

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA**

**Departamento de Fisiología**

---



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO  
EN CONTINUO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA  
SECRECIÓN DE TRIPSINÓGENO EN SEGMENTOS  
PANCREÁTICOS**

Memoria de Licenciatura presentada  
por el Licenciado en Veterinaria  
**D. J. Antonio Tapia García**

CÁCERES, Mayo de 1998



D. LUIS JESÚS GARCÍA MARÍN, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor Titular de Fisiología en la Facultad de Veterinaria de Cáceres, y Dña. MARÍA JOSÉ POZO ANDRADA, Doctora en Farmacia y Catedrática de Fisiología en la Escuela Universitaria de Enfermería de Cáceres.

CERTIFICAN: Que la presente Memoria de Licenciatura elaborada por D. José Antonio Tapia García con el título “DESCRIPCIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TRIPSINAS EN CONTINUO”, ha sido realizada bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres. Hallándose concluida y reuniendo a nuestro entender las condiciones necesarias autorizamos su presentación, a fin de que pueda ser defendida públicamente ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Cáceres a 21 de mayo de mil novecientos noventa y ocho.

Fdo. D. Luis Jesús García Marín

Fdo. Dña. María José Pozo Andrada



Deseo expresar un profundo y sincero agradecimiento a estas personas e instituciones:

– A mis directores, Dr. Luis Jesús García Marín, y Dra. María José Pozo Andrada, por prestarme todo su apoyo y su ayuda, y por sus enseñanzas siempre útiles y pacientes.

– Al Dr. Ginés M. Salido Ruiz, por la posibilidad que me dio para realizar esta Memoria de Licenciatura y por la confianza y ayuda dispensadas.

– Al Dr. José Antonio Pariente Llanos por sus consejos y su ayuda.

– Al Dr. Pedro Camello Almaraz, que me ha ayudado, alentado y aconsejado en todo momento.

– A Mercedes Gómez Blázquez, por su gran ayuda en el laboratorio.

– A mis compañeros: Ana, Antonio, Juan Antonio y Soledad, y en especial a Cristina, por su apoyo, su amistad y su ayuda, y por los buenos momentos que hemos pasado trabajando juntos.

– En general a todo el Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria, con cuya colaboración y confianza conté en todo momento.

– A la Facultad de Veterinaria de Cáceres de la Universidad de Extremadura, por poner a mi disposición las instalaciones y medios necesarios para la realización de esta Memoria.

– A mi madre y a mis hermanos, que tuvieron paciencia y me alentaron en todo momento.

A todos ellos, muchas gracias.



A mis padres.



# *Abreviaturas*



AA: Acido araquidónico.  
AC: Adenilato ciclasa.  
ACh: Acetilcolina  
ADP: Difosfato de adenosina.  
AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina.  
ATP: Trifosfato de adenosina.  
BAPNA: N $\alpha$ -benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida  
bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico.  
CAM: Calmodulina.  
CCK: Colecistocinina  
DAG: Diacilglicerol.  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
EGF: Factor de crecimiento epidermal.  
EK: enterocinasa  
FI: Fosfolípidos de inositol o fosfatidilinositoles.  
PLC: Fosfolipasa C.  
PLD: Fosfolipasa D.  
GDP: Difosfato de guanina.  
GHRH: Factor hipotalámico de liberación de la hormona del crecimiento.  
GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina.  
GRP: Péptido liberador de gastrina.  
GTP: Trifosfato de guanina.  
IBMX: 3- isobutil-1-metilxantina.  
Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>: Trifosfato de inositol.  
IP<sub>4</sub>: Tetrafosfato de inositol.  
NO: Oxido nítrico.  
PACAP: Péptido de pituitaria activador de la adenilato ciclasa.  
PHI: Péptido Histidina Isoleucina.  
PI(4,5)P<sub>2</sub>: Fosfatidilinositol 4,5-difosfato.  
PI: Fosfatidilinositol.  
PIP o PI(4)P: Fosfatidilinositol 4 monofