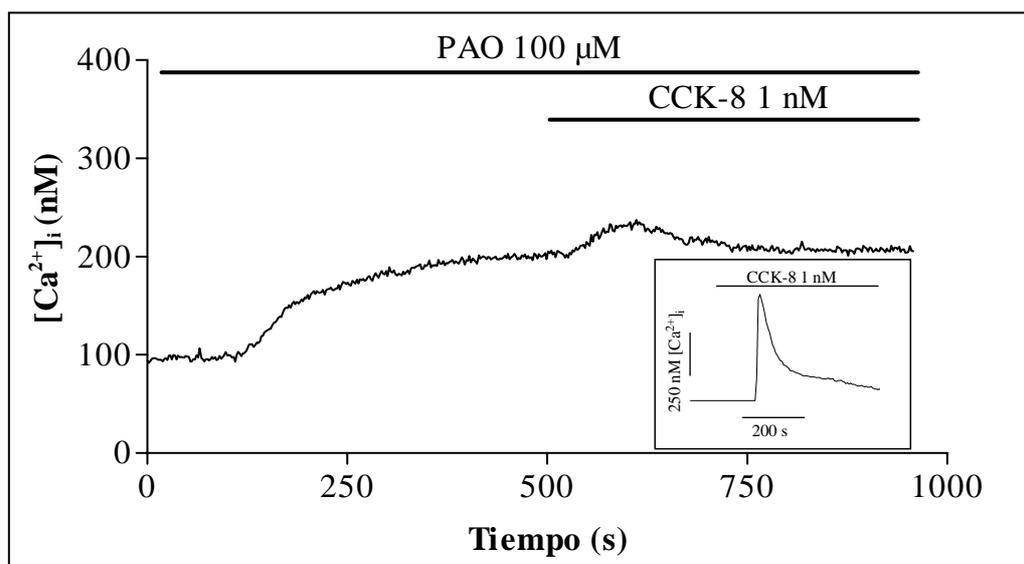
Finalmente, nuestros estudios de los efectos del vanadato sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por el vaciamiento de los depósitos tras la administración de tapsigargina, indican que el vanadato provoca un incremento en esta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol. En nuestras condiciones experimentales, el vanadato induce un incremento adicional en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la readmisión de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en células pancreáticas cuyo depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a agonistas ha sido previamente vaciado con tapsigargina en un medio libre de calcio (Figura 22). En este contexto es importante señalar que en músculo liso está ampliamente demostrado que el vanadato induce contracciones (Nayler y Sparrow, 1983; Di Salvo y cols., 1993; St-Louis y cols., 1995), y que son dependientes de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (García y cols., 1981). Además, en nuestras condiciones experimentales, el vanadato revierte el efecto inhibitor del lantano (un inhibidor de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular) (Kwan y cols., 1990) (Figuras 23 y 24). Tal efecto puede ser únicamente explicado en base a que el vanadato induzca una entrada de calcio a través de canales insensibles a lantano, o bien que el vanadato pueda desplazar el lantano del canal de calcio o quelar a dicho ion. Sin embargo, nuestros datos también sugieren que la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  provocada por vanadato es independiente de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en células acinares pancreáticas. Los efectos del vanadato se observaron con soluciones libres de  $\text{Ca}^{2+}$ , como ya se ha mencionado anteriormente, aunque la subsecuente perfusión de una solución con concentración normal de  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mM) produjo un pequeño incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , no encontrándose una explicación posible para estos dos hechos contradictorios.

En resumen, nuestros datos muestran que el pretratamiento de las células acinares con vanadato conduce a una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares sensibles a agonistas y a una inhibición del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por CCK-8, mientras que la coincubación de los acinos con vanadato y CCK-8 potencia la fase de meseta de la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  a la CCK-8. Estos efectos del vanadato son bloqueados por DTT, lo que indica que su acción está mediada probablemente por la oxidación de grupos sulfidrilos de las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas. Estos resultados también sugieren que el vanadato tiene un efecto estimulador sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por el vaciamiento de los depósitos intracelulares con tapsigargina. Finalmente, los efectos del vanadato en la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  se correlacionan, al menos en la mayor parte, con la secreción de amilasa estimulada por vanadato.



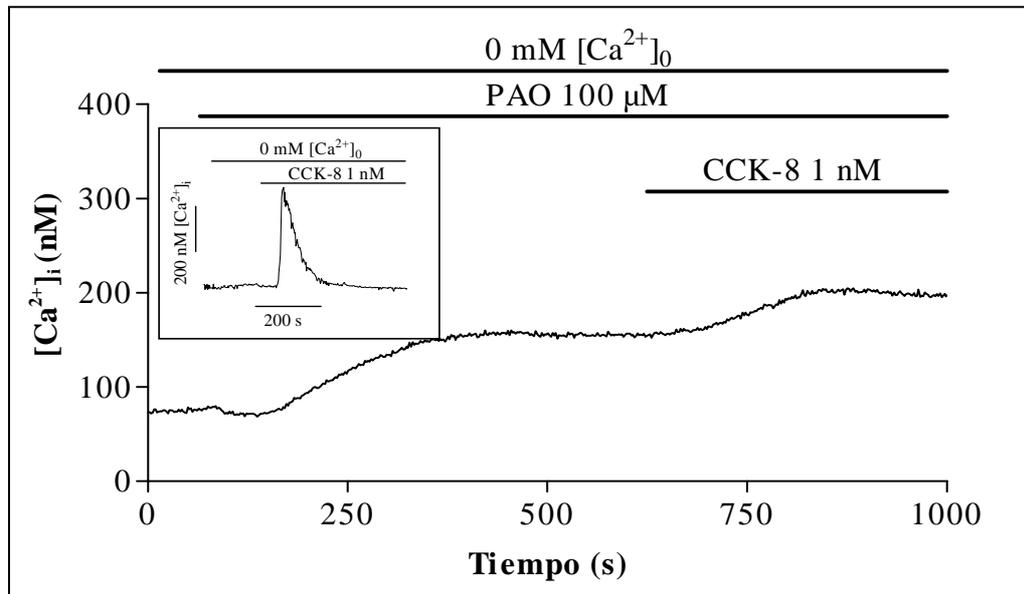
#### 4.3.4. Efectos del óxido de fenilarsina (PAO) sobre la concentración intracelular de calcio.

El óxido de fenilarsina (desde ahora, PAO) es un compuesto trivalente de arsénico permeable que favorece la formación de complejos entre grupos sulfhidrilos vecinos de proteínas para formar estructuras de anillos estables (Li y Pickart, 1995), y que se utiliza ampliamente como inhibidor de tirosinas fosfatasas (Fletcher y cols., 1993; Kumada y cols., 1996). Para comprobar su efecto sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  perfundimos las células acinares con 100  $\mu$ M de PAO en un medio extracelular con 1 mM de calcio. En la Figura 25 se observa que la administración de PAO produce un lento y gradual aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , alcanzando el máximo después de 8-9 minutos de perfusión y estando este valor próximo a 200 nM de calcio. La estimulación posterior con CCK-8 1 nM no produce la respuesta típica que se obtiene con CCK-8 sola, sino que se produce sólo un ligero aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Este comportamiento se observó en 54 de las 72 células estudiadas en 5 experimentos independientes.



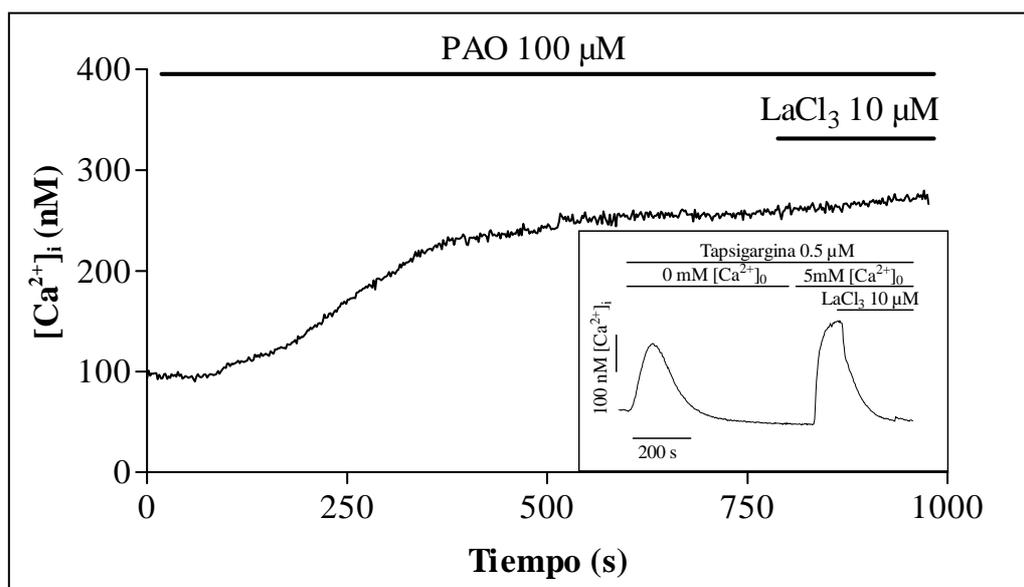
**Figura 25:** Movilización de calcio en respuesta a CCK-8 en células acinares pretratadas con PAO. Los acinos se perfundieron con PAO 100  $\mu$ M seguido por CCK-8 1 nM en medio normal de calcio (1 mM  $[Ca^{2+}]_o$ ). En el recuadro interior se muestra la respuesta típica a la CCK-8. Las curvas son representativas de los trazados obtenidos en 5 experimentos independientes.

Resultados similares se obtuvieron cuando los acinos se perfundieron con la misma concentración de PAO en un medio libre de calcio (NaHEPES sin calcio que contenía 0.5 mM de EGTA), es decir, es capaz de incrementar la  $[Ca^{2+}]_i$  e inhibir el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por CCK-8 (Figura 26).



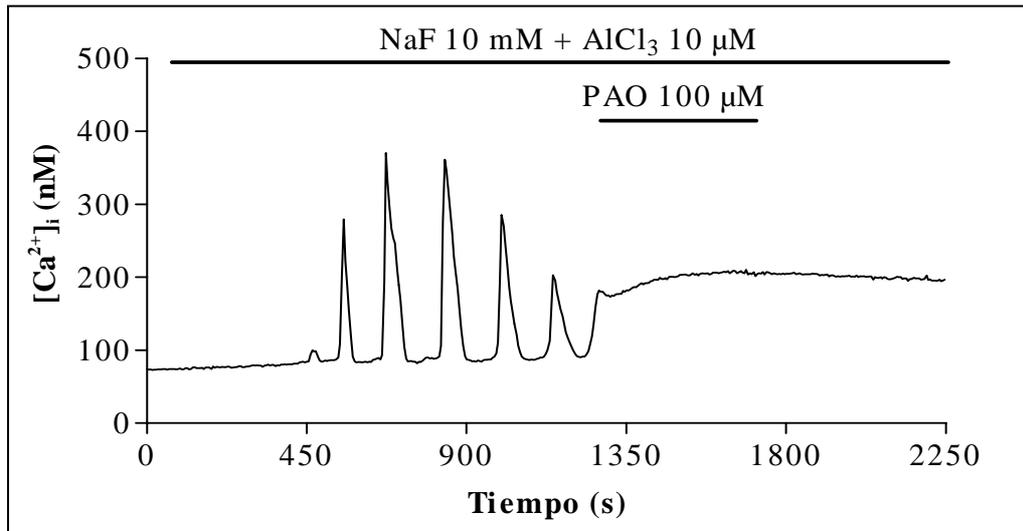
**Figura 26:** Movilización de calcio en respuesta a CCK-8 en células acinares pretratadas con PAO. Los acinos se perfundieron con PAO 100  $\mu$ M seguido por CCK-8 1 nM en medio libre de calcio (0 mM  $[Ca^{2+}]_0$  + 0.5 mM EGTA). En el recuadro interior se muestra la respuesta típica a la CCK-8. Las curvas son representativas de los trazados obtenidos en 6 experimentos independientes.

El efecto del PAO sobre la movilización del calcio tampoco se vio afectado por la perfusión con lantano ( $LaCl_3$  10  $\mu$ M), un inhibidor de la entrada de calcio desde el medio extracelular (Kwan y cols., 1990) (Figura 27). Los recuadros insertados dentro de estas tres figuras muestran los efectos que produce la CCK-8 sola sobre la movilización de calcio en un medio normal y en un medio libre de calcio y el efecto del lantano sobre la entrada de calcio desde el medio extracelular estimulada por la depleción de los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  provocada por tapsigargina.

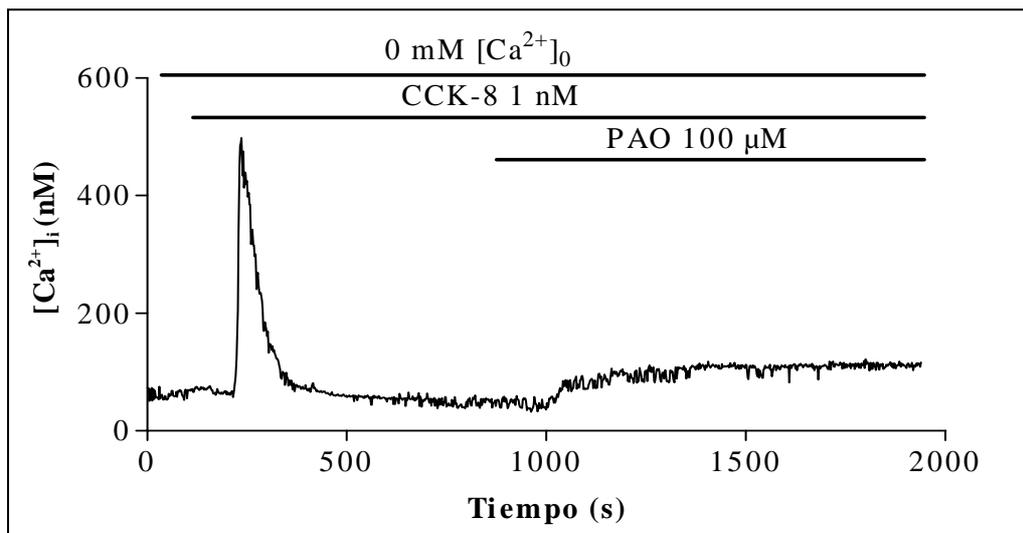


**Figura 27:** Movilización de calcio en respuesta a lantano en células acinares pretratadas con PAO. Los acinos se perfundieron con PAO 100  $\mu\text{M}$  seguido por 10  $\mu\text{M}$  de lantano en medio normal de calcio (1 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ). En el recuadro interior se muestra el efecto de 10  $\mu\text{M}$  de lantano sobre la entrada de calcio desde el medio extracelular inducida por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio con 0.5 M de tapsigargina y la subsecuente perfusión con 5 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Las curvas son representativas de los trazados obtenidos en 6 experimentos independientes.

También estudiamos si el efecto inhibitorio que el PAO ejerce sobre el aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  estimulado por CCK-8 estaba relacionado con una inhibición del acoplamiento entre el receptor de la CCK y la correspondiente proteína G, o si esta inhibición tenía lugar en un paso posterior a la activación de la proteína G. Para ello utilizamos una combinación de NaF (10 mM) y  $\text{AlCl}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ). Estas sales se combinan originando fluoroaluminato ( $\text{AlF}_4^-$ ) que activa inespecíficamente varias proteínas G conduciendo a un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a través de la estimulación de la fosfolipasa C (PLC) unida a proteínas G (Shuttleworth, 1990). Como se observa en la Figura 28, la perfusión de las células acinares pancreáticas con NaF +  $\text{AlCl}_3$  provocó un patrón de oscilaciones de baja frecuencia de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en 27 de 40 células estudiadas en 3 experimentos. Sin embargo, la posterior administración de PAO 100  $\mu\text{M}$  al medio de perfusión inhibió las oscilaciones iniciadas por  $\text{AlF}_4^-$  aunque la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  permaneció elevada en comparación con el valor basal. Esta inhibición fue rápida e irreversible, ya que la retirada de PAO del medio de perfusión no reprodujo el patrón oscilatorio inducido por  $\text{AlF}_4^-$ .

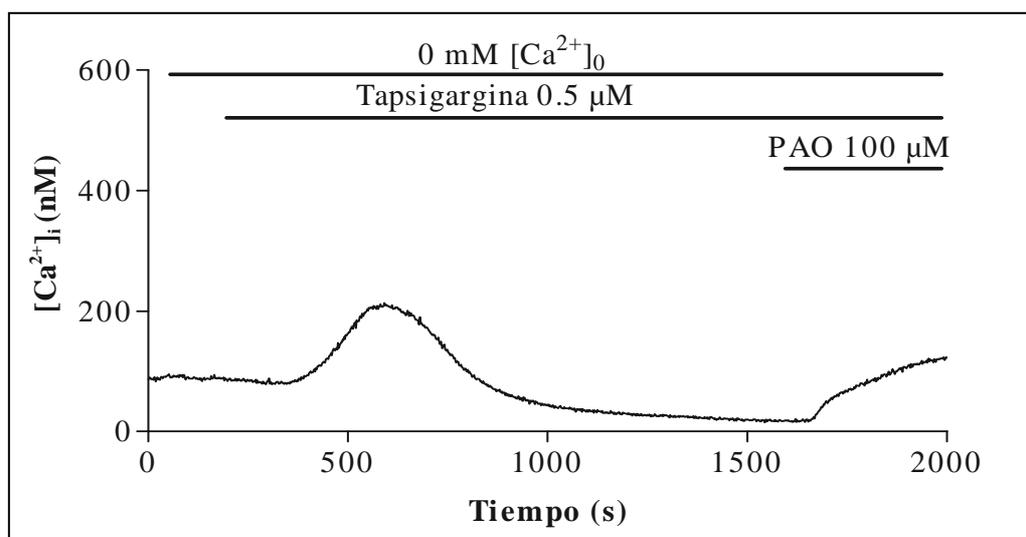


**Figura 28:** Efecto del PAO sobre las oscilaciones de calcio inducidas por AlF<sub>4</sub>. Las células acinares pancreáticas se perfundieron con NaF 10 mM + AlCl<sub>3</sub> 10 µM y posteriormente con 100 µM de PAO en medio normal de calcio (1 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>). La curva es representativa de los trazados obtenidos en 3 experimentos independientes.



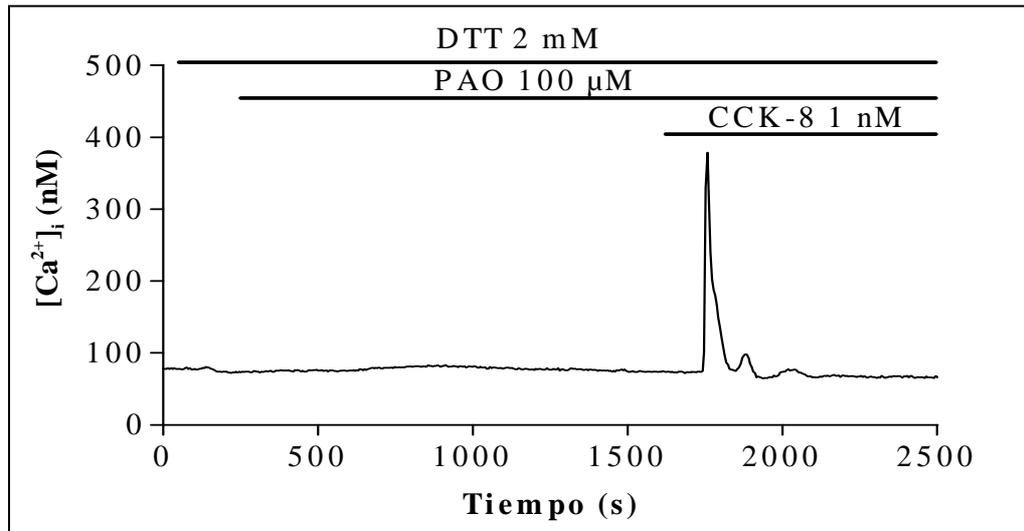
**Figura 29:** Efecto del vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio con una concentración máxima de CCK-8 sobre el incremento de calcio estimulado por PAO. Las células acinares pancreáticas se perfundieron con CCK-8 1 nM y posteriormente con 100 µM de PAO en medio libre de calcio (0 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> + 0.5 mM EGTA). La curva es representativa de los trazados obtenidos en 4 experimentos independientes.

La aplicación de 100  $\mu\text{M}$  de PAO a células acinares cuyos depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular fueron previamente vaciados por una concentración máxima de CCK-8 (1 nM) o por 0.5  $\mu\text{M}$  de taspigargina en ausencia de calcio extracelular, fue todavía capaz de incrementar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Figuras 29 y 30). Este comportamiento se produjo en las 34 células estudiadas en 3-4 experimentos, aunque los incrementos fueron significativamente menores que los obtenidos durante la estimulación con PAO solo (102  $\pm$  9 nM después de CCK-8 más PAO [Figura 29], 147  $\pm$  9 nM después de taspigargina más PAO [Figura 30] y 248  $\pm$  16 nM después de PAO [Figura 26];  $p < 0.001$ ).



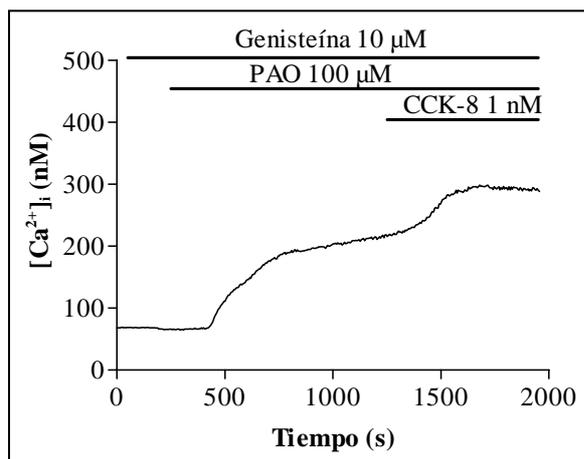
**Figura 30:** Efecto del vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio con taspigargina sobre el incremento de calcio estimulado por PAO. Las células acinares pancreáticas se perfundieron con 0.5  $\mu\text{M}$  de taspigargina y posteriormente con 100  $\mu\text{M}$  de PAO en medio libre de calcio (0 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  + 0.5 mM EGTA). La curva es representativa de los trazados obtenidos en 4 experimentos independientes.

De manera similar a lo realizado en el grupo experimental del vanadato, también investigamos el efecto del agente reductor de grupos sulfidrilos, DTT, sobre la liberación de calcio inducida por PAO y sobre el efecto inhibitor que el PAO ejerce sobre la movilización de calcio estimulada por CCK-8. Como se observa en la Figura 31, el DTT revirtió completamente tanto el incremento de calcio inducido por PAO, como su efecto inhibitor sobre el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  estimulado por CCK-8.



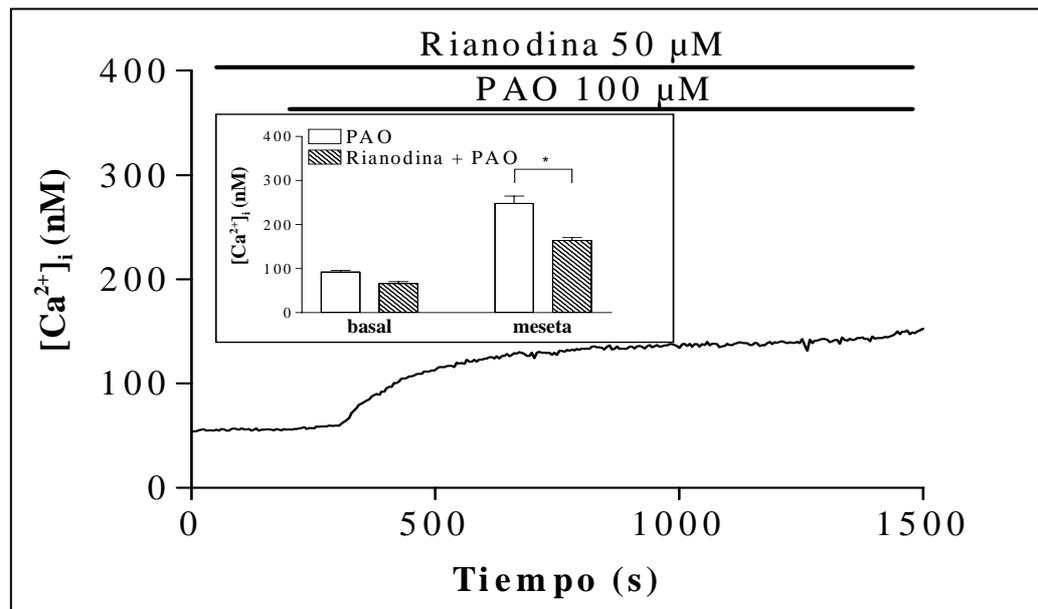
**Figura 31:** Efecto del ditioneitol (DTT) sobre la movilización de calcio en respuesta a PAO y CCK-8. Las células acinares pancreáticas se perfundieron con 2 mM de DTT, PAO 100 µM y CCK-8 1 nM en medio normal de calcio (1 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>). La curva es representativa de los trazados obtenidos en 3 experimentos independientes.

Por el contrario, la perfusión de las células acinares con 10 µM de genisteína, un inhibidor de las proteínas tirosinas cinasas, no modificó ni la liberación de Ca<sup>2+</sup> inducida por el PAO ni revirtió el efecto inhibitorio del PAO sobre el incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> estimulado por la CCK-8 (Figura 32). Sin embargo, tenemos que destacar que no se utilizaron las concentraciones de genisteína descritas en la literatura (100 µM), que muestran efectos para esta sustancia (Yule y cols., 1994), porque se produjeron interferencias con la señal de fluorescencia emitida por el fura-2.



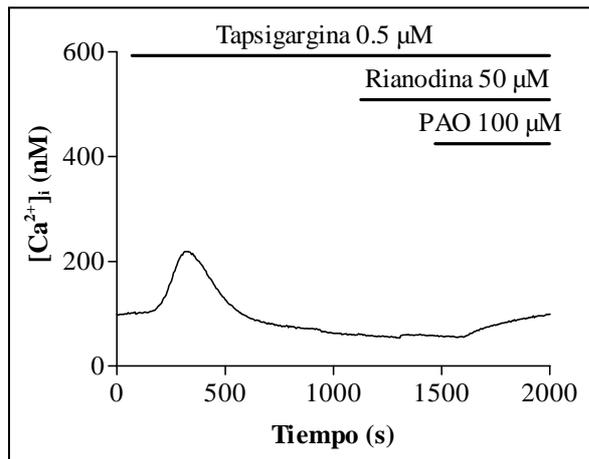
**Figura 32:** Efecto de la genisteína sobre la movilización de calcio en respuesta a PAO y CCK-8. Las células acinares pancreáticas se perfundieron con genisteína 10 µM, PAO 100 µM y CCK-8 1 nM en medio normal de calcio (1 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>). La curva es representativa de los trazados obtenidos en 4 experimentos independientes.

Para conocer el posible mecanismo por el que el PAO produce liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, examinamos los efectos del PAO en presencia de rianodina. Tanto en células excitables como en no excitables, los efectos de la rianodina son duales: a bajas concentraciones (10 nM-10  $\mu\text{M}$ ) provoca activación de los canales que liberan calcio hacia el citosol, mientras que a altas concentraciones (por encima de 10  $\mu\text{M}$ ), la rianodina bloquea la activación de estos canales (Shoshan-Barmatz, 1990; Verkhatsky y Shmigol, 1996). Para conseguir este objetivo los acinos pancreáticos se perfundieron con rianodina a la concentración de 50  $\mu\text{M}$  y a continuación con 100  $\mu\text{M}$  de PAO en medio libre de calcio. Nuestros resultados (Figura 33) muestran que el pretratamiento de los acinos pancreáticos con rianodina provoca una disminución en la respuesta de calcio estimulada por PAO, siendo esta disminución estadísticamente significativa cuando se compara con la respuesta obtenida tras la perfusión con PAO solo ( $164 \pm 6$  nM [Figura 33] y  $248 \pm 16$  nM [Figura 26], respectivamente,  $p < 0.05$ ). Esta reducción fue del 45% y se observó en 19 de 29 células estudiadas en 3 experimentos (panel interior de la Figura 33).



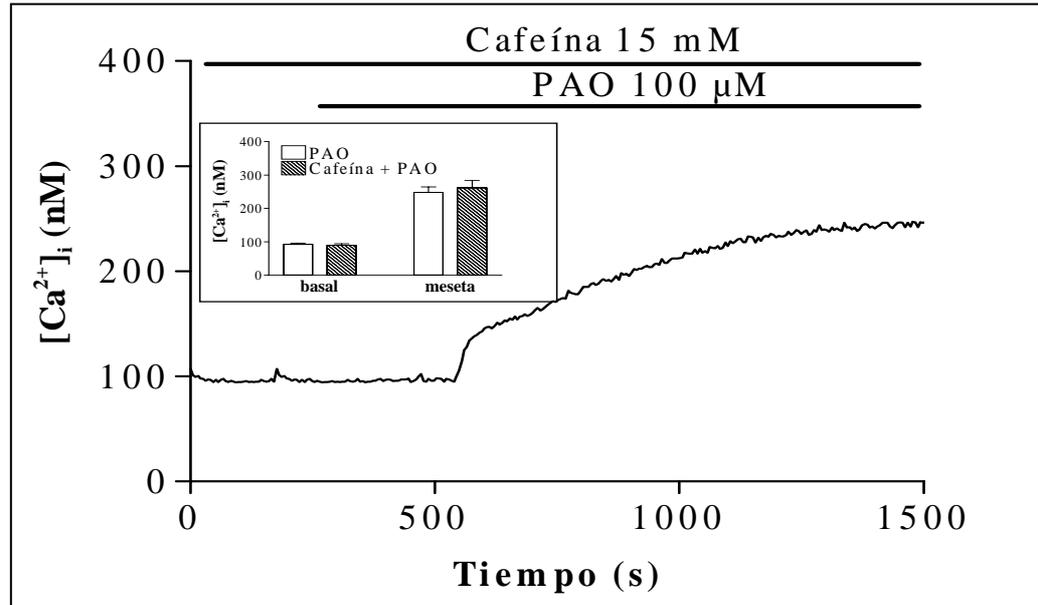
**Figura 33:** Efecto de la rianodina sobre el incremento de calcio estimulada por PAO. Las células acinares pancreáticas se perfundieron con 50  $\mu\text{M}$  de rianodina y posteriormente con PAO 100  $\mu\text{M}$  en medio libre de calcio (0 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  + 0.5 mM EGTA). La curva es representativa de los trazados obtenidos en 3 experimentos independientes. En el recuadro interior de la figura se muestra el incremento de calcio inducido por PAO en presencia y ausencia de rianodina. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos. \* indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

También se realizaron experimentos para determinar si la rianodina podía aún reducir el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por PAO en acinos pancreáticos cuyos depósitos intracelulares sensibles a IP3 habían sido vaciados previamente con tapsigargina. Bajo estas condiciones experimentales, (Figura 34) la rianodina redujo la liberación de calcio inducida por PAO comparada con la respuesta obtenida con PAO solo en células cuyos depósitos habían sido vaciados con tapsigargina ( $81 \pm 2$  nM [Figura 34] y  $147 \pm 9$  nM [Figura 30], respectivamente;  $p < 0.05$ ).

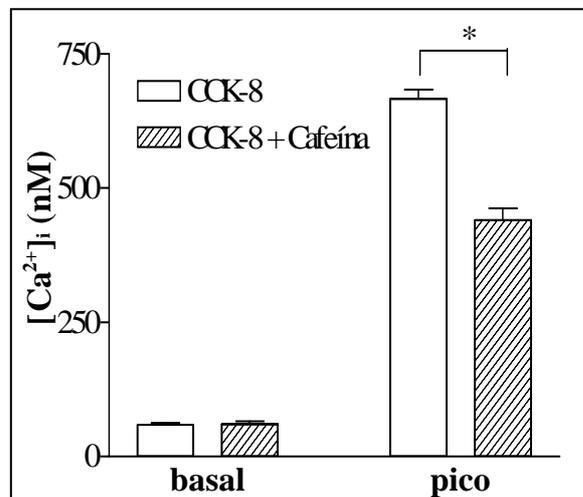


**Figura 34:** Efecto de la rianodina sobre el incremento de calcio estimulado por PAO en células cuyos depósitos intracelulares de calcio han sido previamente vaciados con tapsigargina. Las células acinares pancreáticas se perfundieron con tapsigargina 0.5  $\mu$ M, 50  $\mu$ M de rianodina y PAO 100  $\mu$ M en medio libre de calcio (0 mM  $[Ca^{2+}]_o$  + 0.5 mM EGTA). La curva es representativa de los trazados obtenidos en 3 experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que la mayoría de los depósitos de calcio sensibles al PAO poseen receptores de rianodina. El resto del depósito podría estar asociado con los receptores de IP3. Sin embargo, la cafeína, que ha sido utilizada ampliamente para bloquear la producción de IP3 (Toescu y cols., 1992) o para inactivar los efectos del IP3 (Wakui y cols., 1990), no modificó significativamente el incremento de calcio estimulado por PAO (Figura 35). En la Figura 36 se muestra el típico efecto inhibitorio de la cafeína sobre la liberación de calcio inducida por CCK-8.



**Figura 35:** Efecto de la cafeína sobre el incremento de calcio estimulado por PAO. Las células acinares pancreáticas se perfundieron con 15 mM de cafeína y posteriormente con PAO 100 µM en medio libre de calcio (0 mM  $[Ca^{2+}]_o$  + 0.5 mM EGTA). La curva es representativa de los trazados obtenidos en 3 experimentos independientes. En el recuadro interior de la figura se muestra el incremento de calcio inducido por PAO en presencia y ausencia de cafeína. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos.



**Figura 36:** Efecto de la cafeína sobre el incremento de calcio estimulado por CCK-8. Los acinos pancreáticos se perfundieron con CCK-8 1 nM en ausencia o presencia de 15 mM de cafeína en medio libre de calcio (0 mM  $[Ca^{2+}]_o$  + 0.5 mM EGTA). Los valores representan la media  $\pm$  EEM del incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  de 3 experimentos independientes.

\* indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### 4.3.5. Efectos del óxido de fenilarsina sobre la secreción de amilasa.

Al igual que hicimos con el vanadato, quisimos comprobar el efecto del PAO sobre la secreción de amilasa estimulada por secretagogos. Los resultados se muestran en la Tabla VII.

**Tabla VII: Efecto del PAO sobre la secreción de amilasa basal y estimulada por CCK-8.**

Tratamiento		Más PAO (M)		
		10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>
Basal	4.6 ± 0.3	6.2 ± 0.7 †	8.9 ± 1.0 †	9.3 ± 0.8 †
CCK-8 320 pM	25.8 ± 1.5 †	10.8 ± 1.0 *	12.3 ± 1.7 *	11.3 ± 0.8 *
DTT 2 mM	4.3 ± 0.2	4.9 ± 0.4 ⌘	5.1 ± 0.5 ⌘	4.0 ± 0.4 ⌘
CCK-8 320 pM + DTT 2 mM	24.8 ± 1.7 †	22.9 ± 1.8 ‡	21.8 ± 1.5 ‡	20.3 ± 2.4 ‡
AlF <sub>4</sub> 10 μM	24.1 ± 1.9 †	9.3 ± 0.6 ◆	11.4 ± 0.8 ◆	12.3 ± 0.8 ◆

La liberación de amilasa se expresa como porcentaje del contenido total de amilasa al comienzo de la incubación. Los resultados son la media ± EEM de 6 experimentos.

† indica diferencias estadísticamente significativas respecto al correspondiente valor basal.

\* indica diferencias estadísticamente significativas respecto al valor obtenido con CCK-8 sola.

⌘ indica diferencias estadísticamente significativas respecto al valor obtenido con PAO solo.

‡ indica diferencias estadísticamente significativas respecto al correspondiente valor de PAO + CCK-8.

◆ indica diferencias estadísticamente significativas respecto al valor de AlF<sub>4</sub> solo.

Como se muestra en la Tabla VII, el PAO estimula la secreción de amilasa de una manera dosis-dependiente. Adicionalmente, el PAO inhibe la amilasa liberada por 320 pM de CCK-8 a todas las concentraciones de PAO ensayadas. Estos efectos del PAO tanto sobre la secreción basal de amilasa como sobre la estimulada por CCK-8 son revertidos por acción del DTT, un compuesto que por sí solo no modifica ni la secreción basal de amilasa ni la estimulada por CCK-8. De manera similar, el PAO también provoca una inhibición de la secreción de amilasa inducida por la activación de proteínas G con AlF<sub>4</sub>.

#### ***4.3.6. Discusión sobre los efectos del óxido de fenilarsina.***

Los resultados de nuestro estudio con PAO muestran que este agente reactivo de grupos tiol estimula un incremento tanto en la  $[Ca^{2+}]_i$  como en la secreción de amilasa en las células acinares pancreáticas (Figura 25 y Tabla VII). Nuestros datos también indican que este incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  se debe principalmente a la liberación de calcio desde depósitos intracelulares, ya que también se produce en medio extracelular libre de calcio y la administración de lantano no modifica la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figuras 26 y 27). Por otra parte, el PAO reduce fuertemente la liberación de calcio inducida por CCK-8 (Figuras 25 y 26), resultado que se correlaciona con la inhibición que el PAO ejerce sobre la secreción de amilasa estimulada por CCK-8 (Tabla VII). Adicionalmente se presentan evidencias de que, al menos en parte, el PAO actúa sobre los receptores de rianodina.

En las células acinares pancreáticas, el efecto estimulador del PAO sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  y su efecto inhibitorio en la movilización de calcio inducida por agonistas podría deberse, al igual que ocurría con el vanadato, a un efecto directo sobre el proceso de liberación de calcio. Resultados similares se han observado en células humanas HeLa después de la adición de timerosal (un agente oxidante de grupos tioles) (Bootman y cols., 1992). Nuestros resultados de que el PAO libera calcio desde depósitos intracelulares, sugieren que la falta de efecto de la CCK-8 para elevar la  $[Ca^{2+}]_i$  después del tratamiento con PAO es en parte debida al vaciamiento parcial o total de los depósitos por este agente. En este contexto, es importante resaltar que el PAO inhibe la señal de calcio generada por la activación de proteínas G (Figura 28), sugiriendo que, al menos, una parte del efecto inhibitorio sobre la respuesta de calcio inducida por CCK tendría lugar en pasos posteriores a la activación de las proteínas G y no sobre el receptor de la CCK o sobre su unión con proteínas G. El depósito de calcio sensible a PAO es mayor que el sensible a agonistas, como demuestra el hecho de que el PAO todavía es capaz de movilizar calcio después del tratamiento con CCK-8 o taspigargina en medio libre de calcio (Figuras 29 y 30).

Ya hemos comentado anteriormente que los agentes oxidantes de grupos sulfidrilos son capaces de liberar calcio en diferentes tipos celulares, como células endoteliales (Fleming y cols., 1996), linfocitos T (Fletcher y cols., 1993), plaquetas (Hecker y cols., 1989), hepatocitos (Rooney y cols., 1991), huevos de hamster (Swann, 1991) y acinos pancreáticos (Thorn y cols., 1992). Sin embargo, no se conoce con exactitud sobre qué depósito intracelular de calcio ejercen su acción estos agentes oxidantes. Hay trabajos que ponen de manifiesto sus efectos sobre la inhibición de las

Ca<sup>2+</sup>-ATPasas (Bellomo y cols., 1983), sobre la sensibilización tanto de la liberación de calcio inducida por calcio (CICR) en huevos de hamster (Swann, 1991) como de la movilización de calcio estimulada por IP3 en células HeLa (Bootman y cols., 1992). En nuestras condiciones experimentales, los efectos del PAO sobre la movilización del calcio son bloqueados en presencia de DTT (Figura 31), un agente reductor de grupos sulfidrilos. Esto indica que el estado de oxidación de los grupos tioles de los canales de calcio y/o de las bombas asociadas a los almacenes intracelulares de calcio juegan un papel fundamental en su función normal. En las células acinares pancreáticas se ha demostrado que los picos de calcio inducidos por timerosal se bloquearon reversiblemente en presencia de DTT (Thorn y cols., 1992). El DTT también revierte la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependiente de Ca<sup>2+</sup>/NADPH inducida por PAO en la membrana plasmática de células del tiroides (Gorin y cols., 1997), y también se sabe que la inhibición de la formación de radical superóxido estimulada por PAO en neutrófilos humanos se revierte específicamente por 2,3-dimercaptopropanol, un competidor de grupos ditioles vecinos (LeCabec y Maridonneau-Parini, 1995).

Por otra parte, existen evidencias de que el receptor de rianodina que media la liberación de calcio inducida por calcio en el retículo sarcoplásmico posee grupos sulfidrilos necesarios para su función (Klonowski-Stumpe y cols., 1997) y que el calcio puede ser liberado desde el retículo sarcoplásmico vía la apertura del canal de rianodina por agentes oxidantes de estos grupos sulfidrilos (Trimm y cols., 1986; Zaidi y cols., 1989), incluyendo determinadas especies reactivas de oxígeno (Favero y cols., 1995). Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los agentes que reaccionan con grupos tioles pueden modular los receptores de rianodina de los almacenes intracelulares de calcio. Primero, los efectos del PAO se bloquean con DTT (Figura 31). Segundo, el pretratamiento de las células acinares pancreáticas con altas concentraciones de rianodina para bloquear los receptores de rianodina (Shoshan-Barmatz, 1990; Verkhatsky y Shmigol, 1996), redujo la liberación de calcio en respuesta a la subsecuente adición de PAO (Figura 33). Aunque no podemos excluir una interacción con proteínas de membrana plasmática, el mecanismo más probable para explicar nuestros resultados es la interacción del PAO con el canal de calcio sensible a rianodina.

No obstante, aunque una parte substancial del depósito de calcio sensible a PAO posee receptores de rianodina, el PAO todavía es capaz de liberar una pequeña cantidad de calcio en células acinares pancreáticas cuyos depósitos intracelulares de calcio sensibles a agonistas han sido previamente vaciados con tapsigargina y en los cuales los receptores de rianodina se bloquearon con una concentración alta de la misma (Figura 34). Este resultado nos presenta la posibilidad de que el PAO induce liberación de calcio no sólo vía receptores de rianodina, sino también a través de una

ruta diferente. Aunque el calcio movilizable por PAO incluye al depósito sensible a IP<sub>3</sub>, el receptor de IP<sub>3</sub> no parece ser la vía activada por PAO dado la falta de efecto de la cafeína, un antagonista del receptor de IP<sub>3</sub> en acinos pancreáticos (Wakui y cols., 1990) (Figuras 35 y 36). Por tanto, nuestros resultados sugieren que el PAO puede también movilizar calcio desde otro tipo de depósito de calcio, que podría ser la mitocondria.

De hecho, la localización e identidad de los depósitos intracelulares de calcio es todavía poco conocida. El consenso general es que el retículo endoplasmático posee receptores de IP<sub>3</sub> en casi todos los tipos celulares, aunque en acinos pancreáticos los gránulos secretores acumulados en el polo luminal parecen ser el sitio para la liberación fisiológica de calcio vía receptores de IP<sub>3</sub> y rianodina (Ward y cols., 1995). Sin embargo, todavía no se ha demostrado si los receptores de rianodina e IP<sub>3</sub> se localizan en distintos depósitos (Malgaroli y cols., 1990) o si están presentes a la vez en el mismo tipo de almacén intracelular de calcio (Giannini y cols., 1992).

Finalmente, nuestros datos de la acción del PAO sobre la secreción enzimática indican que el PAO provoca un incremento en la secreción basal de amilasa de una manera dosis-dependiente, e inhibe la estimulación de la secreción de amilasa por agonistas que incrementan la  $[Ca^{2+}]_i$  (Tabla VII). Es probable que el efecto del PAO se deba a su capacidad para incrementar la  $[Ca^{2+}]_i$ . Si el PAO vacía el calcio almacenado en los depósitos intracelulares, la inhibición ejercida por el PAO sobre la secreción de amilasa estimulada por secretagogos que median su mecanismo de acción a través de la vía del calcio, podría deberse a una ruptura de la señal normal de calcio. Al igual de lo que sucede con los experimentos de calcio, el DTT es capaz de bloquear los efectos del PAO tanto sobre la liberación basal de amilasa como sobre la estimulada por CCK-8 (Tabla VII).

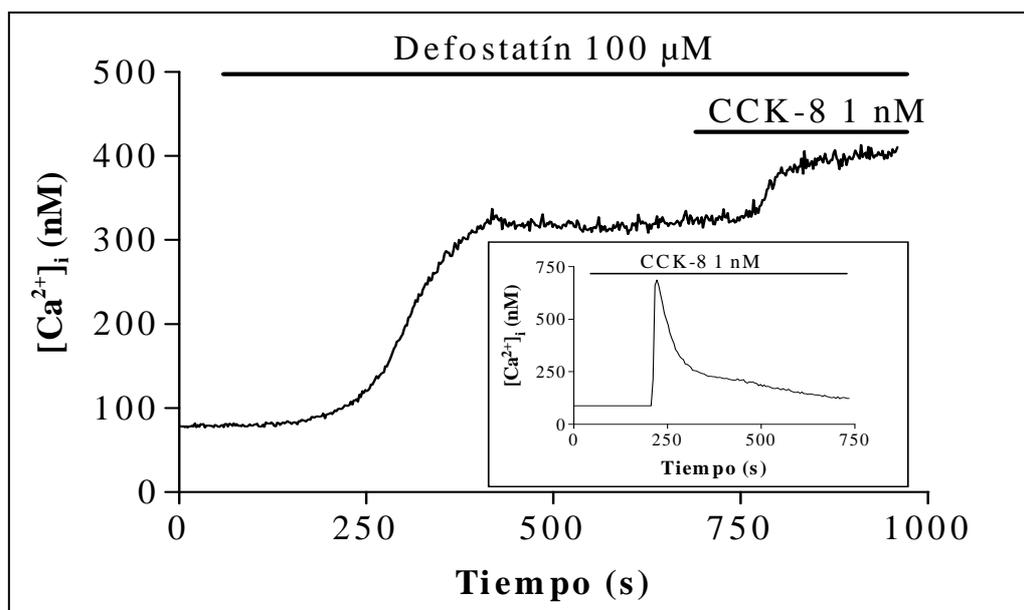
En resumen, nuestros resultados ponen de manifiesto que el PAO moviliza calcio desde almacenes intracelulares e inhibe el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  estimulado por agonistas. Estos efectos del PAO pueden ser bloqueados por DTT, indicando que su acción está asociada a canales y/o bombas que contienen grupos tiol próximos. Estos resultados también sugieren que la liberación de calcio en respuesta al PAO, al menos en su mayor parte, se origina en depósitos sensibles a rianodina.



### 4.3.7. Efectos del defostatín sobre la concentración intracelular de calcio.

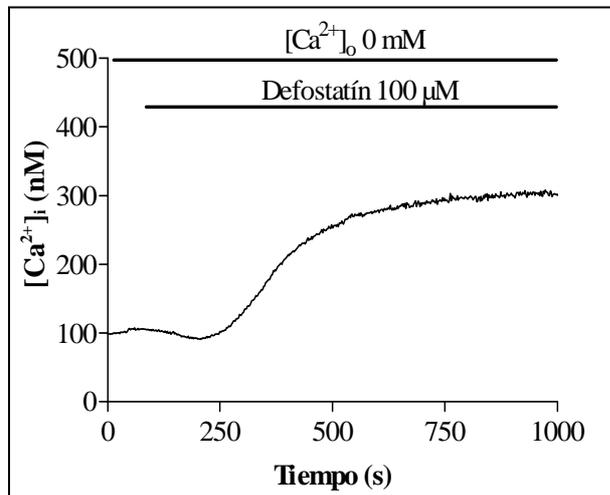
El defostatín, es un compuesto fenólico aislado recientemente en cultivos de *Streptomyces sp* y que se caracteriza por comportarse como un inhibidor de proteínas tirosinas fosfatasas (Imoto y cols., 1993; Watanabe y cols., 1995).

Para comprobar sus efectos sobre la  $[Ca^{2+}]_i$ , las células acinares pancreáticas se perfundieron con 100  $\mu M$  de defostatín en medio normal de calcio (1 mM  $[Ca^{2+}]_o$ ). Como se observa en la Figura 37, el defostatín provoca un lento y gradual incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , alcanzando el máximo después de más de 5 minutos de exposición. La subsecuente adición de CCK-8 al medio de perfusión no es capaz de producir el aumento típico en la  $[Ca^{2+}]_i$  que induce concentraciones máximas de CCK-8. Este efecto se observó en 50 de las 69 células estudiadas de 6 experimentos independientes.



**Figura 37:** Movilización de calcio en respuesta a CCK-8 en células acinares pretratadas con defostatín. Los acinos se perfundieron con defostatín 100  $\mu M$  seguido por CCK-8 1 nM en medio normal de calcio (1 mM  $[Ca^{2+}]_o$ ). En el recuadro interior se muestra la respuesta típica a la CCK-8 bajo las mismas condiciones experimentales. Las curvas son representativas de los trazados obtenidos en 6 experimentos independientes.

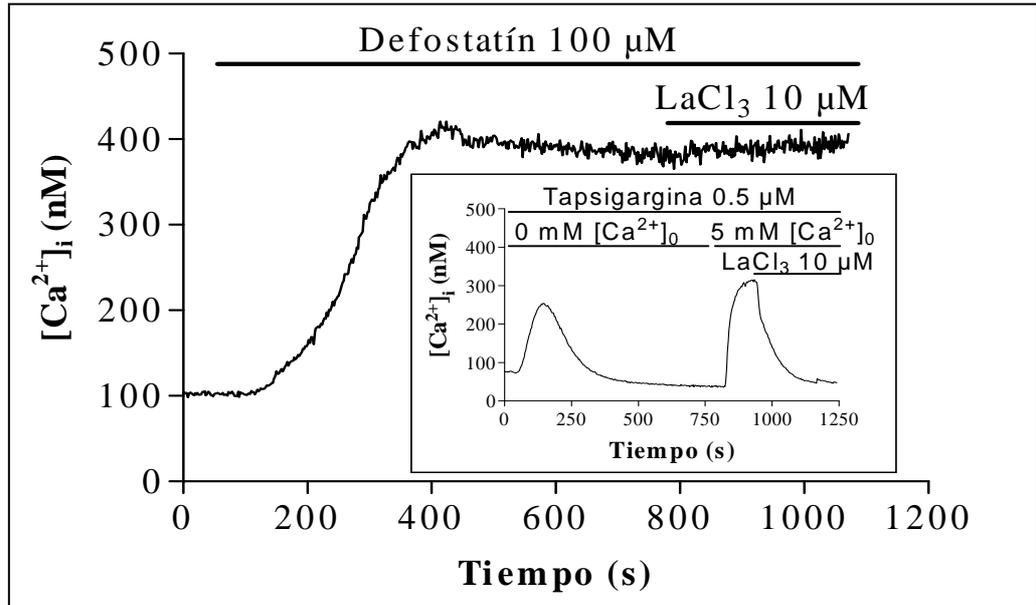
El defostatín también es capaz de incrementar la  $[Ca^{2+}]_i$  en medio libre de calcio, es decir, en NaHEPES sin calcio y suplementado con 0.5 mM de EGTA (Figura 38), aunque el aumento alcanzado es significativamente menor que en medio normal de calcio ( $78 \pm 12$  nM versus  $155 \pm 12$  nM,  $p < 0.05$ ).



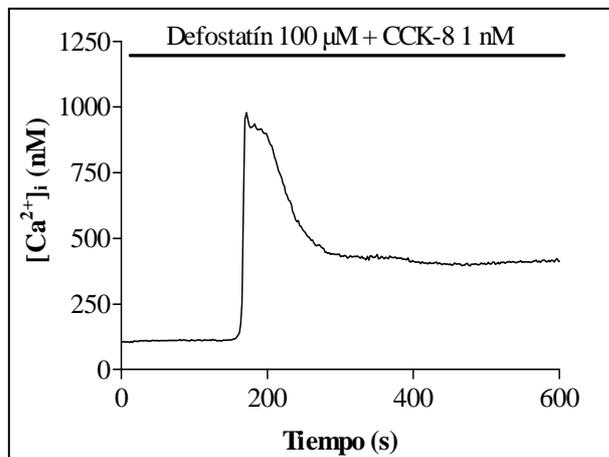
**Figura 38:** Movilización de calcio en respuesta a defostatín. Los acinos se perfundieron con defostatín 100  $\mu$ M en medio libre de calcio (0 mM  $[Ca^{2+}]_o$  + 0.5 mM EGTA). La curva es representativa de los trazados obtenidos en 6 experimentos independientes.

El efecto del defostatín sobre la movilización del calcio tampoco se vio afectado por la perfusión con lantano ( $LaCl_3$  10  $\mu$ M), un inhibidor de la entrada de calcio desde el medio extracelular (Kwan y cols., 1990) (Figura 39). En el recuadro interior de esta figura se observa la inhibición en la entrada de calcio desde el medio extracelular que produce el lantano en células acinares cuyos depósitos de calcio han sido vaciados previamente con tapsigargina.

Por otra parte, y de forma similar a los resultados con vanadato, la incubación conjunta de las células acinares pancreáticas con defostatín y CCK-8 no modificó significativamente el pico transitorio de calcio inducido por CCK-8, aunque la fase de meseta tras la estimulación con CCK-8 se mantuvo elevada comparada con la  $[Ca^{2+}]_i$  basal (Figura 40).

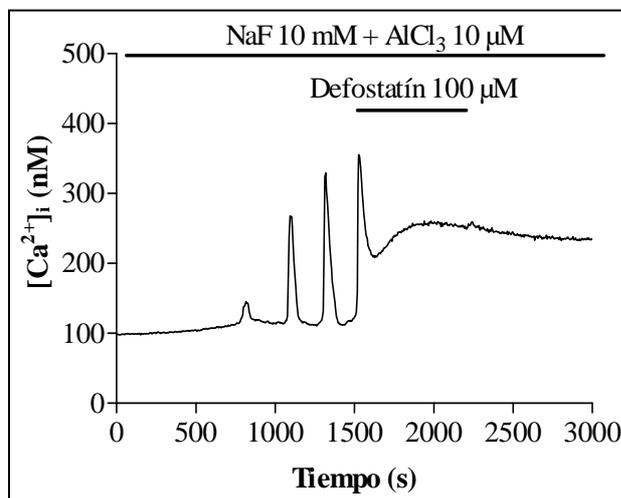


**Figura 39:** Movilización de calcio en respuesta a lantano en células acinares pretratadas con defostatín . Los acinos se perfundieron con defostatín 100  $\mu\text{M}$  seguido por  $\text{LaCl}_3$  10  $\mu\text{M}$  en medio normal de calcio (1 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ). En el recuadro interior se muestra el efecto de 10  $\mu\text{M}$  de lantano sobre la entrada de calcio desde el medio extracelular inducida por el vaciamiento de los depósitos intracelulares con tapsigargina 0.5  $\mu\text{M}$  y la subsecuente perfusión con 5 mM de  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ . Las curvas son representativas de los trazados obtenidos en 6 experimentos independientes.



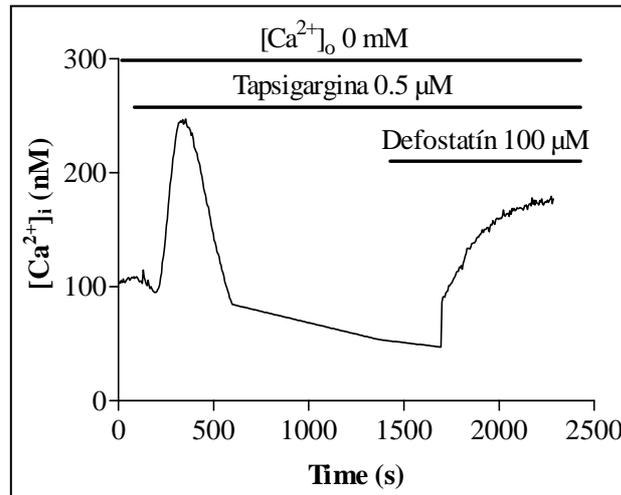
**Figura 40:** Efecto del defostatín sobre la fase de meseta de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en respuesta a CCK-8. Las células acinares se perfundieron conjuntamente con defostatín 100  $\mu\text{M}$  y CCK-8 1 nM en medio normal de calcio (1 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ). La curva es representativa de los trazados obtenidos en 6 experimentos independientes.

También investigamos si el efecto inhibitorio que el defostatín ejercía sobre el incremento de calcio inducido por CCK-8 era debido a una inhibición del acoplamiento entre el receptor de la CCK y la proteína G correspondiente o si tenía lugar en un paso posterior. Para ello utilizamos una combinación de NaF y AlCl<sub>3</sub> que conduce a la formación de AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>, un compuesto que activa varias proteínas G de forma no específica y que produce un incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> a través de proteínas G acopladas a la estimulación de la PLC (Shuttleworth, 1990). Como se observa en la Figura 41, la administración de AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> produjo oscilaciones de baja frecuencia en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en 15 células de las 22 estudiadas en 3 experimentos independientes. La adición posterior de defostatín al medio de perfusión inhibió el patrón oscilatorio iniciado por AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>, pero la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> permaneció elevada en comparación con el nivel basal. Esta inhibición fue muy rápida e irreversible, ya que la retirada del defostatín del medio de perfusión no consiguió que la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> retornara al patrón de oscilatorio iniciado por AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>.



**Figura 41:** Efecto del defostatín sobre las oscilaciones de calcio inducidas por AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>. Los acinos se perfundieron con NaF 10 mM + AlCl<sub>3</sub> 10 μM y posteriormente con defostatín 100 μM en medio normal de calcio (1 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>). La curva es representativa de los trazados obtenidos en 3 experimentos independientes.

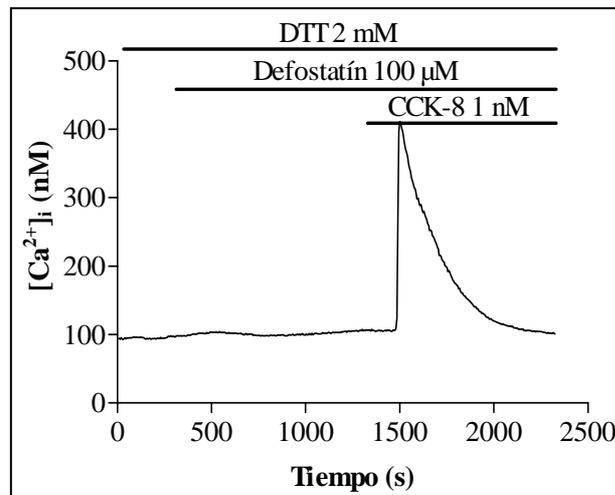
De manera similar a los resultados con PAO, la aplicación de defostatín a células acinares cuyos depósitos de calcio intracelulares habían sido previamente vaciados con taspigargina en medio libre de calcio fue todavía capaz de inducir liberación de calcio y consecuentemente se observó incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en todas las células estudiadas de 3 experimentos (Figura 42).



**Figura 42:** Efecto del vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio con tapsigargina sobre el incremento de calcio estimulado por defostatín. Los acinos se perfundieron con tapsigargina 0.5  $\mu\text{M}$  y posteriormente con defostatín en medio libre de calcio (0 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_0$  + 0.5 mM EGTA). La curva es representativa de los trazados obtenidos en 3 experimentos

independientes.

En la Figura 43 se muestra el efecto que el ditioneitol (DTT, un agente reductor de grupos sulfidrilos) sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Como se observa en la figura, la adición de 2 mM de DTT fue capaz de abolir completamente tanto el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por defostatín así como su efecto inhibitor sobre el aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  estimulado por CCK-8.



**Figura 43:** Efecto del ditioneitol (DTT) sobre la movilización de calcio en respuesta al defostatín y la CCK-8. Las células acinares se perfundieron con DTT 2 mM, defostatín 100  $\mu\text{M}$  y CCK-8 1 nM en medio normal de calcio (1 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_0$ ). La curva es representativa de los trazados obtenidos en 3 experimentos independientes.

Sin embargo, la aplicación de 10  $\mu\text{M}$  de genisteína (un inhibidor de tirosinas cinasas) no abolió, en nuestras condiciones experimentales, el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por defostatín, aunque lo redujo significativamente ( $155 \pm 12$  nM versus  $52 \pm 2$  nM,  $p < 0.01$ ), no teniendo efectos sobre la inhibición que el defostatín ejerce sobre la

movilización de calcio inducida por CCK-8. Puesto que tampoco pudimos ensayar dosis mayores de este inhibidor que nos permitieran corroborar o descartar un incremento en la fosforilación de residuos de tirosina acoplados a los efectos de este agente, no concluiremos nada sobre este posible mecanismo de acción.

#### **4.3.8. Efectos del defostatín sobre la secreción de amilasa.**

Al igual que con el vanadato y el PAO, estudiamos el efecto de diferentes concentraciones de defostatín tanto sobre la secreción de amilasa basal como sobre la estimulada por el secretagogo CCK-8. Los resultados se muestran en la Tabla VIII.

**Tabla VIII: Efecto del defostatín sobre la secreción de amilasa basal y estimulada por CCK-8.**

Tratamiento	Más Defostatín ( $\mu\text{M}$ )		
	10	100	
Basal	$4.81 \pm 0.3$	$4.04 \pm 0.2$	$5.73 \pm 0.4 \dagger$
CCK-8 320 pM	$26.88 \pm 0.4 \dagger$	$23.9 \pm 0.7 *$	$24.4 \pm 0.5 *$
DTT 2 mM	$4.3 \pm 0.2$	$4.24 \pm 0.4$	$5.01 \pm 0.5$
CCK-8 320 pM + DTT 2 mM	$27.5 \pm 1.2 \dagger$	$22.9 \pm 2.1 *$	$23.04 \pm 1.8 *$

La liberación de amilasa se expresa como porcentaje del contenido total de amilasa al comienzo de la incubación. Los resultados son la media  $\pm$  EEM de 6 experimentos.

$\dagger$  indica diferencias estadísticamente significativas respecto al correspondiente valor basal.

\* indica diferencias estadísticamente significativas respecto al valor obtenido con CCK-8 sola.

De forma similar a los experimentos con calcio, el defostatín provoca un ligero incremento en la secreción basal de amilasa a la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , además de inhibir la estimulación de la secreción de amilasa estimulada por 320 pM de CCK-8 (dosis de CCK-8 que produce el efecto máximo, Figura 6). Esta inhibición fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con las dos concentraciones de defostatín ensayadas. Por el contrario, el tratamiento con DTT, que tuvo un efecto bloqueante tanto en el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  estimulado por defostatín, como en el efecto inhibitor del defostatín sobre la respuesta de calcio inducida por CCK-8, no abolió los efectos del defostatín ni en la secreción de amilasa basal ni en la estimulada por CCK-8.

### 4.3.9. *Discusión sobre los efectos del defostatín.*

Nuestros resultados demuestran que el defostatín produce un incremento tanto en la  $[Ca^{2+}]_i$  como en la secreción de amilasa en las células acinares pancreáticas (Figura 37 y Tabla VIII). Nuestros datos también indican que este incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  se debe principalmente a la liberación de calcio desde depósitos intracelulares, ya que también se produce en medio libre de calcio extracelular y la administración de lantano, un inhibidor de la entrada de calcio desde el medio extracelular, no modifica la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figuras 38 y 39). Por otra parte, el defostatín reduce fuertemente la liberación de calcio inducida por CCK-8, resultado que se correlaciona con la inhibición que el defostatín ejerce sobre la secreción de amilasa estimulada por CCK-8 (Figura 37 y Tabla VIII).

En las células acinares pancreáticas, el efecto estimulador del defostatín sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  y su efecto inhibitor en la movilización de calcio inducida por agonistas podría deberse, al igual que ocurría con el vanadato, a un efecto directo sobre el proceso de liberación de calcio y no una consecuencia de la activación de la acción opuesta de la vía del calcio. Resultados similares se han observado en células humanas HeLa después de la adición de timerosal (un agente oxidante de grupos tioles) (Bootman y cols., 1992). Nuestros resultados de que el defostatín libera calcio desde depósitos intracelulares, sugieren que la falta de efecto de la CCK-8 para elevar la  $[Ca^{2+}]_i$  después del tratamiento con defostatín es en parte debida al vaciamiento parcial o total de los depósitos por este agente. En este contexto, es importante resaltar que el defostatín inhibe la señal de calcio generada por la activación de proteínas G (Figura 41), sugiriendo que, al menos, una parte del efecto inhibitor sobre la respuesta de calcio inducida por CCK tendría lugar en pasos posteriores a la activación de las proteínas G y no sobre el receptor de la CCK o sobre su unión con proteínas G. El depósito de calcio sensible a defostatín es mayor que el sensible a agonistas, como demuestra el hecho de que el defostatín todavía es capaz de movilizar calcio después del tratamiento con tapsigargina en medio libre de calcio (Figura 42).

Por otro lado, la coincubación de las células acinares pancreáticas con defostatín y CCK-8 potencia la fase de meseta de la respuesta de calcio a la CCK-8 sin modificar significativamente el pico máximo alcanzado con este secretagogo (Figura 40). Este efecto estimulador del defostatín sobre la fase de meseta en respuesta a la CCK-8 podría deberse a que bloquea los mecanismos de salida de calcio desde el citosol al exterior.

Ya hemos comentado anteriormente que los agentes oxidantes de grupos

sulfhidrilos son capaces de liberar calcio en diferentes tipos celulares, como células endoteliales (Fleming y cols., 1996), linfocitos T (Fletcher y cols., 1993), plaquetas (Hecker y cols., 1989), hepatocitos (Rooney y cols., 1991), huevos de hamster (Swann, 1991) y acinos pancreáticos (Thorn y cols., 1992). Sin embargo, no se conoce con exactitud sobre qué depósito intracelular de calcio ejercen su acción estos agentes oxidantes. En nuestras condiciones experimentales, los efectos del defostatín sobre la movilización del calcio son bloqueados en presencia de DTT (Figura 43), un agente reductor de grupos sulfhidrilos. Esto indica que el estado de oxidación de los grupos tioles de los canales de calcio y/o de las bombas asociadas a los almacenes intracelulares de calcio juegan un papel fundamental en su función normal. En las células acinares pancreáticas se ha demostrado que los picos de calcio inducidos por timerosal se bloquearon reversiblemente en presencia de DTT (Thorn y cols., 1992).

Por otra parte, el pretratamiento de los acinos pancreáticos con genisteína, un inhibidor de las proteínas tirosinas cinasas, disminuye la liberación de calcio inducida por defostatín, aunque, a diferencia del DTT, no modificó el efecto inhibitorio que el defostatín ejerce sobre el patrón movilizador de calcio inducido por la CCK-8 (Figura 44). Esto indica que es probable que un aumento en la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina sea también responsable del mecanismo de acción del defostatín, más cuando está descrito que este agente es un inhibidor específico de las proteínas tirosinas fosfatasas (Watanabe y cols., 1995).

Finalmente, nuestros datos de la acción del defostatín sobre la secreción enzimática indican que este agente provoca un incremento en la secreción basal de amilasa a la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , e inhibe la estimulación de la secreción de amilasa por agonistas que incrementan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Tabla VIII). Es probable que el efecto del defostatín se deba a su capacidad para incrementar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Si el defostatín vacía el calcio almacenado en los depósitos intracelulares, la inhibición ejercida por el defostatín sobre la secreción de amilasa estimulada por secretagogos que median su mecanismo de acción a través de la vía del calcio, podría deberse a una ruptura de la señal normal de calcio. Sin embargo, el DTT fue incapaz de bloquear los efectos del defostatín tanto sobre la secreción basal de amilasa como sobre la estimulada por CCK-8 (Tabla VIII). El defostatín podría, por tanto, tener múltiples sitios de acción y no podemos, con nuestros datos, excluir la posibilidad de que el defostatín pueda también actuar sobre alguno de los pasos finales del proceso de exocitosis.

En las Tablas IX y X se representan, de forma resumida, los efectos que el vanadato, PAO y defostatín ejercen sobre la movilización de la  $[Ca^{2+}]_i$  y la secreción de amilasa en acinos pancreáticos de rata. Nuestros resultados indican que los tres agentes estudiados provocan liberación de calcio fundamentalmente desde un depósito intracelular, ya que este incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  se observó en ausencia de calcio extracelular, y no se vió afectado por la inhibición de la entrada de calcio desde el medio extracelular con lantano.

**Tabla IX: Tabla resumen de los efectos de vanadato, PAO y defostatín sobre la  $[Ca^{2+}]_i$**

	Basal	+ CCK-8	+ DTT	+(CCK-8+DTT)	+ TPS
Vanadato	↑	↓ (↑)	=	↑	=
PAO	↑	↓	=	↑	↑
Defostatín	↑	↓ (↑)	=	↑	↑

↑ indica incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ .

↓ indica disminución en la  $[Ca^{2+}]_i$ .

= indica que no existen modificaciones.

**Tabla X: Tabla resumen de los efectos de vanadato, PAO y defostatín sobre la secreción de amilasa.**

	Basal	+ CCK-8	+ DTT	+(CCK-8+DTT)
Vanadato	↑	↓	↑	↓
PAO	↑	↓	=	↑
Defostatín	↑	↓	↑	↓

↑ indica incremento en la secreción de amilasa.

↓ indica disminución en la secreción de amilasa.

= indica que no existen modificaciones.

Adicionalmente, vanadato, PAO y defostatín también comparten un efecto inhibitorio sobre el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por un agonista clásico como es la CCK; aunque hay que destacar que la coincubación de vanadato o defostatín con CCK-8 mantiene elevada la  $[Ca^{2+}]_i$  estimulada por esta hormona.

Por otra parte, tanto el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  como el efecto inhibitorio que los tres agentes ejercen sobre la liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por CCK-8 fueron revertidos por el agente reductor de grupos sulfidrilos DTT, lo que indica que los efectos

observados son probablemente debidos a la capacidad oxidativa de grupos sulfidrilos de vanadato, PAO y defostatín.

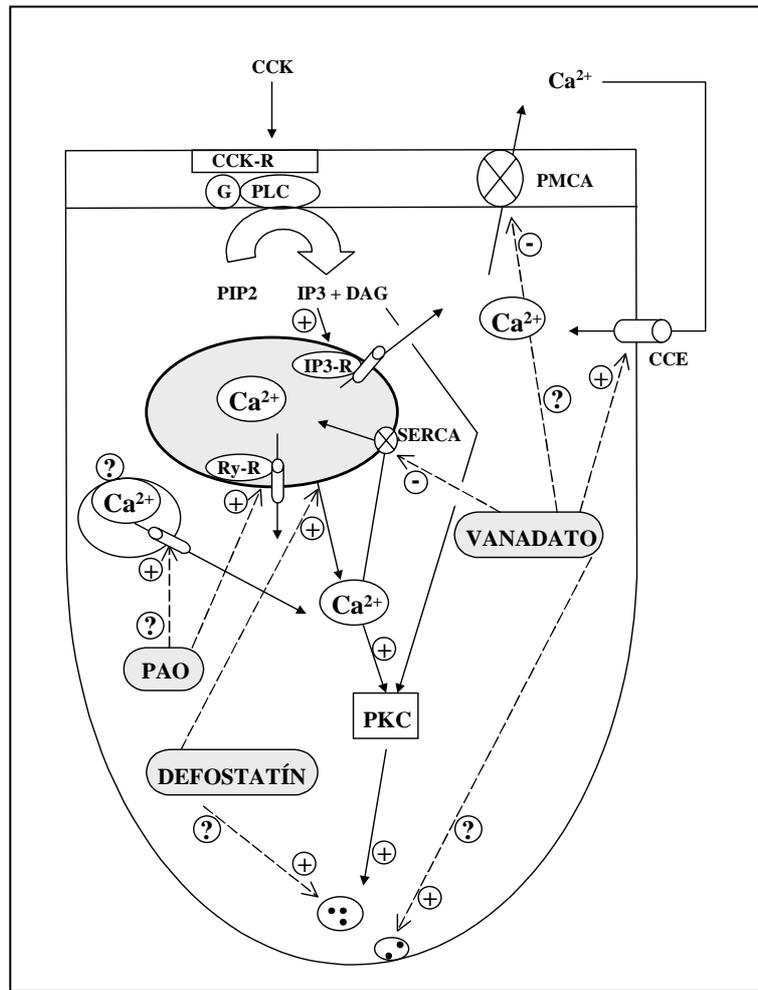
Los resultados obtenidos con vanadato, PAO y defostatín sobre la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  se correlacionan, al menos en la mayor parte, con los observados sobre la secreción de amilasa: aumento de la secreción basal e inhibición de la estimulada por CCK-8. Sin embargo, el DTT no fue capaz de revertir los efectos de vanadato y defostatín sobre la secreción de amilasa basal y la estimulada por CCK-8, lo que nos indica que, probablemente, ambos agentes puedan actuar alternativamente en un paso terminal de los mecanismos de exocitosis.

Aunque vanadato, PAO y defostatín comparten la capacidad de incrementar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , difieren en el depósito intracelular del que liberan el calcio. El depósito de calcio sensible a vanadato es similar al sensible a agonistas, como indican las observaciones de que el vanadato se muestra incapaz de aumentar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en acinos pancreáticos cuyos depósitos han sido previamente vaciados por el tratamiento con tapsigargina. Sin embargo, bajo estas condiciones experimentales, el PAO y el defostatín son todavía capaces de incrementar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , aunque este incremento fue significativamente reducido en presencia de rianodina, pero no se vió afectado por la administración de cafeína (un inhibidor de los receptores de IP3). Estos resultados sugieren que, al menos la mayor parte del depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible al PAO posee receptores de rianodina.

Tomando todos los resultados en conjunto, proponemos un modelo esquemático de los efectos que el vanadato, PAO y defostatín ejercen sobre los mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción en las células acinares pancreáticas de rata (Figura 44). El vanadato inhibe la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo (SERCA) encargada de la recarga del depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático. Alternativamente, y según apuntan nuestros resultados, no podemos descartar que este agente sea capaz de inhibir la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa localizada en la membrana plasmática (PMCA) que bombea  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el exterior celular. Además, el vanadato podría ser capaz de estimular la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior celular y los mecanismos de exocitosis de los procesos de secreción de enzimas digestivas, si bien esto último necesita de posteriores evidencias experimentales.

Por otra parte, el PAO induce liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, posiblemente provocando una apertura de canales sensibles a rianodina. Alternativamente, el PAO puede también liberar  $\text{Ca}^{2+}$  desde un depósito insensible a agonistas.

Finalmente, el defostatín libera calcio desde depósitos intracelulares tanto sensibles como insensibles a agonistas y posiblemente también puede actuar de una forma similar a como lo hace el vanadato, estimulando la exocitosis de los gránulos de secreción.



**Figura 44:** Modelo esquemático de los efectos del vanadato, PAO y defostatín en los mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción en el páncreas exocrino. CCE: entrada capacitativa de calcio. CCK-R: receptor de la CCK. DAG: diacilglicerol. G: Proteína G de membrana. IP3: Inositol trifosfato. IP3-R: receptor del IP3. PIP2: Fosfatidilinositol bifosfato. PKC: Proteína cinasa C. PLC: Fosfolipasa C. PMCA: Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de membrana plasmática. Ry-R: receptor de rianodina. SERCA: Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de retículo.



## ***5.- Conclusiones***



1.- Los factores de crecimiento no presentan efectos secretagogos en el páncreas exocrino de la rata.

2.- La activación directa de la actividad proteína tirosina cinasa asociada al receptor del bFGF tiene un papel modulador inhibitorio de la respuesta pancreática promovida por la CCK.

3.- La inhibición de la actividad de las proteínas tirosinas fosfatasas de las células pancreáticas promueve una movilización de calcio intracelular, que está generalmente asociada a un patrón secretor.



## ***6.- Referencias Bibliográficas***



- Adelson JW y Rothman SS. (1975) Chymodenin, a duodenal peptide: specific stimulation of chymotrypsinogen secretion. *Am J Physiol*; 229: 1680-1686.
- Akao S, Bockman DE, Lechene de la Porte P y Sarles H. (1986) Three dimensional pattern of ductuloacinar associations in normal and pathological human pancreas. *Gastroenterology*, 90: 661-668.
- Alcón S, Pozo MJ, Salido GM y Pariente JA. (1995) Histaminergic modulation of hormonal control in the exocrine guinea-pig pancreas. *Inflamm Res*; 44: 207-211.
- Alcón S, Rosado JA, García LJ, Pariente JA, Salido GM y Pozo MJ. (1996) Secretin potentiates guinea pig pancreatic response to cholecystokinin by a cholinergic mechanism. *Can J Physiol Pharmacol*; 74: 1342-1350.
- Anastasi A, Erspamer V y Enean R. (1968) Isolation and amino acid sequence of caerulein, the active decapeptide of the skin of *Hyla caerulea*. *Arch Biochem Biophys*; 125: 57-68.
- Ansah TA, Dho S y Case RM. (1986) Calcium concentration and amylase secretion in guinea pig pancreatic acini: interactions between carbachol, cholecystokinin octapeptide and the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Biochim Biophys Acta*; 889: 326-333.
- Argent BE, Smith RK y Case RM. (1976) The role of calcium in pancreatic enzyme and electrolyte secretion. En: "Stimulus-secretion coupling in the gastrointestinal tract". De. Case y Goebell. MYP, Londres. pp: 237-250.
- Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O. (1993) Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell*; 74: 237-244.
- Asselin J, Larose L y Morisset J. (1987) Short-term cholinergic desensitization of rat pancreatic secretory response. *Am J Physiol*; 252: G392-G397.
- Barnard JA, Lyons RM y Moses HL. (1990) The cell biology of TGF $\beta$ . *Biochim Biophys Acta*; 1032: 79-87.
- Bathey y Wada E. (1991) Two distinct receptors for mammalian bombesin-like peptides. *Trends Neurosci*; 14:524-527.
- Baur H, Kasperek S y Pfaff E. (1975) Criteria of viability of isolated liver cells. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem*; 356: 827-838.
- Bayerdorffer E, Eckhardt L, Haase W y Schulz I. (1985) Electrogenic calcium transport in plasma membrane of rat pancreatic acinar cells. *J Membr Biol*; 84: 45-60.
- Bellomo G, Mirabelli F, Richelmi P y Orrenius S. (1983) Critical role of sulfhydryl group(s) in ATP-dependent Ca<sup>2+</sup> sequestration by the plasma membrane fraction from rat liver. *FEBS Letters*; 163: 136-139.
- Berridge MJ. (1988) Inositol triphosphate-induced membrane potential oscillations in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*; 403: 589-599.
- Berridge MJ. (1990) Calcium oscillations. *J Biol Chem*; 265: 9583-9586.
- Berridge MJ, Cobbold PH y Cuthbertson KSR. (1988) Spatial and temporal aspects of cell signalling. *Philos Trans R Soc London Ser B*; 320: 325-343.
- Berridge MJ y Gallione A (1988) Cytosolic calcium oscillators. *FASEB J*; 2: 3074-3082.
- Berridge MJ e Irvine RF. (1984) Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*; 312: 315-321.
- Berridge MJ e Irvine RF. (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature London*, 341: 197-205.

- Berseth CL. (1987) Enhancement of intestinal growth in neonatal rats by epidermal growth factor in milk. *Am J Physiol*; 253: G662-G665.
- Biden TJ, Wollheim CB y Schlegel W. (1986) Inositol 1,4,5-triphosphate and calcium homeostasis in clonal pituitary cells (GH3). *J Biol Chem*; 261: 7223-7229.
- Birnbaumer L. (1990) G-proteins in signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 30: 675-705.
- Bissonette BM, Collen MJ, Adachi H, Jensen RT y Gardner JD. (1984) Receptor for vasoactive intestinal peptide and secretin on rat pancreatic acini. *AM J Physiol*, 246: G710-G717.
- Bissonette M, Kuhn D y De Lanerolle P. (1989) Purification and characterization of myosin light-chain kinase from the rat pancreas. *Biochem J*; 258: 739-747.
- Bloom W y Fawcett DW. (1981) Páncreas. En: *Tratado de histología*. Ed: Labor SA. pp 728-744.
- Bockman DE. (1993) Anatomy of the pancreas. En: *The pancreas: biology, pathobiology and disease*. Ed: Go VLW, Gardner JD, Brooks FP, Lebenthal E, Dimagno EP y Scheele E.. Raven Press, New York. pp 1-8.
- Boden G, Sivitz MC, Owen OE, Essa-Koumar N y Landor JH. (1975) Somatostatin suppresses secretin and pancreatic exocrine secretion. *Science*; 90: 163-164.
- Bolen JB. (1993) Nonreceptor tyrosine protein kinases. *Oncogene*; 8: 2025-2031.
- Bommelaer G, Rozental G, Bernier C, Vaysse N y Ribet A. (1981) Action of secretagogues on amylase release from dog pancreatic acini. *Digestion*; 21: 248-254.
- Bond GH y Hudgins PM. (1980) Inhibition of red cell Ca<sup>2+</sup>-ATPase by vanadate. *Biocim Biophys Acta*; 600: 781-790.
- Bonner TI, Young AC, Brann MR y Buckley NJ. (1988) Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron*; 1: 403-410.
- Bootman MP, Taylor CW y Berridge MJ. (1992) The thiol reagent, thimerosal, evokes calcium spikes in HeLa cells by sensitizing the inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *J Biol Chem*; 267: 25113-25119.
- Bos JL. (1995) A target for phosphoinositide 3-kinase: Akt/PKB. *Trends Biochem Sci*; 20: 441-442.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem*; 72: 248-254.
- Bragado MJ, Groblewski GE y Williams JA. (1997) p70<sup>S6k</sup> is activated by CCK in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*; 273: 101-109.
- Brannon PM, Demarest AS, Sabb JE y Korc M. (1986) Dietary modulation of EGF action in cultured pancreatic acinar cells of the rat. *J Nutr*; 116: 1306-1315.
- Brown JC, Harper AA y Scratcherd T. (1967) Potentiation of secretin stimulation of the pancreas. *J Physiol*; 190: 519-530.
- Bruzzo R. (1990) The molecular basis of enzyme secretion. *Gastroenterology*; 99: 1157-1176.
- Bruzzo R, Trimble ER, Gjinouci A y Renold AE. (1984) Glucose-insulin interactions on exocrine secretion from the perfused rat pancreas. *Gastroenterology*; 87: 1305-1312.

- Burnham DB, McChesney DJ, Thurston KC, Williams JA. (1984) Interaction of cholecystokinin and vasoactive intestinal polypeptide on function of mouse pancreatic acini in vitro. *J Physiol (Lond)*; 349: 475-482.
- Burnham DB, Soling H-D y Williams JA. (1988) Evaluation of myosin light chain phosphorylation in isolated pancreatic acini. *Am J Physiol*; 254: G130-G134.
- Burns KD, Homma T, Breyer MD y Harris MC. (1991) Cytosolic acidification stimulates a  $Ca^{2+}$  influx that activates  $Na^+/H^+$  exchange in LLC-PK1. *Am J Physiol*; 261: F617-F625.
- Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffè A y Comoglio PM. (1992) HGF is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol*; 119: 629-641.
- Camello C, Lajas AI, González A, Camello PJ y Pariente JA. (1997) Histamine does not potentiate cyclic AMP-mediated amylase secretion in the guinea-pig pancreatic acinar cells. *Gen Pharmac*; 29: 211-215.
- Camello PJ y Salido GM. (1993) Inhibitory interactions between stimulus-secretion pathways in the exocrine rat pancreas. *Biochem Pharmacol*; 46: 1005-1009.
- Camello PJ, Wisdom D, Singh J, Francis LP y Salido GM. (1993) Effect of phorbol ester on vagal stimulation and acetylcholine-evoked exocrine pancreatic secretion and cytosolic free calcium in the rat. *Arch Int Physiol Biochim Biophys*; 101: 133-139.
- Campbell GS, Pang L, Miyasaka T, Saltiel AR y Carter-Su C. (1992) Stimulation by growth hormone of MAP kinase activity in 3T3-F442A fibroblasts. *J Biol Chem*; 267: 6074-6080.
- Canalis E, Varghese S, McCarthy TL y Centrella M. (1992) Role of platelet-derived growth factor in bone cells function. *Growth Regul*; 2: 151-155.
- Carpenter G y Cohen S. (1990) Epidermal growth factor. *J Biol Chem*; 265: 7709-7712.
- Carpenter G y Wahl MI. (1991) The epidermal growth factor family. En: Sporn MB, Roberts AB, eds. *Peptide growth factors and their receptors I*. New York: Springer-Verlag; 69-171.
- Carter-Su C, Schwartz J y Smit LS. (1996) Molecular mechanism of growth hormone action. *Ann Rev Physiol*; 58: 187-207.
- Case RM. (1978) Synthesis, intracellular transport and discharge of exportable proteins in the pancreatic acinar cell and other cells. *Biol Rev*, 53: 211-354.
- Case RM y Argent BE. (1989) Pancreatic secretion of electrolytes and water. En: *Handbook of Physiology. Section 6: The gastrointestinal system. Vol III. Salivary, gastric, pancreatic and hepatobiliary secretion*. Ed: Schulz, Forte y Rauner. American Physiological Society, Bethesda, Maryland. pp: 383-417.
- Case RM y Argent BE. (1993) Pancreatic duct cell secretion. Control and mechanism of transport. En: *The pancreas: biology, pathobiology and disease*. Ed: Go VLW. Raven Press, New York. pp 301-350.
- Challacombe DN y Wheeler EE. (1991) Trophic action of epidermal growth factor on human duodenal mucosa cultured *in vitro*. *Gut*; 32: 991-993.
- Chance B. (1965) The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. *J Biol Chem*; 240: 2729-2748.
- Chandler WK, Rakowski RF y Schneider MF. (1976) A non-linear voltage-dependent charge movement in frog skeletal muscle. *J Physiol*; 254: 245-283.
- Chandrasekar B y Korc M. (1991) Basic fibroblast growth factor is a calcium-mobilizing secretagogue in rat pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Com*; 177: 166-170.

- Chariot J, Roze C y Vaille C. (1979) Effects de la cimétidine sur la sécrétion pancréatique externe chez le rat. *Thérapie*; 34: 367-376.
- Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang ML-S, Anderson JK, Mole JE, Lucas R y Massagué J. (1987) The transforming growth factor  $\beta$  system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell*; 48: 409-415.
- Chen H-C y Guan J-L. (1994) Stimulation of phosphatidylinositol 3'-kinase association with focal adhesion kinase by platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem*; 269: 31229-31233.
- Chey WY (1993) Hormonal control of pancreatic exocrine secretion. En: *The exocrine pancreas: biology, pathobiology and diseases*. Ed: Go VLW, Gardner JD, Brooks FP, Lebenthal E, Dimagno EP y Scheele E. Raven Press. New York. pp:301-313.
- Chiquet-Ehrismann R, Kalla P y Pearson CA. (1989) Participation of tenascin and TGF $\beta$  in reciprocal epithelial-mesenchymal interactions of MCF7 cells and fibroblasts. *Cancer Res*; 49: 4322-4325.
- Clapham DE. (1993) A mysterious new influx factor?. *Nature London* 364: 763-764.
- Code CF. (1982) En: *Pharmacology of histamine receptors*. Eds: Ganellin CRy Parsons ME. Wrigly PSG. Bristol. pp 217-235.
- Cohen P. (1985) The role of protein phosphorylation in the humoral control of enzyme activity. *Eur J Biochem*, 151: 439-448.
- Cohen S. (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem*; 237: 1155-1162.
- Colbran RJ, Schworer CM, Hashimoto Y, Fong Y-L, Rich DP, Smith MK y Soderling TR. (1989) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J*; 258:313-325.
- Conway BR, Laychock SG y Rubim RP. (1991) Comparative effects of epidermal growth factor and carbachol on phosphoinositide synthesis and breakdown in pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 178: 780-785.
- Coso OA, Chiariello M, Kalinec G, Kyriakis JM, Woodgett J y Gutkind JS. (1995) Transforming G protein-coupled receptors potently activate JNK(SAPK). Evidence for a divergence from the tyrosine kinase signalling pathway. *J Biol Chem*; 270: 5620-5624.
- Coughlin SR, Barr PJ, Cousens LS, Fretto LJ y Williams LT. (1988) Acidic and basic fibroblast growth factors stimulate tyrosine kinase activity in vivo. *J Biol Chem*; 263: 988-993.
- Countaway JL, Nairn AC y Davis RJ. (1992) Mechanisms of desensitization of the epidermal growth factor receptor protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem*; 267: 1129-1140.
- Cox ME, Ely CM, Catling AD, Weber MJ y Parsons SJ. (1996) Tyrosine kinases are required for catecholamine secretion and mitogen-activated protein kinase activation in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem*; 66: 1103-1112.
- Cross D y Cambier JC. (1990) TGF $\beta$  has differential effects on B cell proliferation and activation antigen expression. *J Immunol*; 144: 432-439.
- Dagorn JC, La Bella A, Lahaie RG y Sarles H. (1984) Modifications in pancreatic enzyme proportions following secretory stimulations. *Digestion*; 29: 152-157.
- Dallas Via L, Stimamiglio M, Scapin M, Cesaro L y Deana R. (1996) Correlation between cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration, protein phosphorylation and platelet secretion. *Cell Calcium*; 20: 431-440.
- Daughada WH. (1990) The possible autocrine/paracrine and endocrine roles of IGFs of human tumors. *Endocrinology*; 127: 1-4.

- Debas HT y Yamagishi Y. (1978) Evidence for pyloropancreatic reflex for pancreatic exocrine secretion. *Am J Physiol*; 234: E468-E471.
- De Dios I, Arranz A y López MA. (1986) The effect of hypothermia on exocrine pancreatic secretion in rabbits. *Comp Biochem Physiol A*; 83: 677-681.
- De Dios I, Calvo JJ, San Roman JI, Plaza MA, Lopez MA (1987) Effect of isoproterenol on exocrine pancreatic secretion in the rabbit. *Med Sci Res*; 15: 979
- Dehaye J-P, Winand J, Poloczek P y Christophe J. (1984) Characterization of muscarinic cholinergic receptors on rat pancreatic acini by N-[<sup>3</sup>H]methylscopolamine binding. *J Biol Chem*; 259: 294-300.
- Dell KR y Williams LT. (1992) A novel form of FGF receptor 2. Alternative splicing of the third immunoglobulin-like domain confers ligand binding specificity. *J Biol Chem*; 267: 21225-21229.
- Dembinski A, Gregory H, Konturek SJ y Polanski M. (1982) Trophic action of epidermal growth factor on the pancreas and gastroduodenal mucosa in rats. *J Physiol (Lond)*; 325: 35-42.
- Di Renzo MF, Narsimhan RP, Olivero M, Bretti S, Giordano S, Medico E, Gaglia P, Zara P y Comoglio PM. (1991) Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. *Oncogene*; 6: 1997-2003.
- Di Salvo J, Semenchuk LA y Lauer J. (1993) Vanadate-induced contraction of smooth muscle and enhanced protein tyrosine phosphorylation. *Arch Biochem Biophys*; 304: 386-391.
- Dockray GJ. (1987) Physiology of enteric neuropeptides. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Ed: Johnson. Raven Press, New York. pp 41-66.
- Dormer RL y Williams JA. (1981) Secretagogue-induced changes in subcellular Ca<sup>2+</sup> distribution in isolated pancreatic acini. *Am J Physiol*; 240: G130-G140.
- Douglas WW. (1968) Stimulus-secretion coupling: The concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol*; 34: 451-474.
- Douglas WW y Rubin RP. (1961) The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol*; 159: 40.
- Duan R-D, Wagner ACC, Yule D y Williams JA. (1994) Multiple inhibitory effects of genistein on stimulus-secretion coupling in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*; 266: G303-G310.
- Duan R-D y Williams JA. (1994) Cholecystokinin rapidly activates mitogen-activated protein kinase in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*; 267: 401-408.
- Duan R-D, Zheng C-F, Guan K-L y Williams JA. (1995) Activation of MAP kinase kinase (MEK) and Ras by cholecystokinin in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*; 268: 1060-1065.
- Ebashi S. (1991) Excitation-contraction coupling and the mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Physiol*; 53: 1-16.
- Ederveen AGH, Van Der Leest JVM, Van Emst-De Vries SE, De Pont JJHM. (1989) Phosphorylation of low molecular mass cytosolic proteins by protein kinase C and protein kinase A in the rabbit exocrine pancreas. *Eur J Biochem*; 185: 461-468.
- Erspamer V, Improta G y Melchiorri P. (1974) Evidence of cholecystokinin in release by bombesin in the dog. *Br. J. Pharmacol.*; 52: 227-232.
- Favero TG, Zable Ac y Abramson JJ. (1995) Hydrogen peroxide stimulates the Ca<sup>2+</sup> release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*; 270: 25557-25563.

- Feick P, Gilhaus S y Schulz I. (1998) Pervanadate stimulates amylase release and protein tyrosine phosphorylation of paxillin and p125FAK in differentiated AR42J pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*; 273: 16366-16373.
- Ferris CD, Haganir RL, Brecht DS y Cameron AM. (1991) Inositol triphosphate receptor: phosphorylation by protein kinase C and calcium calmodulin-dependent protein kinases in reconstituted lipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88: 2232-2235.
- Ferris CD, Haganir RL, Supattapone S y Snyder SH. (1989) Purified inositol 1,4,5-triphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles. *Nature London* 342: 87-89.
- Flaumenhaft R, Abe M, Mignatti P y Rifkin DB. (1992) Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor beta in endothelial cells: regulation of plasminogen activator activity. *J Cell Biol*; 118: 901-909.
- Fleming I, Bara AT y Busse R. (1996) Calcium signalling and autacoid production in endothelial cells are modulated by changes in tyrosine and phosphatase activity. *J Vasc Res*; 33: 225-234.
- Fletcher MC, Samelson LE y June CH. (1993) Complex effects of phenylarsine oxide in T cells. Induction of tyrosine phosphorylation and calcium mobilization independent of CD45 expression. *J Biol Cell*; 268: 23697-23703.
- Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A, Wada K, Maeda M y Mikoshiba K. (1989) Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-triphosphate-binding protein P400. *Nature* 342: 32-38.
- García AG, Jurkiewicz A y Jurkiewicz NH. (1981) Contractile effect of vanadate and other vanadium compounds on the rat vas deferens. *Eur J Pharmacol*; 70: 17-23.
- García LJ. (1989) Péptidos de tipo secretínico y función exocrina del páncreas en conejo anestesiado: influencia de la acidificación y de la alcalinización duodenal. Tesis Doctoral Ed. Universidad de Salamanca.
- Gardner JD y Jackson MJ. (1977) Regulation of amylase released from dispersed pancreatic acinar cells. *J Physiol*; 270: 439-454.
- Gardner JD y Jensen RT. (1987) Secretagogue receptors on pancreatic acinar cells. En: "Physiology of the gastrointestinal tract" Ed. Johnson. Raven Press, New York. pp: 1109-1127.
- Gardner JD, Korman LY, Walker MD y Sutliff VE. (1982) Effects of inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase on the actions of vasointestinal peptide and secretin on pancreatic acini. *Am J Physiol*; 242: G547-G551.
- Gardner JD y Rottman AJ. (1979) Action of cholera toxin on dispersed acini from guinea pig pancreas. *Biochim Biophys Acta* 585: 250-265.
- Gardner JD, Sutliff VE, Walker MD y Jensen RT. (1983) Effects of inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase on actions of cholecystokinin, bombesin, and carbachol on pancreatic acini. *Am J Physiol*; 245:G676-G680.
- Geiser AG, Burmester JK, Webbink R, Roberts AB y Sporn MB. (1992) Inhibition of growth by transforming growth factor  $\beta$  following fusion of two nonresponsive human carcinoma cell lines. Implication of the type II receptor in growth inhibitor responses. *J Biol Chem*; 267: 2588-2593.
- Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Belan PV y Petersen OH. (1996) Inositol triphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of  $Ca^{2+}$  from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell*; 84: 473-480.

- Giannini G, Clementi E, Ceci R, Marziali G y Sorrentino V. (1992) Expression of a ryanodine receptor-Ca<sup>2+</sup> channel that is regulated by TGF-beta. *Science*; 257: 91-94.
- Gill DL, Ghosh TK y Mullaney JM. (1989) Calcium signalling mechanisms in endoplasmic reticulum activated by inositol 1,4,5-triphosphate and GTP. *Cell Calcium* 10: 363-374.
- Girault J-A. (1994) Protein kinases and phosphatases. *Neurotransmissions*; 10: 1-5.
- Githens S (1988) The pancreatic duct cell: proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation and culture. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 7: 486-506.
- Givol D y Yayon A. (1992) Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J*; 6: 3362-3369.
- González A, Camello PJ, Pariente JA y Salido GM. (1996) Stimulus-secretion pathway for histamine in the exocrine pancreas. *Biogenic Amines*; 12: 343-352.
- González A, Camello PJ, Pariente JA y Salido GM. (1997a) Free cytosolic calcium levels modify intracellular pH in rat pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Com*; 230: 652-656.
- González A, Pariente JA, Salido GM y Camello PJ. (1997b) Intracellular pH and calcium signalling in rat pancreatic acinar cells. *Pfügers Arch*; 434: 609-614.
- González A, Pozo MJ, Camello PJ, Salido GM y Pariente JA. (1993) Effects of phorbol esters and secretin on acetylcholine-evoked exocrine pancreatic secretion in the anaesthetized rat. *Pharmacol Commun*; 3: 263-273.
- Goodlad RA, Raja KB, Peters TJ y Wright NA. (1991) Effects of urogastrone-epidermal growth factor on intestinal brush border enzymes and mitotic activity. *Gut*; 32: 994-998.
- Gorelick FS, Cohn JA, Freedman SD, Dalahunt NG, Gershoni JM y Jamieson JD. (1983) Calmodulin-stimulated protein kinase activity from rat pancreas. *J Cell Biol*; 97: 1294-1298.
- Gorelick FS y Jamieson JD. (1987) The pancreatic acinar cell: Structure-function relationship. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*, Second edition. Ed: Johnson LR. Raven Press, New York, pp 1089-1109.
- Gorin Y, Leseney AM, Ohayon R, Dupuy C, Pommier J, Virion A y Deme D. (1997) Regulation of the thyroid NADPH-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generator by Ca<sup>2+</sup>: studies with phenylarsine oxide in thyroid plasma membrane. *Biochem J*; 321: 383-388.
- Graham MF, Bryson GR y Diegelmann RF. (1990) TGFβ1 selectively augments collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology*; 90: 447-453.
- Gregory H. (1975) Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature*; 257: 325-327.
- Grossman MI. (1977) Physiological effects of gastrointestinal hormones. *Fed Proc*; 36: 1930-1932.
- Gryniewicz G, Poenie M y Tsien RY. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Cell Biol*; 260: 3440-3450.
- Gukovskaya A y Pandol S. (1994) Nitric oxide production regulates cGMP formation and calcium influx in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*; 266: G350-G356.
- Gutkind JS, Crespo P, Xu N, Teramoto H y Coso OA. (1997) The pathway connecting m2 receptors to the nucleus involves small GTP-binding proteins acting on divergent MAP kinase cascades. *Life Sci*; 60: 999-1006.
- Hanks SK y Quinn AM. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods enzymol*; 200: 38-62.

- Hanks SK, Quinn AM y Hunter T (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*; 241: 42-52.
- Hanssen LE, Hanssen KF y Myren J. (1977) Inhibition of secretin release and pancreatic bicarbonate secretion by somatostatin infusion in man. *Scand. J. Gastroenterol.*; 12: 391-394.
- Hardie DG. (1991) Cell surface receptors. Signal transduction. En: *Biochemical messengers: hormones, neurotransmitters and growth factors*. Ed. Hardie DG. Chapman y Hall. London. pp 147-187.
- Hebel R y Stromberg MW. (1976) Digestive system. En: *Anatomy of the laboratory rat*. Eds: Williams y Wilkins. Baltimore. pp 43-52.
- Hecker M, Brune B, Decker K y Ullrich V. (1989) The sulfhydryl reagent thimerosal elicits human platelets aggregation by mobilization of intracellular calcium and secondary prostaglandin endoperoxide formation. *Biochem Biophys Res Commun*; 159: 961-968.
- Heldin CH. (1992) Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. *EMBO J*; 11: 4251-4259.
- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A y Karin M. (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *J Biol Chem*; 7: 2135-2148.
- Hickson JCD. (1970) The secretion of pancreatic juice in response to stimulation of the vagus nerves in the pig. *J Physiol*; 206: 275-279.
- Hill TD, Dean NM y Boynton AL. (1988) Inositol 1,3,4,5-Tetrakisphosphate induces  $Ca^{2+}$  sequestration in rat liver cells. *Sciences*; 242:1176-1178.
- Hirohata Y, Ogami Y, Akiyama T, Shibuya I y Otsuki M. (1998) Stimulatory effects of vanadate on amylase release from isolated rat pancreatic acini. *Biochem Pharmacol*; 55: 677-685.
- Hokfelt T, Kellerth JO, Ljungdahl A, Nilsson G , Nygard A y Pernow B. (1977) Immunohistochemical localization of substance P in the central and peripheral nervous systems. En: *Neuroregulators and Psychiatric disorders*. Eds: Usdin, Hamburg, Barchas. Oxford: Oxford University Press. pp 299-311.
- Hokin LE. (1966) Effects of calcium omission on acetylcholine-stimulated amylase secretion and phospholipid synthesis in pigeon pancreas slices. *Biochim Biophys Acta* 115: 219-221.
- Hokin LE y Dixon JF. (1990) Evidence for direct phosphodiesteratic cleavage of phosphatidylinositol in pancreatic minilobules stimulated with carbachol. En: "The biology and medicine of signal transduction". Ed. Nishizuka. Raven Press, New York, pp: 140-146.
- Hokin LE , Dixon JF, Reichman M y Sekar MC. (1987) Biochemical aspect of the phosphoinositide signalling system with special emphasis on the inositol cyclic phosphates and arachidonate. En: "Mechanisms of signal transduction by hormones and growth factors". Ed. Alan R. Liss. pp: 149-158.
- Hootman SR y Williams JA. (1987) Stimulus-secretion coupling in the pancreatic acinus. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*, 2ª edición. Ed: Johnson. Raven Press. New York. pp 1129-1146.
- Hoshi H y Logsdon CD. (1993) Direct trophic effects of fibroblast growth factors on rat pancreatic acinar cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*; 196: 1202-1207.
- Hou W, Arita Y y Morisset J. (1996a) Caerulein-stimulated arachidonic acid release in rat pancreatic acini: a diacylglycerol lipase affair. *Am J Physiol*; 271: G1735-1742.

- Hou W, Arita Y y Morisset J. (1996b) Basic fibroblast growth factor-stimulated arachidonic acid release in rat pancreatic acini: sequential action of tyrosine kinase, phospholipase C, protein kinase C and diacylglycerol lipase. *Cell Signal*; 8: 487-496.
- Howe PH, Bascom CC, Cunningham MR y Leof EB. (1989) Regulation of TGF $\beta$ 1 action by multiple transducing pathways: evidence for both G protein-dependent and -independent signaling. *Cancer Res*; 49: 6024-6031.
- Huang S, Trujillo JM y Chakrabarty S. (1992) Proliferation of human colon cancer cells: role of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *Int J Cancer*; 52: 978-986.
- Huang SC, Yu D-H, Wank SA, Mantey S, Gardner JD y Jensen RT. (1989) Importance of sulfation of gastrin or cholecystokinin (CCK) on affinity for gastrin and CCK receptors. *Peptides*; 10: 785-789.
- Hughes AR, Bird GSJ, Obie JF, Thastrup O y Putney JWJr. (1991) Role of inositol (1,4,5) trisphosphate in epidermal growth factor-induced Ca $^{2+}$  signaling in A431 cells. *Mol Pharmacol*; 40: 254-262.
- Hwang J, Bragado MJ, Duan RD y Williams, JA. (1996) Protein phosphatase inhibitors potentiate Ca $^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II activity in rat pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 225: 520-524.
- Imoto M, Kakeya H, Sawa T, Hayashi C, Hamada M, Takeuchi T y Umezawa K. (1993) Dephostat, a novel protein tyrosine phosphatase inhibitor produced by *Streptomyces*. I. Taxonomy, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)*; 46: 1342-1346.
- Irvine RF. (1992) Inositol phosphates and Ca $^{2+}$  entry: toward a proliferation or a simplification?. *FASEB J*; 6: 3085-3091.
- Jaken S. (1989) Diacylglycerol: the role of stimulated production in activation of PK-C. En: "Inositol lipids in cell signalling". Ed. Academic Press. pp: 163-178.
- Jaworek J y Konturek SJ. (1990) Distribution, release and secretory activity of epidermal growth factor in the pancreas. *Int J Pancreatol*; 6: 189-205.
- Jaworek J, Konturek SJ, Bielenaski W y Hladij M. (1992) Release and binding of epidermal growth factor in the pancreas of rats. *Int J Pancreatol*; 11: 9-17.
- Jena BP, Padfield PJ, Ingebritsen TS y Jamieson JD. (1991) Protein tyrosine phosphatase stimulates Ca $^{++}$ -dependent amylase secretion from pancreatic acini. *J Biol Chem*; 266: 17744-17746.
- Jennings LJ, Salido GM, Pariente JA, Davison JS, Singh J y Sharkey KA. (1996) Control of exocrine secretion in the guinea-pig pancreas by histamine H $_3$  receptors. *Can J Physiol Pharmacol*; 74: 744-752.
- Jensen RT. (1994) Receptors on pancreatic acinar cells. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3 $^a$  edición. Ed: Johnson. Raven Press. New York. pp 1377-1446.
- Jensen RT y Gardner JD. (1978) Cyclic nucleotide-dependent protein kinase activity in acinar cells from guinea pig pancreas. *Gastroenterology*; 75: 806-817.
- Jensen RT y Gardner JD. (1981) Identification and characterization of receptors for secretagogues on pancreatic acinar cells. *Fed Procs*, 40: 2486-2496.
- Jensen RT, Lemp GF y Gardner JD. (1980) Interaction of cholecystokinin with specific membrane receptors on pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 77: 2079-2083.
- Jensen RT, Lemp GF y Gardner JD. (1982) Interaction of COOH-terminal fragments of cholecystokinin with receptors on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem*; 257:

5554-5559.

Jensen RT, Tatemoto K, Mutt V, Lemp GF y Gardner JD. (1981) Actions of a newly isolated intestinal peptide PHI on pancreatic acini. *Am J Physiol*; 241: 498-502.

Jensen RT, Wank SA, Rowley WH, Sato S y Gardner JD. (1989) Interactions of cholecystokinin with pancreatic acinar cells: a well studied model of a peripheral action of CCK. *Trends Pharmacol Sci*; 10: 418-423.

Johnson CL. (1982) En: *Pharmacology of histamine receptors*. Ed: Ganellin R y Parsons M. Wright y Sons. London, pp 146-216.

Jorpes JE y Mutt V. (1962) The gastrointestinal hormones secretin and cholecystokinin. En: "The exocrine pancreas" 6 Ed: Reuck AVS y Cameron MP. Ciba Found Symp., Churchill, London. pp. 150-164.

Joseph SK y Williamson JR. (1986) Characteristics of inositol triphosphate-mediated Ca<sup>2+</sup> release from permeabilized hepatocytes. *J Biol Chem*; 261: 14658-14664.

Juma LMO, Singh J, Pallot DJ, Salido GM y Adegate E. (1997) Interactions of islet hormones with acetylcholine in the isolated rat pancreas. *Peptides* 18: 1415-1422.

Kanishi Y, Kaku K, Inoue Y y Kaneko T. (1990) An in vitro evaluation of adrenergic action on rat pancreatic amylase secretion: lack of stimulatory effect. *Endocrinol Japan*; 37: 511-519.

Kanner SB, Reynolds AB, Vines RR y Parsons JT. (1990) Monoclonal antibodies to tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*; 87: 3328-3332.

Kanno T y Saito A. (1976) The potentiating influences of insulin on pancreozymin-induced hyperpolarization and amylase release in the pancreatic acinar cell. *J. Physiol.*; 261: 505-521.

Kapoor CL y Krishna G. (1978) A possible role for guanosine 3',5'-monophosphate in stimulus-secretion coupling in exocrine pancreas. *Biochim Biophys Acta* 544: 102-112.

Kaziro Y. (1990) Molecular biology of G-protein. En: "G-proteins as mediators of cellular signalling processes. Molecular pharmacology of cell regulation". Vol 1. Ed. Houslay y Milligan. John Wiley & Sons, Chichester. pp: 47-66.

Kern HF. (1986) Fine structure of the human exocrine pancreas. En: *The exocrine pancreas: biology, pathobiology and diseases*. Ed: Go VLW. Raven Press, New York. pp 9-19.

Kinoshita FA, Ueno Y, Miwa M, Nishino M e Inoue H. (1996) Protein tyrosine kinase inhibitors promote amylase secretion and inhibit ornithine decarboxylase induction in sialagogue-stimulated rat parotid explants. *Biochem Biophys Res Commun*; 223: 170-174.

Klee CB, Ni W-C, Draetta GF y Newton, DL. (1986) Different modes of interaction of calmodulin with its target enzymes. *J Cardiovasc Pharmacol*; 8: 52-56.

Klonowski-Stumpe H, Schreiber R, Grolik M, SchulzHU, Haussinger D y Niederau C. (1997) Effect of oxidative stress on cellular functions and cytosolic free calcium of rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*; 272: G1489-G1498.

Kong W, Koldovsky O y Rao RK. (1992) Appearance of exogenous epidermal growth factor in liver, bile, and intestinal lumen of suckling rats. *Gastroenterology*; 102: 661-667.

Konishi T, Takehara T, Tsuji T, Ohsato K, Matsumoto K y Nakamura T. (1991) Scatter factor from human embryonic lung fibroblasts is probably identical to HGF. *Biochem Biophys Res Commun*; 180: 765-773.

Konrad RJ, Dean RM, Young RA, Billings PC y Wolf BA. (1996) Glucose-induced tyrosine phosphorylation of p125 in beta cells and pancreatic islets. *J Biol Chem*; 271: 24179-24186.

- Konturek JW, Bielanski W, Konturek SJ, Bogdal J y Oleksy J. (1989) Distribution and release of epidermal growth factor in man. *Gut*; 30: 1194-1200.
- Konturek JW, Buesing M, Hopt UT, Stachura J, Becker HD y Konturek SJ. (1992) Secretion of protein and epidermal growth factor by transplanted human pancreas. *Int J Pancreatol*; 12: 23-29.
- Konturek PK, Brzozowski T, Konturek SJ y Dembinski A. (1990) Role of epidermal growth factor, prostaglandin, and sulfhydryls in stress-induced gastric lesions. *Gastroenterology*; 99: 1607-1615.
- Konturek SJ, Bilski J, Tasler J y Laskiewicz J. (1985) Gut hormones in stimulation of gastroduodenal alkaline secretion in conscious dogs. *Am J Physiol*; 248: G687-G691.
- Konturek SJ, Cieszkowski M, Jaworek J, Konturek J, Brzozowski T y Gregory H. (1984) Effects of epidermal growth factor on gastrointestinal secretions. *Am J Physiol*; 246: G580-G586.
- Konturek SJ, Krol R, Dembinski A y Wunsch E. (1976) Effect of motilin on pancreatic secretion. *Plugers Arch*; 364: 297-300.
- Korc M, Chandrasekar B y Shah GN. (1991) Differential binding and biological activities of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in human pancreatic cancer cell line. *Cancer Res*; 51: 6243-6249.
- Korc M, Chandrasekar B Yamanaka Y, Friess H, Buchler M y Begar HG. (1992) Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Clin Invest*; 90: 1352-1360.
- Korc M, Matrisian LM, Planck SR y Magun BE. (1983) Binding of epidermal growth factor in rat pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Commun*; 111: 1066-1073.
- Korman LY, Walker MD y Gardner JD. (1980) Action of theophylline on secretagogue-stimulated amylase release from dispersed pancreatic acini. *Am J Physiol*; 239: G324-G333.
- Krause E, Pfeiffer F, Schmid A y Schulz I. (1996) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium conducting nonselective cation current in mouse pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*; 271: 32523-32528.
- Kremmer TP, Bayerdorffer E, Will H y Schulz I. (1987) Anion dependence of  $Ca^{2+}$  transport and  $(Ca^{2+}/K^{+})$ -stimulated  $Mg^{2+}$ -dependent transport ATPase in rat pancreatic endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*; 262: 13758-13764.
- Kumada T, Nakashima S, Nakamura Y, Miyata H y Nozawa Y. (1996) Phenylarsine oxide (PAO)-mediated activation of phospholipase D in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: possible involvement of calcium and protein kinase C. *Immunobiology*; 195: 347-359.
- Kuno M y Gardner P. (1987) Ion channel activated by inositol 1,4,5-triphosphate in plasmalemma of human T-lymphocytes. *Nature London* 326: 301-304.
- Kwan CY, Takemura H, Obie JF, Thapstrup O y Putney JW. (1990) Effects of MeCh, thapsigargin, and  $La^{3+}$  on plasmalemmal and intracellular  $Ca^{2+}$  transport in lacrimal acinar cells. *Am J Physiol*; 258: C1006-C1015.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie E, Ahmad M, Avruch J y Woodgett J. (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*; 369: 156-160.
- Laiho M, Weis FMB y Massagué J. (1989) Concomitant loss of TGF $\beta$  receptor types I and II in TGF $\beta$ -resistant cell mutants implicates both receptor types in signal transduction. *J Biol*

Chem; 264: 2272-2278.

Lajas AI, Pariente JA y Salido GM. (1995) Histamine and the cAMP pathway in the guinea-pig pancreas. *Cellular Signalling*; 7: 57-60.

Langlois A y Morisset J. (1991) Effects of feeding, fasting and caerulein treatment on ornithine decarboxylase in rat pancreas. *Pancreas*; 6: 534-541.

Lankisch PG. (1980) Trophic effects of gastrointestinal hormones. *Clinics Gastroenterol*; 9: 773.

Layer P, Chan ATH, Go VLW, Zinsmeister AR y Dimagno EP. (1993) Cholinergic regulation of phase II interdigestive pancreatic secretion in humans. *Pancreas* 8: 181-188.

Le Cabec V y Marindonneau-Parini I. (1995) Complete and reversible inhibition of NADPH oxidase in human neutrophils by phenylarsine oxide at a step distal to membrane translocation of the enzyme subunits. *J Biol Chem*; 270: 2067-2073.

Lechleiter JD y Clapham DE. (1992) Spiral waves and intracellular calcium signalling. *J Physiol Lond*; 86: 123-128.

Lee DC, Rose TM, Webb NR y Todaro GJ. (1985) Cloning and sequence analysis of cDNA for rat transforming growth factor-alpha. *Nature*; 313: 489-491.

Lee KM, Toscas K y Villareal ML. (1993) Inhibition of bradykinin and thapsigargin-induced Ca<sup>2+</sup> entry by tyrosine kinase inhibitors. *J Biol Chem*; 268: 9945-9948.

Lee PC. (1979) Effect of CCK-octapeptide and secretin on amylase secretion in isolated rat pancreatic acinar cells. *Digestion*; 19: 6-14.

Leeman SE y Hammerchlag R. (1967) Stimulation of salivary secretion by a factor extracted from hypothalamic tissue. *Endocrinology*; 81: 803-810.

Levy D, Seigneuret M, Bluzat A y Rigaud JL. (1990) Evidence for proton countertransport by the reticulum sarcoplasmic Ca<sup>2+</sup>-ATPase during calcium transport in reconstituted proteoliposomes with low ionic permeability. *J Biol Chem*; 265: 19524-19534.

Lewin MJM, Bado A, Cherifi Y y Reyl-desmars F. (1992) The gastric H<sub>3</sub>-receptor: A review. *Yale J Biol Med*; 65: 607-611.

Li L, Hu JS y Olson EN. (1990) Different members of the jun protooncogene family exhibit distinct patterns of expression in response to type β transforming growth factor. *J Biol Chem*; 265: 1556-1562.

Li J y Pickart CM. (1995) Binding of phenylarsenoxide to Arg-tRNA protein transferase is independent of vicinal thiols. *Biochemistry*; 34: 15829-15837.fletcher

Liebow C y Franklin JE. (1982) Histamine stimulation of digestive enzyme secretion by in vitro rabbit pancreas. *Dig Dis Sci*; 27: 234-241.

Loffelholz K. (1989) Receptor regulation of choline phospholipid hydrolysis. *Biochem Pharmacol*; 38: 1543-1549.

Logsdon CD. (1986) Stimulation of pancreatic acinar cell growth by CCK, epidermal growth factor and insulin in vitro. *Am J Physiol*; 251: G487-G494.

Logsdon CD, Keyes L y Beauchamp RD. (1992) TGFβ1 inhibits pancreatic acinar cell growth. *Am J Physiol*; 262: G364-G368.

Logsdon CD y Williams JA. (1983a) Epidermal growth factor binding and biologic effects on mouse pancreatic acini. *Gastroenterology*; 85:339-345.

Logsdon CD y Williams JA. (1983b) Pancreatic acini in short-term culture: regulation by EGF,

- carbachol, insulin, and corticosterone. *Am J Physiol*; 244: G675-G682.
- Löser C y Fölsch UR. (1994) Epidermal growth factor fails to stimulate pancreatic growth and pancreatic polyamine metabolism in rats. *Z Gastroenterol*; 32: 216-220.
- Louie DS, Chen HT y Owyang C. (1988) Inhibition of exocrine pancreatic secretion by opiates is mediated by suppression of cholinergic transmission: characterization of receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*; 246: 132-136.
- Lund PK, Ulshen MH, Rountree DB, Selub SE y Buchan AM. (1990) Molecular biology of gastrointestinal peptides and growth factors: relevance to intestinal adaptation. *Digestion*; 46: 66-73.
- Lutz MP, Sutor SL, Abraham RT y Miller LJ. (1993) A role for cholecystokinin-stimulated protein tyrosine phosphorylation in regulated secretion by the pancreatic acinar cell. *J Biol Chem*; 268: 11119-11124.
- Mak DO y Foskett JK. (1997) Single-channel kinetics, inactivation, and spatial distribution of inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) receptors in xenopus oocyte nucleus. *J Gen Physiol*; 109: 571-587.
- Malarkey K, Belham CM, Paul A, Graham A, McLees A, Scott PH y Plevin R. (1995) The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem J*; 309: 361-375.
- Malgaroli A, Fesce R y Meldolesi J. (1990) Spontaneous [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> fluctuations in rat chromaffin cells do not require inositol 1,4,5-triphosphate elevations but are generated by a caffeine- and ryanodine-sensitive intracellular Ca<sup>2+</sup> store. *J Biol Chem*; 265: 3005-3008.
- Mangos JA, McSherry NR, Nousia-Arvanitakis S y Irwin K. (1973) Secretion and transductal fluxes of ions in exocrine glands of the mouse. *Am J Physiol*; 225: 18-24.
- Maniatis T, Fritsch EF y Sambrook J. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Segunda edición. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Margolis B, Rhee SG, Felder S, Mervic M, Lyall R, Levitzki A, Ullrich A, Zilberstein A y Schlessinger J. (1989) EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: a potential mechanism for EGF receptor signaling. *Cell*; 57: 1101-1107.
- Martin TFJ. (1989) Lipid hydrolysis by phosphoinositidase C: enzymology and regulation by receptors and guanine nucleotides. En: "Inositol lipids in cell signalling". Ed. Academic Press, pp: 81-112.
- Maruyama Y. (1990) Inhibitory effects of arachidonic acid on muscarinic current response in single pancreatic acinar cells of rat. *J Physiol*; 430: 471-482.
- Marx M, Gómez G, Lonovics J y Thompson JC. (1987) Cholecystokinin. En: *Gastrointestinal endocrinology*. Eds: Thompson JC, Greeley GH, Rayford PL, Towersend CM. Mc Graw-Hill, pp 213-222.
- Massagué J. (1985) TGF $\beta$  modulates the high-affinity receptors for EGF and TGF alpha. *J Cell Biol*; 100: 1508-1514.
- Massagué J. (1990) The transforming growth factor  $\beta$  family. *Annu Rev Cell Biol*; 6: 597-641.
- Massagué J. (1992) Receptors for the TGF $\beta$  family. *Cell*; 69: 1067-1070.
- Matozaki T, Goke B, Tsunoda Y, Rodriguez M, Martinez J y Williams JA. (1990) Two functionally distinct cholecystokinin receptors show different modes of action on Ca<sup>2+</sup> mobilization and phospholipid hydrolysis in isolated rat pancreatic acini. *J Biol Chem*; 265: 6247-6254.
- Matozaki T, Sakamoto C, Nago M, Nishizuki H y Baba S. (1988) G-protein stimulation of PI

- hydrolysis by CCK in isolated rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*; 255: E652-E659.
- Matozaki T y Williams JA. (1989) Multiple sources of 1,2-diacylglycerol in isolated rat pancreatic acini stimulated by cholecystokinin. *J Biol Chem*; 264: 14729-14734.
- Matsumoto K, Tajima H, Hamanoue M, Kohno S, Kinoshita T y Nakamura T. (1992) Identification and characterization of injurin, an inducer of expression of the gene for hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89: 3800-3804.
- Matsumoto T y Kanno T. (1984) Potentiation of cholecystokinin-induced exocrine secretion by either electrical stimulation of the vagus nerve or exogenous VIP administration in the guinea pig pancreas. *Peptides*; 5: 285-289.
- May RJ, Conlon TP, Erspamer V y Gardner JD. (1978) Actions of peptides isolated from amphibian skin on pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*; 235: 112-118.
- Mayer BJ, Ren R, Clarck KL y Baltimore D. (1993) A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell*; 73: 629-630.
- McCune BK, Prokop CA y Earp HS. (1990) Transient epidermal growth factor (EGF)-dependent suppression of EGF receptor autophosphorylation during internalization. *J Biol Chem*; 265: 9715-9721.
- McDonnell SE, Kerr LD y Matrisian LM. (1990) Epidermal growth factor stimulation of stromelysin mRNA in rat fibroblasts requires induction of proto-oncogenes c-fos and c-jun and activation of protein kinase C. *C Mol Cell Biol*; 10: 4284-4293.
- Meech RW y Thomas RC. (1980) Effect of measurecalcium chloride injections on the membranes potential and internal pH of snail neurones. *J Physiol Lond*; 298: 111-129.
- Meisenhelder J, Suh P, Rhee SG y Hunter T. (1989) Phospholipase C- $\gamma$  is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and vitro. *Cell*; 57: 1109-1122.
- Meldrum E, Parker PJ y Carozzi A. (1991) The PtdIns-PLc superfamily and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1092: 49-71.
- Ménard D, Arsenault P y Pothier P. (1988) Biologics effects of epidermal growth factor in human fetal jejunum. *Gastroenterology*; 94: 656-663.
- Menozi D, Sato S, Jensen RT y Gardner JD. (1989) Cyclic GMP does not inhibit protein kinase C-mediated enzyme secretion in rat pancreatic acini. *J Biol Chem*; 264: 995-999.
- Messmer B, Zimmerman FG y Lenz HJ. (1993) Regulation of exocrine pancreatic secretion by cerebral TRH and CGRP: role of VIP, muscarinic and adrenergic pathways. *Am J Physiol*; 264: G237-G242.
- Meucci O, Scorziello A, Avallone A, Florio T y Schettini G. (1995) Alpha 1B, but not alpha 1A, adrenoreceptor activates calcium influx through the stimulation of a tyrosine kinase/phosphotyrosine phosphatase pathway, following noradrenaline-induced emptying of IP3 sensitive calcium stores, in PC Cl3 rat thyroid cell line. *Biochem Biophys Res Commun*; 209: 630-638.
- Meyer JH. (1981) Control of pancreatic exocrine secretion . En: "Physiology of the gastrointestinal tract". Ed: Johnson LR. Raven Press, New York. pp: 821-829.
- Meyer T y Sryer L. (1988) Molecular model for receptor-stimulated calcium spiking. *Proc Natl Acad Sci USA*; 85: 5051-5055.
- Milutinovic S, Schulz I, Rosselin G y Fasold H. (1977) The interaction of pancreatic secretagogues with pancreatic plasma membranes. Symposium on hormonal receptors in digestive tract physiology. Ed. Royaumont, France, sep, pp: 22-24.

- Mitchell MD. (1987) Epidermal growth factor actions on arachidonic acid metabolism in human amnion cells. *Biochim Biophys Acta*; 928: 240-242.
- Mizuhira V, Nakamura H, Yotsomoto H y Namea T. (1972) An application of the electron probe x-ray microanalyser distribution in the gastric mucosal epithelium. *Proc. IVth International Congress of Histochemistry and Cytochemistry*, pp 275-276.
- Moolenaar WH. (1986) Effects of growth factors on intracellular pH regulation. *Ann Rev Physiol*; 48: 363-376.
- Morisset J, Larose L y Korc M. (1989) Epidermal growth factor inhibits rat pancreatic cell proliferation, causes acinar cell hypertrophy, and prevents caerulein-induced desensitization of amylase release. *Endocrinology*; 124: 2693-2698.
- Moscatelli D. (1992) Basic fibroblast growth factor (bFGF) dissociates rapidly from heparin sulfates but slowly from receptors. *J Biol Chem*; 267: 25803-25809.
- Muallem S. (1989) Calcium transport pathways of pancreatic acinar cells. *Annu Rev Physiol*; 51:83-105.
- Muallem S, Beeker TG, Pandol SJ. (1988) Role of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange and the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump in hormone-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from pancreatic acini. *J Membr Biol*; 102: 153-162.
- Muallem S, Khademazad M y Sachs G. (1990) The route of  $\text{Ca}^{2+}$  entry during reloading of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pool in the pancreatic acini. *J Biol Chem*; 265: 2011-2016.
- Muallem S y Loessberg PA. (1990) Intracellular pH-regulatory mechanisms in pancreatic acinar cells. II. Regulation of  $\text{H}^+$  and  $\text{HCO}_3^-$  transporters by  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing agonists. *J Biol Chem*; 265: 12813-12819.
- Muallem S, Pandol SJ y Beeker, TG. (1989) Modulation of agonist-stimulated calcium influx by extracellular pH in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*; 257: G917-924.
- Muallem S, Schoeffield MS, Pandol SJ y Sachs G. (1985) Inositol trisphosphate modification of ion transport in rough endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 82: 4433-4437.
- Mulholland MW y Debas HT. (1988) Central nervous system inhibition of pentagastrin-stimulated acid secretion by IGF II. *Life Sci*; 42: 2091-2096.
- Naccache PH, Faucher N, Caon AC y McColl SR. (1988) Propionic acid-induced calcium mobilization in human neutrophils. *J Cell Physiol*; 136: 118-124.
- Nahorski SR y Potter BVL. (1989) Molecular recognition of inositol polyphosphates by intracellular receptors and metabolic enzymes. *TIPS* 10: 139-144.
- Nairn AC, Bhagat B y Palfrey HC. (1985) Identification of calmodulin-dependent protein kinase III and its major  $M_r$  100.000 substrate in mammalian tissues. *Proc Natl Acad USA*; 82: 7939-7943.
- Nairn AC y Palfrey HC. (1987) Identification of the major  $M_r$  100.000 substrate for calmodulin dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. *J Biol Chem*; 262: 17299-17303.
- Nayler RA y Sparrow MP. (1983) Mechanism of vanadate-induced contractions of airways smooth muscle of the guinea pig. *Br J Pharmacol*; 80: 163-172.
- New BA y Yeoman LC. (1992) Identification of bFGF sensitivity and receptor and ligand expression in human tumor cell lines. *J Cell Physiol*; 150: 320-326.
- Nice EC, Fabri L, Whitehead RH, James R, Simpson RJ y Burgess AW. (1991) The major colonic cell mitogen extractable from colonic mucosa is an N terminal extended form of basic

FGF. *J Biol Chem*; 22: 14425-14430.

Nicotera P, Orrenius S, Nilsson T y Berggren PO. (1990) An inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive  $Ca^{2+}$  pool in liver nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87: 6858-6862.

Nigam SK y Blobel G. (1989) Cyclic AMP-dependent protein kinase in canine pancreatic rough endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*; 264: 16927-16932.

Nishizuka Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*; 308: 693-697.

Nishizuka Y (1992) Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614.

Noelting G y Bernfeld P.(1948) Sur les enzymes amylolytiques III. La bete-amylase: dosage d'activite controle de l'absence d'alpha-amylase. *Helv Chim Acta*; 31: 286-290.

O'Donohue TL, Charlton CG, Miller RL, Boden G y Jacobowitz DM. (1981) Identification, characterization and distribution of secretin immunoreactivity in rat and pig brain. *Proc Natl Acad Sci.USA*, 78: 5221.

Ohtsuki M y Massagué J. (1992) Evidence for the involvement of protein kinase activity in TGF $\beta$  signal transduction. *Mol Cell Biol*; 12: 261-265.

Okabayashi Y, Otsuki M, Nakamura T, Koide M, Hasegawa H, Okutani T y Kido Y. (1990) Regulatory effect of cholecystokinin on subsequent insulin binding to pancreatic acini. *Am J Physiol*; 258: 562-568.

Okada M, Nada S, Yamanashi Y, Yamamoto T, Nakagawa CSK. (1991) a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases. *J Biol Chem*; 266: 24249-24252.

Okamoto T, Asano T, Harada S, Ogata E y Nishimoto I. (1991) Regulation of transmembrane signal transduction of insuline-like growth factor II by competence type growth factors or viral ras p21. *J Biol Chem*; 266: 1085-1091.

Okita K, Karita M, Nakanishi N y Takemoto T. (1991) Role of epidermal growth factor in protection and repair of gastric mucosal injury. *J Clin Gastroenterol*; 13: S103-S108.

Olanrewaju H, Patel L y Seidel ER. (1992) Trophic action of local intraileal infusion of IGF I: polyamine dependence. *Am J Physiol*; 263: E282-E286.

O'Loughlin E, Chung M, Hollenberg M, Hayden L, Zahavi I y Gall G. (1985) Effect of epidermal growth factor on ontogeny of the gastrointestinal tract. *Am J Physiol*; 249: G674-G678.

Orchard CH, Houser SR, Kort AA, Bahinski A, Capogrossi MC y Lakatta EG. (1987) Acidosis facilitates spontaneous sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  release in rat myocardium. *J Gen Physiol*; 90: 145-165.

Osipchuk YV, Wakui M, Yule DI, Gallacher DV y Petersen OH. (1990) Cytoplasmic  $Ca^{2+}$  oscillations evoked by receptor stimulation, G-protein activation, internal application of inositol triphosphate or  $Ca^{2+}$ : simultaneous microfluorimetry and  $Ca^{2+}$ -dependent  $Cl^-$  current recording in single pancreatic acinar cells. *Embo J*; 9: 697-704.

Pan GZ, Collen MJ y Gardner JD. (1982) Action of cholera toxin on dispersed acini from rat pancreas. Post-receptor stimulation involving cyclic AMP and calcium. *Biochim Biophys Acta* 720: 338-345.

Pandiella A, Malgaroli A, Meldolesi J y Vicentini LM. (1987) EGF raises cytosolic  $Ca^{2+}$  in A431 and Swiss 3T3 cells by a dual mechanism. *Exp Cell Res*; 170: 175-185.

Pandol SJ, Hsu Y, Kondratenko NF, Schoeffield-Payne MS y Steinback JS. (1991) Dual

- pathway for agonist-stimulated arachidonic acid release in pancreatic acini: roles in secretion. *Am J Physiol*; 260: G423-G433.
- Pandol SJ y Schoeffield-Payne MS. (1987) The agonist-sensitive calcium pool in the pancreatic acinar cell. *J Biol Chem*; 262: 16963-16968.
- Pandol SJ y Schoeffield-Payne MS. (1990) Cyclic GMP mediates the agonist-stimulated increase in plasma membrane calcium entry in the pancreatic acinar cell. *J Biol Chem*; 265: 12846-12853.
- Pariante JA, Francis LP, Salido GM y Madrid JA. (1990a) Cimetidine increases the pancreatic response to histamine. *Agents Actions*; 30: 307-312.
- Pariante JA, Madrid JA y Salido GM. (1989) Histamine receptors in unstimulated exocrine secretion of the rabbit. *Agents Actions*; 28: 62-69.
- Pariante JA, Madrid JA y Salido GM. (1990b) Role of histamine receptors in rabbit pancreatic exocrine secretion stimulated by cholecystokinin and secretin. *Experimental Physiology*; 75: 657-667.
- Pariante JA, Singh J, Salido GM, Jennings L y Davison JS. (1991) Activación de histamine receptors is associated with amylase secretion and calcium mobilization in guinea-pig pancreatic acinar cells. *Cell Physiol Biochem*; 1: 111-120.
- Pearson GT, Singh J y Petersen OH. (1984) Adrenergic nervous control of cyclic-AMP-mediated amylase secretion in the rat. *Am J Physiol*; 246: G563-G573.
- Peikin SR, Rottman AJ, Batzri S y Gardner JD. (1978) Kinetics of amylase release by dispersed acini prepared from guinea pig pancreas. *Am J Physiol*; 235: E743-E749.
- Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Smith DH, Ramachandran J y Capon DJ. (1987) Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J*; 6: 3923-3929.
- Petersen OH. (1982) Stimulus-excitation coupling in plasma membranes of pancreatic acinar cells. *Biochim Biophys Acta*, 6944: 163-184.
- Petersen OH. (1992) Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. *J Physiol Lond*, 448: 1-51.
- Petersen OH, Petersen CCH y Kasai H. (1994) Calcium and hormone action. *Annu Rev Physiol*; 56: 297-319.
- Petersen CCH, Toescu EC y Petersen OH. (1991) Different patterns of receptor-activated cytoplasmic  $Ca^{2+}$  oscillations in single pancreatic acinar cells: dependence of receptor type, agonist concentration and intracellular  $Ca^{2+}$  buffering. *EMBO J*; 10(3):527-533.
- Petersen OH y Wakui M. (1990) Oscillating intracellular  $Ca^{2+}$  signal evoked by activation of receptors linked to inositol lipid hydrolysis: mechanism of generation. *J Membr Biol*; 118: 93-105.
- Piiper A, Pröfrock A y Schulz I. (1991) Effects of epidermal growth factor and calcium omission on cholecystokinin-stimulated  $Cl^-$  conductance in rat pancreatic zymogen granules. *Biochem Biophys Res Commun*; 181: 827-832.
- Piiper A, Stryjek-Kaminska D, Stein J, Caspary WF y Zeuzem S. (1994) Tyrphostins inhibit secretagogue-induced 1,4,5- $IP_3$  production and amylase release in pancreatic acini. *Am J Physiol*; 266: G363-G371.
- Piiper A, Stryjek-Kaminska D, Gebhardt R y Zeuzem S. (1996) Pertussis toxin-sensitive G-proteins inhibit fibroblast growth factor-induced signaling in pancreatic acini. *J Cell Physiol*;

167: 52-59.

Piiper A, Stryjek-Kaminska D y Zeuzem S. (1997) Epidermal growth factor activates phospholipase C- $\gamma_1$  vía  $G_{i1-2}$  proteins in isolated pancreatic acinar membranes. *Am J Physiol*; 272: 1276-1284.

Pincus IJ, Thomas JE, Hausman D y Lachman PO. (1948) Relationship between the pH of the duodenal content and pancreatic secretion. *Proc Soc Exptl Biol Med*, 67: 497-500.

Plowman GD, Withney GS, Neubauer MG, Green JM, McDonald VL, Todaro GJ y Shoyab M. (1990) Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor related gene. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87: 4905-4909.

Podolsky DK. (1994). Peptide growth factors in the gastrointestinal tract. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3ª edición. Ed: Johnson. Raven Press. New York. pp 129-168.

Poirier J. (1985) Histología del páncreas exocrino. En: *Cuadernos de histología*. Ed; Marbán y Librería Médica . pp 341-345.

Popescu LM e Ignat P. (1983) Calmodulin-dependent  $Ca^{2+}$ -pump ATPase of human smooth muscle sarcolemma. *Cell Calcium*; 4: 219-235.

Pozo MJ, Estévez MJ, Alcón S, Camello PJ, Pariente JA y Salido GM. (1995) Cholinergic dependence of pancreatic response to cholecystokinin in rats and guinea pigs. *Gen Pharmacol*; 26: 843-850.

Pozo MJ, Salido GM y Madrid JA. (1990) Action of cholecystokinin on the dog sphincter of Oddi: influence of anti-cholinergic agents. *Arch Int Physiol Biochim*; 98: 353-360.

Proffitt R y Case RM. (1984a) The effect of vanadate on  $^{45}Ca^{2+}$  exchange and enzyme secretion in the rat exocrine pancreas. *Cell Calcium*; 5: 321-324.

Proffitt R y Case RM. (1984b) Vanadate stimulates rat pancreatic enzyme secretion through the release of calcium from an intracellular store. *Cell Calcium*; 5: 335-350.

Pröfrock A, Schnefel S y Schulz I. (1991a) Receptors for insulin interact with  $G_i$ -proteins and for epidermal growth factor with  $G_i$ - and  $G_s$ -proteins in rat pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 175: 380-386.

Pröfrock A, Piiper A, Eckhardt L y Schulz I. (1991b) Epidermal growth factor inhibits both cholecystokinin octapeptide-induced inositol 1,4,5-trisphosphate production and  $[Ca^{2+}]_i$  increase in rat pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 180: 900-906.

Pröfrock A, Zimmermann P y Schulz I. (1992) Bombesin receptors interact with  $G_i$  and  $p21^{ras}$  proteins in plasma membranes from rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*; 263:G240-G247.

Pulverer BJ, Kyriakos JM, Avruch J, Nikolakaki E y Woodgett JR. (1991) Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*; 353: 670-674.

Putney JW Jr. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7: 1-12.

Putney JW Jr. (1988) The role of phosphoinositide metabolism in signal transduction in secretory cells. *J Exp Biol*, 139: 135-150.

Putney JW Jr. (1990) Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*; 11: 611-624.

Putney JT, Takemura H, Hughes AR, Horstman DA y Tharstrup O. (1989) How do inositol phosphates regulate calcium signaling?. *FASEB J*; 3: 1899-1905.

Rana RS y Hokin LE. (1990) Role of phosphoinositides in transmembrane signaling. *Physiological Rev*; 70: 115-164.

Randriamampita C y Tsien RY. (1993) Emptying of intracellular  $Ca^{2+}$  stores releases a novel

- small messengers that stimulates  $Ca^{2+}$  influx. *Nature London* 364: 809-810.
- Rasmussen H, Apeldorf W, Barret P, Takuwa N, Zawalich W, Kreutter D, Park S y Takuwa Y. (1986) Inositol lipids: integration of cellular signalling systems. En: "Receptor biochemistry and methodology. Phosphoinositides and receptors mechanisms". Ed. Putney J, Alan R Liss, New York. pp: 109-147.
- Raufman J-P, Malhotra R y Singh L. (1991) PACAP-38, a novel peptide from ovine hypothalamus, is a potent modulator of amylase release from dispersed acini from rat pancreas. *Reg Pep*; 36: 121-129.
- Receptor Nomenclature Supplement. (1991) *Trends Pharmacol Sci*: 1-43.
- Rechler MM y Nissley SP. (1991) Insulin-like growth factors. En: *Peptide growth factors and their receptors I*. Sporn MB, Roberts AB, eds. New York: Springer-Verlag, 263-367.
- Reeves JR, Richards RC y Cooke T. (1991) The effects of intracolonic EGF on mucosal growth and experimental carcinogenesis. *Br J Cancer*; 63: 223-226.
- Reuss L, Lewis SA, Wills NK, Helman SI, Cox TC, Boron WF, Siebens AW, Guggino WB, Giebisch G y Schultz SG. (1984) Ion transport processes in basolateral membranes of epithelia. *Fed Proc*; 43: 2480-2502.
- Rhee SG, Kim H, Suh PG y Choi WC. (1991) Multiple forms of phosphoinositide-specific phospholipase C and different modes of activation. *Biochem Soc Trans*; 19: 337-341.
- Ribet A, Vaysse N y Clemente F. (1985) Fisiología del páncreas exocrino. En: *Fisiología humana*. Ed: Meyer. Salvat, Barcelona. pp 273-308.
- Rink TJ, Tsien RY y Warner AE. (1980) Free calcium in *Xenopus* embryos measured with ion-selective microelectrodes. *Nature London* 253: 658-660.
- Rivard N, Rydzewska G, Lods J-S, Martinez J y Morisset J. (1994) Pancreas growth tyrosine kinase, PtdIns 3-kinase, and PLD involve high-affinity CCK-receptor occupation. *Am J Physiol*; 266: G62-70.
- Rivard N, Rydzewska G, Lods J-S y Morisset J. (1995) Novel model of integration of signaling pathways in rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*; 269: G352-362.
- Robberecht P, Colon TP y Gardner JD. (1976) Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from the guinea-pig. Structural requirements for effects of VIP and secretin on cellular adenosine 3'-5'-monophosphate. *J Biol Chem*; 251: 4635-4639.
- Robberecht P, Waelbroeck M, Noyer M, Chatelain P, De Neef P, Konig W y Christophe J. (1982) Characterization of secretin and vasoactive intestinal peptide receptors in rat pancreatic plasma membranes using the native peptides, secretin-(7-27) and five secretin analogues. *Digestion* 23: 201-210.
- Romano M, Polk WH, Awad JA, Arteaga CL, Nanney LB, Wargovich MJ, Kraus ER, Boland CR y Coffey RJ. (1992) Transforming growth factor alpha protection against drug-induced injury to the rat gastric mucosa *in vivo*. *J Clin Invest*; 90: 2409-2421.
- Rooney TA, Renard DC, Saas EJ y Thomas AP. (1991) Oscillatory cytosolic calcium waves independent of stimulated inositol 1,4,5-triphosphate formation in hepatocytes. *J Biol Chem*; 266: 12272-12282.
- Roos A y Boron F. (1981) Intracellular pH. *Physiological Reviews* 61: 296-434.
- Rosado JA, García LJ y Salido GM. (1997a) Ionic requirements in histamine-evoked potassium efflux in guinea pig pancreas. *Revista Española de Fisiología*; 53: 231-238.

- Rosado JA, Singh J, Salido GM y García LJ. (1997b) Acetylcholine-evoked potassium transport in the isolated guinea-pig pancreas. *Exp Physiol*; 82: 149-159.
- Rosado JA, Tapia JA, García LJ y Salido GM (1996) Histamine-evoked potassium release in the mouse and guinea pig pancreas. *Pancreas*; 12: 396-400.
- Rossier MF, Bird GSJ y Putney JWJ. (1991) Subcellular distribution of the calcium-storing inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive organelle in rat liver. *Biochem J*; 274: 643-650.
- Rowley WH, Sato S, Huang SC, Collado-Escobar DM, Beaven MA, Wang LH, Martínez J, Gardner JD y Jensen RT. (1990) Cholecystokinin-induced formation of inositol phosphates in pancreatic acini. *Am J Physiol*; 259:G655-G665.
- Rozengurt E. (1995) Convergent signalling in the action of integrins, neuropeptides, growth factors and oncogenes. *Cancer Surveys. Vol 24: Cell Adhesion and Cancer*: 81-96.
- Rubin RP, Godfrey PP, Chapman DA y Putney JW, Jr. (1984) Secretagogue-induced formation of inositol phosphates in rat exocrine pancreas. *Biochem J*: 219: 655-659.
- Rubinson KA. (1981) Concerning the form of biochemically active vanadium. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*; 212: 65-84.
- Rutten MJ, Harmon P y Campbell DR. (1991) Insulin enhances epidermal growth factor- and transforming growth factor -alpha-stimulated growth in primary cultures of guinea pig gastric mucous epithelial cells. *Scand J Gastroenterol*; 26: 965-973.
- Rydzewska G y Morisset J. (1995) Activation of pancreatic acinar cell phospholipase D by epidermal, insulin-like, and basic fibroblast growth factors involves tyrosine kinase. *Pancreas*; 10: 59-65.
- Saito A, Williams JA y Kanno T. (1980) Potentiation of cholecystokinin-induced exocrine secretion by both exogenous and endogenous insulin in isolated and perfused rat pancreata. *J Clin Invest*; 65: 777-782.
- Salido GM, Gil MZ, Pariente JA, Pozo MJ y Madrid JA. (1990a) Effects of pirenzepine on CCK-stimulated canine pancreatic exocrine secretion. *Gen Pharmacol*; 21: 195-198.
- Salido GM, Lennard R, Singh J y Pariente JA. (1990b) Histamine-evoked amylase secretion is associated with small changes in calcium mobilization in isolated guinea-pig pancreas. *Exp Physiol*; 75: 263-266.
- Salido GM, Madrid JA, Esteller A y Lopez MA. (1982) Effect of electrical stimulation of the vagus nerve on the exocrine pancreatic secretion in the chicken. En: "Exogenous and endogenous influences on metabolic and neural control" Ed. Addink y Spronk. Pergamon Press, Oxford. pp: 17-18.
- Salido GM, Madrid JA, Martín EA, Esteller A y López MA. (1984) Circadian rhythmicity in the basal pancreatic secretion of the domestic fowl. *Chronobiol Int*; 1: 173-176.
- Salido GM, Pariente JA, Jennings L, Sarkey KA, Davison JS y Singh J. (1997) Effects of histamine H<sub>3</sub> receptors on nerve-mediated protein secretion and <sup>3</sup>H-choline release in the isolated guinea-pig pancreas. *Biogenic amines*; 13: 425-439.
- Salido GM, Raggi L y Madrid JA. (1986) Efectos de la secretina y colecistokina-pancreozimina exógenas sobre la secreción pancreática exocrina en el pollo. *Avances en Ciencias Veterinarias*; 1: 35-40.
- Sandoval J. (1975) Órganos metaperitoneales. Duodeno, páncreas y bazo. Configuración y dependencias. Riego sanguíneo, linfáticos e inervación. Estudio comparativo. En *Anatomía veterinaria. Volumen II*. Ed: Sandoval. Imprenta moderna Córdoba. pp 115-120.

- Sargeant P, Farndale RW y Sage SD. (1993) ADP- and thapsigargin -evoked  $Ca^{2+}$  entry and protein-tyrosine phosphorylation are inhibited by the tyrosine kinase inhibitors genistein and methyl-2,5-dihydroxycinnamate in fura-2-loaded human platelets. *J Biol Chem*; 268: 18151-18156.
- Savage CRJr, Inagami T y Cohen S. (1972) The primary structure of epidermal growth factor. *J Biol Chem*; 247: 7612-7621.
- Selden C, Johnstone R, Darby H, Gupta S y Hodgson HJF. (1986) Human serum does contain a high molecular weight HGF: studies pre- and post-hepatic resection. *Biochem Biophys Res Commun*; 139: 361-366.
- Schaffalitzky de Muckadell OB, Fahrenkrug J, Holst JJ y Lauritsen KB. (1977) Release of VIP by intraduodenal stimuli. *Scand J Gastroenterol*, 12: 793-799.
- Schaudies RP, Grimes J, Wray HL y Koldovsky O. (1990) Identification and partial characterization of multiple forms of biologically active EGF in rat milk. *Am J Physiol*; 259: G1056-G1061.
- Schlessinger J y Ullrich A. (1992) Growth factor signalling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*; 9: 383-391.
- Schlicker E, Betz R y Gother M. (1988) Histamine H3 receptor mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 337: 588-590.
- Schneffel S, Profrock A, Hinsch KD y Schulz I. (1990) Cholecystokinin activates  $Gi1$ - $Gi2$ - $Gi3$ - and several  $Gs$ -proteins in rat pancreatic acinar cells. *Biochem J*; 269: 483-488.
- Schulz I (1981) Electrolyte and fluid secretion in the exocrine pancreas. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Ed: Johnson LR. Raven Press, New York. pp 795-819.
- Schulz I. (1987) Electrolyte and fluid secretion in the exocrine pancreas. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*, second edition. Ed: Johnson LR. Raven Press, New York. pp 1147-1171.
- Schulz I y Stolze HH. (1980) The exocrine pancreas: the role of secretagogues, cyclic nucleotides and calcium in enzyme secretion. *Annu Rev Physiol*; 42: 127-156.
- Schulz I, Thevenod F y Dehlinger-Kremer. (1989) Modulation of intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration by  $IP3$ -sensitive and  $IP3$ -insensitive nonmitochondrial  $Ca^{2+}$  pools. *Cell Calcium* 10: 325-336.
- Segarini PR, Ziman JM, Kane CJM y Dasch JR. (1992) Two novel patterns of  $TGF\beta$  binding to cell surface proteins are dependent upon the binding of  $TGF\beta1$  and indicate a mechanism of positive cooperativity. *J Biol Chem*; 267: 1048-1053.
- Serrano R. (1991) *Molecular biology methods*. Heidelberg: European molecular biology laboratory, pp: 66-67.
- Shiota G, Rhoads DB, Wang TC, Nakamura T y Schmidt EV. (1992) HGF inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89: 373-377.
- Shoshan-Barmatz V. (1990) High affinity ryanodine binding sites in rat liver endoplasmic reticulum. *FEBS Lett*; 263: 317-320.
- Shuttleworth TJ. (1990) Fluoroaluminate activation of different components of the calcium signal in an exocrine cell. *Biochem J*; 269: 417-422.
- Simeone DM, Yule DI, Logsdon CD y Williams JA. (1995)  $Ca^{2+}$  signaling through secretagogue and growth factors receptors on pancreatic AR42J cells. *Regul Pept*; 55: 197-206.
- Simon MI, Strathmann MP y Gautam N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction.

Science; 252:802-808.

Simons TJB. (1979) Vanadate- a new tool for biologists. *Nature*; 281: 337-338.

Singh J. (1985) Mechanism of action of insulin on acetylcholine-evoked amylase secretion in the mouse pancreas. *J. Physiol.*; 358: 469-482.

Singh J, Asada I, Owlia A, Collins TJ y Thompson JC. (1988) Somatostatin inhibits VIP-stimulated amylase release from perfused guinea pig pancreatic acini. *Am. J. Physiol.*; 254: G217-G223.

Singh J, Lennard R, Salido GM, Wisdom D, Render CL, Pozo MJ, Pariente JA y Camello PJ. (1992) Interaction between secretin and cholecystokinin-octapeptide in the exocrine rat pancreas *in vivo* and *in vitro*. *Experimental Physiology*; 77: 191-204.

Singh J, Pariente JA y Salido GM. (1997) The physiological role of histamine in the exocrine pancreas. *Inflamm Res*; 46: 159-165.

Sjödín L. (1985) CCK inhibits binding of substance P to pancreatic acinar cells. *Acta Physiol Scand*; 124: 471.

Soares MB, Ishii DN y Efstratiadis A. (1985) Developmental and tissue-specific expression of a family of transcripts related to rat IGF II mRNA. *Nucleic Acids Res*; 13: 1119-1134.

Solomon TE. (1987) Control of exocrine pancreatic secretion. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*, 2ª edición. Ed: Johnson. Raven Press. New York. pp 1173-1207.

Solomon TE. (1994) Control of exocrine pancreatic secretion. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3ª edición. Ed: Johnson. Raven Press. New York. pp 1499-1530.

Spicer SS, Sens MA y Tashiam RE. (1982) Immunocytochemical demonstration of carbonic anhydrase in human epithelial cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*; 30: 864-873.

Spiegel AM. (1990) Structure and identification of G-proteins: isolation and purification. En: "G-proteins as mediators of cellular signalling processes. Molecular pharmacology of cell regulation". Vol 1. Ed. Houslay y Milligan. John Wiley & Sons, Chichester. pp: 15-30.

Stenson WF y Lobos E. (1982) Metabolism of arachidonic acid by pancreatic acini: relation to amylase secretion. *Am J Physiol*; 242: G493-G497.

St-Louis J, Sicotte B, Breton E y Srivastava AK. (1995) Contractile effects of vanadate on aorta rings from virgin and pregnant rats. *Mol Cell Biochem*; 153: 145-150.

Stryjek-Kaminska D, Piiper A, Caspary WF y Zeuzem S. (1993) Effect of epidermal growth factor on cholecystokinin-induced amylase release and inositol 1,4,5-triphosphate production in pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 190: 92-96.

Stryjek-Kaminska D, Piiper A, Caspary WF y Zeuzem S. (1994) Epidermal growth factor inhibits amylase secretion and activation of phospholipase C in response to calcium-mobilizing secretagogues in rat pancreatic acini. *Z Gastroenterol*; 32: 232-235.

Stryjek-Kaminska D, Piiper A, Caspary WF y Zeuzem S. (1995a) Epidermal growth factor inhibits hormone- and fibroblast growth factor-induced activation of phospholipase C in rat pancreatic acini. *Peptides*; 16: 123-128.

Stryjek-Kaminska D, Piiper A, Stein J, Caspary WF y Zeuzem S. (1995b) Epidermal growth factor signaling in rat pancreatic acinar cells. *Pancreas*; 10: 274-280.

Stryjek-Kaminska D, Piiper A y Zeuzem S. (1995c) EGF inhibits secretagogue-induced cAMP production and amylase secretion by Gi proteins in pancreatic acini. *Am J Physiol*; 269: G676-G682.

- Stuenkel EL, Tsunoda Y y Williams JA. (1989) Secretagogue-induced calcium mobilization in single pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 158: 863-869.
- Suemori S, Ciacci C y Podolsky DK. (1991) Regulation of TGF expression in rat intestinal epithelial cell lines. *J Clin Invest*; 87: 2216-2221.
- Sung CK y Williams JA. (1988) Role of calcium in pancreatic acinar cell secretion. *Mineral Electrolyte Metabol*; 14: 71-77.
- Supattapone S, Danoff SK, Theibert A, Joseph SK, Steiner J y Snyder SH. (1988a) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of brain inositol triphosphate receptor decreases its release of calcium. *Proc Natl Acad Sci USA*; 85: 8747-8750.
- Supattapone S, Worley PF, Baraban JM y Snyder SH. (1988b) Solubilization, purification and characterization of an inositol triphosphate receptor. *J Biol Chem*; 263: 1530-1534.
- Susini C, Estival A, Scemama JL, Ruellen C, Vaysse N, Clemente F, Esteve JP, Fourmy D y Ribet A. (1986) Studies on human pancreatic acini: action of secretagogues on amylase release and cellular cyclic AMP accumulation. *Pancreas*; 1: 124-129.
- Susumu, T. (1977) *The Pancreas*. En: *Histology*. Eds: Weiss L y Greep RO. McGraw Hill Company. pp 747-764.
- Swandito L, Leung YK, Firmansyah A, Lebenthal E y Lee PC. (1989) Phorbol ester potentiates VIP-stimulated amylase release in rat pancreatic acini. *Pancreas*, 4: 459-463.
- Swann K. (1991) Thimerosal causes calcium oscillations and sensitizes calcium-induced calcium release in unfertilized hamster eggs. *FEBS Lett*; 278: 175-178.
- Swarup G, Cohen S y Garbers DL. (1982) Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. *Biochem Biophys Res Commun*; 107: 1104-1109.
- Symons M. (1997) Rho family GTPases. *Insights*; 3: 3-5.
- Tajima H, Matsumoto K y Nakamura T. (1992) Regulation of cell growth and motility by HGF and receptor expression in various cell species. *Exp Cell Res*; 202: 423-431.
- Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J, Takahashi K, Nakamura H, Suzuki J, Nagai K, Yamada T, Nakamura S-I y Yamamura H. (1991) Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-KDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem*; 266: 15790-15796.
- Tankel HI, Lester LJ, Richmen A y Hollander F. (1977) A study of the pancreatic response to histamine in dogs with total gastrectomies. *Gastroenterology*; 65: 22-45.
- Taparel D, Susini C, Esteve JP, Diaz J, Cazaubon C, Vaysse N y Ribet A. (1985) Somatostatin analogs: correlation of receptor affinity with inhibition of cyclic AMP formation in pancreatic acinar cells. *Peptides* 6: 109-114.
- Tapia JA, González A, Salido GM y García LJ. (1997) Tripsinogen secretion from the isolated guinea-pig pancreas in response to secretagogues. *Biogenic amines*; 13: 477-490.
- Taylor CW, Merrit JE, Putney JW y Rubin RP. (1986) Effects of Ca<sup>2+</sup> on phosphoinositide breakdown in exocrine pancreas. *Biochem J*; 238: 765-772.
- Tepikin AV, Llopis J, Snitsarev VA, Gallacher DV y Petersen OH. (1994) The droplet technique: measurement of calcium extrusion from single isolated mammalian cells. *Pflugers Arch*; 428: 664-670.
- Tepikin AV y Petersen OH. (1992) Mechanisms of cellular calcium oscillations in secretory cells. *Biochim Biophys Acta* 113: 197-207.
- Tepikin AV, Voronina SG, Gallacher DV y Petersen OH. (1992) Pulsatile Ca<sup>2+</sup> extrusion from

single pancreatic acinar cells during receptor-activated cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  spiking. *J Biol Chem*; 267: 14073-14076.

Thevenod F, Dehlinger-Kremer M, Kremmer TP, Christian A-L, Potter BVL y Schulz I. (1989a) Characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive (IsCaP) and -insensitive (IsCaP) nonmitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  pools in rat pancreatic acinar cells. *J Membr Biol*; 109: 173-186.

Thevenod F, Kremmer TP, Christian A-L y Schulz I. (1989b) Characterization of MgATP-driven  $\text{H}^+$  uptake into a microsomal vesicle fraction from rat pancreatic acinar cells. *J Membr Biol*; 107: 263-275.

Thomas AP y Delaville F. (1991) The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells. En: *Cellular calcium: an practical approach*. Eds McCormack JG y Cobbold PH. Oxford University Press; pp: 1-54.

Thomas DM, Nasim MM, Gullick WJ y Alison MR. (1992) Immunoreactivity of transforming growth factor alpha in the normal adult gastrointestinal tract. *Gut*; 33: 628-631.

Thorn P, Brady P, Llopis J, Gallacher DV y Petersen OH. (1992) Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  spikes evoked by the thiol reagent thimerosal in both intact and internally perfused single pancreatic acinar cells. *Pflügers Archiv*; 422: 173-178.

Thorn P, Gerasimenko O y Petersen OH. (1994) Cyclic ADP-ribose regulation of ryanodine receptors involved in agonist evoked cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in pancreatic acinar cells. *Embo J*; 13: 2038-2043.

Todaro GJ y De Larco JE. (1976) Transformation by murine and feline sarcoma viruses specifically blocks binding of epidermal growth factor to cells. *Nature*; 264: 26-31.

Toescu EC. (1995) Temporal and spatial heterogeneities of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling: mechanisms and physiological roles [editorial]. *Am J Physiol*; 269: G173-G185.

Toescu EC, Lawrie AM, Petersen OH y Gallacher DV. (1992a) Spatial and temporal distribution of agonist-evoked cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  signals in exocrine acinar cells analyzed by digital image microscopy. *EMBO J*; 11: 1623-1629.

Toescu EC, O'Neill SC, Petersen OH y Eisner DA. (1992b) Caffeine inhibits the agonist-evoked cytosolic calcium signal in mouse pancreatic acinar cells by blocking inositol triphosphate production. *J Biol Chem*; 267: 23467-23470.

Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grant-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E y Loriolle F. (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203 X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem*; 266: 15771-15781.

Tranberg KG, Tabata K, Chen MH, Murphy RF, Fischer JE y Joffe SN. (1985) Release of secretin immunoreactivity from the ileum. *Ann Surg*, 201: 300-304.

Tremblay J, Gerzer R y Hamet P. (1988) Cyclic GMP and cell fuction. En: "Advances in second messenger and phosphoprotein research". Ed: Greengard P y Robinson GA. Raven Press, New York. pp: 319-382.

Trimble ER, Bruzzone R, Meehan CJ y Biden TJ. (1987) Rapid increase in inositol 1,4,5-trisphosphate, inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  in agonist-stimulated pancreatic acini of the rat. *Biochem J*; 242: 289-292.

Trimm JL, Salama G y Abramson JJ. (1986) Sulfhydryl oxidation induces rapid calcium release from sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem*; 261: 16092-16098.

Tsien RW y Tsien RY. (1990) Calcium channel, stores and oscillations. *Annu Rev Cell Biol*; 6:

715-760.

Tsujikawa T, Bamba T y Hosoda S. (1990) The trophic effect of epidermal growth factor on morphological changes and polyamine metabolism in the small intestine of rats. *Gastroenterol Jap*; 25: 328-334.

Tsujikawa T, Bamba T y Hosoda S. (1992) En: *Polyamines in the gastrointestinal tract*. RH Dowling, UR Folsch y C Loser, Eds. Lancaster: Kluwer Academic Publishers, pp: 291-298.

Tsunoda Y. (1990) Cytosolic free calcium spiking affected by intracellular pH change. *Exp Cell Res*; 188: 294-301.

Tsunoda Y. (1993) Receptor-operated  $Ca^{2+}$  signaling and crosstalk in stimulus-secretion coupling.

Tsunoda Y, Matsuno K y Tashiro Y. (1991) Cytosolic acidification leads to  $Ca^{2+}$  mobilization from intracellular stores in single and populational parietal cells and platelets. *Exp Cell Res*; 193: 356-363.

Tsunoda Y y Owyang C. (1995) Differential involvement of phospholipase A2/arachidonic acid and phospholipase C/phosphoinositol pathways during cholecystokinin receptor activated  $Ca^{2+}$  oscillations in pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Commun*; 194: 1194-1202.

Tsunoda Y, Stuenkel EL y Williams JA. (1990) Oscillatory model of calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*; 258: C147-C155.

Tsunoda Y, Yoshida H, Africa L, Steil GJ y Owyang C. (1996a) Src kinase pathway in extracellular  $Ca^{2+}$ -dependent pancreatic enzyme secretion. *Biochem Biophys Res Commun*; 227: 876-884.

Tsunoda Y, Yoshida H y Owyang C. (1996b) Intracellular control of IP3-independent  $Ca^{2+}$  oscillations in pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Commun*; 15: 265-272.

Ulshen MH, Lyn-Coo LE y Raasch RH. (1986). Effects of intraluminal epidermal growth factor on mucosal proliferation in the small intestine of adults rats. *Gastroenterology*; 91: 1134-1140.

Varga G, Papp M y Vizi S. (1990) Cholinergic and adrenergic control of enzyme secretion in isolated rat pancreas. *Dig Dis Sci*; 35: 501-507.

Verkhatsky A y Shmigol A. (1996) Calcium-induced calcium release in neurones. *Cell Calcium*; 19: 1-14.

Volpe P, Krause K-H, Hashimoto S, Zorzato F, Possan T, Meldolise J y Lew DP. (1988) "Calciosome", a cytoplasmic organelle: the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive  $Ca^{2+}$  store of nonmuscle cells? *Proc Natl Acad Sci USA*; 85: 1091-1095.

Wahl MI, Nishibe S, Suh P, Rhee SG y Carpenter G. (1989) Epidermal growth factor stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II independently of receptor internalization and extracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86: 1568-1572.

Wakefield LM, Smith DM, Masui T, Harris CC y Sporn MB. (1987) Distribution and modulation of the cellular receptor for transforming growth factor  $\beta$ . *J Cell Biol*; 105: 965-975.

Wakui M, Osipchuk YV y Petersen OH. (1990) Receptor-activated cytoplasmic  $Ca^{2+}$  spiking mediated by inositol triphosphate is due to  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release. *Cell*; 63: 1025-1032.

Wakui M y Petersen OH. (1990) Cytoplasmic  $Ca^{2+}$  oscillations evoked by acetylcholine or intracellular infusion of inositol triphosphate or  $Ca^{2+}$  can be inhibited by internal  $Ca^{2+}$ . *FEBS Lett*; 263: 206-208.

Wakui M, Potter BVL y Petersen OH. (1989) Pulsatile intracellular calcium release does no

- dependent on fluctuations in inositol triphosphate concentration. *Nature London* 339: 317-320.
- Walsh JH. (1987) Gastrointestinal hormones. En: "Physiology of the gastrointestinal tract". Ed. Johnson. Raven Press, New York pp: 181-253.
- Waltz B y Baumann O. (1989) Calcium -sequestering cell organelles: in situ localization, morphological and functional characterization. En: *Progress in histochemistry and cytochemistry*. Vol 20. Ed. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. New York.
- Wang XF, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF y Weinberg RA. (1991) Expression cloning and characterization of the TGF $\beta$  type III receptor. *Cell*; 67: 797-805.
- Ward JB, Petersen OH, Jenkins SA y Sutton R. (1995) Is an elevated concentration of acinar cytosolic free ionised calcium the trigger for acute pancreatitis?. *Lancet*; 346: 1016-1019.
- Watanabe T, Takeuchi T, Otsuka M, Tanaka S y Umezawa K. (1995) Synthesis and protein tyrosine phosphatase inhibitory activity of dephostatin analogs. *J Antibiot (Tokyo)*; 48. 1460-1466.
- Wheeler-Jones CP, May MJ, Morgan AJ y Pearson JD. (1996) Protein tyrosine kinases regulate agonist-stimulated prostacyclin release but not von Willebrand factor secretion from human umbilical vein endothelial cells. *Biochem J*; 315: 407-416.
- Willems PHGM, Tilly RHJ y De Pont JJHMM. (1987) Pertussis toxin stimulates cholecystokinin-induced cyclic AMP formation but is without effect on secretagogue-induced calcium mobilization in exocrine pancreas. *Biochim Biophys Acta*; 928: 179-185.
- Willems PHGM, Van den Broek BAM, Van Os CH y De Pont JJHMM. (1989) Inhibition of inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release in permeabilized pancreatic acinar cells by hormonal and phorbol ester pretreatment. *J Biol Chem*; 264: 9762-9767.
- Williams JA. (1980) Regulation of pancreatic acinar cell function by intracellular calcium. *Am J Physiol*; 238: G269-G279.
- Williams JA, Burnham DB y Hootman SR. (1989) Cellular regulation of pancreatic secretion. En: "Handbook of Physiology. Section 6: The gastrointestinal system. Vol. III. Salivary, gastric, pancreatic, and hepatobiliary secretion" Ed. Schultz, Forte y Ranuer. American Physiological Society, Bethesda, Maryland. pp: 419-441.
- Williams JS, Sankaran H, Korc M y Goldfine ID. (1981) Receptors for cholecystokinin and insulin in isolated pancreatic acini: hormonal control of secretion and metabolism. *Fed Proc*; 40: 2497-2502.
- Williams JA y Yule DI. (1993) Stimulus-secretion coupling in pancreatic acinar cells. En: *Exocrine pancreas (second edition)* Eds: Go VLW, Di Magno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA y Scheele GA. New York. Raven Press. pp 167-189.
- Wisdom DM, Camello PJ, Salido GM y Singh J. (1994) Interaction between secretin and nerve-mediated amylase secretion in the isolated exocrine rat pancreas. *Experimental Physiology*, 79: 851-863.
- Yarden Y y Ullrich A. (1988) Growth factor receptor tyrosine kinases. *Ann Rev Biochem*; 57: 443-478.
- Yu D-H, Noguchi M, Zhou Z-C, Villanueva ML, Gardner JD y Jensen RT. (1987) Characterization of gastrin receptors on guinea pig pancreatic acini. *Am J Physiol*; 253:G793-G801.
- Yule DI y Gallacher DV. (1988) Oscillations of cytosolic calcium in single pancreatic acinar cells stimulated by acetylcholine. *FEBS Lett*; 239: 358-362.

- Yule DI, Kim ET y Williams JA. (1994) Tyrosine kinase inhibitors attenuate "capacitative"  $Ca^{2+}$  influx in rat pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 202: 1697-1704.
- Yule DI, Lawrie AM y Gallacher DV. (1991) Acetylcholine and cholecystokinin induce different patterns of oscillating calcium signals in pancreatic acinar cells. *Cell calcium*; 12: 145-151.
- Yule DI y Williams JA. (1992) U73122 inhibits  $Ca^{2+}$  oscillations in response to cholecystokinin and carbachol but not to JMV-180 in rat pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*; 267: 13830-13835.
- Yule DI y Williams JA. (1994) Stimulus-secretion coupling in the pancreatic acinus. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Tercera edición. Ed: Johnson. Raven Press. New York. pp 1447-1467.
- Yule DI, Wu D, Essington TE, Shayman JA y Williams JA. (1993) Sphingosine metabolism induces  $Ca^{2+}$  oscillations in rat pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*; 268: 12353-12358.
- Yun CHC, Tse CM, Nath SK, Levine SA, Brant SR y Donowitz M. (1995) Mammalian Na/K exchanger family: structure and function studies. *Am J Physiol*; 32: G1-G11.
- Zachary I, Gill J, Lehmann W, Sinnott-Smith J y Rozengurt E. (1991) Bombesin, vasopressin, and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation in intact Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88: 4577-4581.
- Zachary I, Sinnott-Smith J, Turner CE y Rozengurt E. (1993) Bombesin, vasopressin and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated protein paxillin in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem*; 268: 22060-22065.
- Zaidi MF, Lagenaur CF, Abramson JJ, Pessah I y Salama G. (1989) Reactive disulfides trigger  $Ca^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum via an oxidation reaction. *J Biol Chem*; 264: 21725-21736.
- Zandomenighi R, Serra L, Baumgartl U y Poppi MC. (1991) The role of epidermal growth factor in the pathogenesis of peptic ulcer disease. *Am J Gastroenterol*; 86: 1150-1153.
- Zarnegar R, DeFrances MC, Kost DP, Lindroos P y Michalopoulos GK. (1991) Expression of HGF mRNA in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun*; 177: 559-565.
- Zeuzem S, Stryjek-Kaminska D, Caspary WF, Stein J y Piiper A. (1994) Effect of a Rab3A effector domain-related peptide, CCK, and EGF in permeabilized pancreatic acini. *Am J Physiol*; 267: 350-356.



## ***7.- Anexo***



La producción científica de esta Tesis Doctoral se ha traducido en los siguientes artículos publicados en revistas científicas:

**Título:** Secretory activity and trophic effects of epidermal growth factor in the rat pancreas.

**Autores:** A.I. Lajas, M.J. Pozo, G.M. Salido, J. Singh y J.A. Pariente.

**Revista:** Archives of Physiology and Biochemistry, 1996, 104: 293-299.

**Título:** Effect of basic fibroblast growth factor on cholecystokinin-induced amylase release and intracellular calcium increase in male rat pancreatic acinar cells.

**Autores:** A.I. Lajas, M.J. Pozo, G.M. Salido y J.A. Pariente.

**Revista:** Biochemical Pharmacology, 1998, 55: 903-908.

**Título:** Oxidizing effects of vanadate on calcium mobilization and amylase release in rat pancreatic acinar cells.

**Autores:** J.A. Pariente, A.I. Lajas, M.J. Pozo, P.J. Camello y G.M. Salido.

**Revista:** Biochemical Pharmacology, aceptado con modificaciones menores.

**Título:** Phenylarsine oxide evokes intracellular calcium increases and amylase secretion in isolated rat pancreatic acinar cells.

**Autores:** A.I. Lajas, M.J. Pozo, P.J. Camello, G.M. Salido y J.A. Pariente.

**Revista:** Receptors & Channels, enviado.

Asimismo, se han presentado las siguientes comunicaciones a congresos internacionales:

*Secretory activity and trophic effects of epidermal growth factor (EGF) on the exocrine rat pancreas.*

Salamanca. 2-5 octubre 1995.

XXVII Congreso de la SECF junto con la Physiological Society.

Publicado en Journal of Physiology, 493, 155S, 1996.

*Basic fibroblast growth factor (bFGF) inhibits CCK-8-induced amylase release in isolated rat pancreatic acini.*

Benalmádena. 4-7 febrero 1997.

XXVIII Congreso de la SECF junto con la American Physiological Society.

Publicado en: Journal of Physiology and Biochemistry, 53 (1), 1997.

*Interaction between bFGF and CCK-8 on amylase release and calcium mobilization in rat pancreatic acinar cells.*

Cambridge. 15-18 diciembre 1997.

Meeting of the Physiological Society.

Publicado en: Journal of Physiology, 506P, 127P, 1998.

*Vanadate increases cytosolic calcium from thapsigargin-sensitive intracellular stores in rat pancreatic acinar cells.*

Liverpool. 27-30 abril 1998.

Joint Meeting of Physiological Societies of United Kingdom, Eire and Spain.

Publicado en. Journal of Physiology, 509P, 19P, 1998.

*The thiol reagent phenylarsine oxide (PAO) evokes intracellular calcium increases in rat pancreatic acinar cells.*

Liverpool. 27-30 abril 1998.

Joint Meeting of Physiological Societies of United Kingdom, Eire and Spain.

Publicado en. Journal of Physiology, 509P, 20P, 1998.

Igualmente, durante el disfrute de mi beca he podido realizar dos estancias breves en centros de investigación extranjeros:

University of Central Lancashire, Preston, Reino Unido. Octubre-Noviembre 1995, en el Laboratorio del Dr. J. Singh.

Université de Sherbrooke, Québec, Canadá. Septiembre-Diciembre 1996, en el Laboratorio del Dr. J Morisset.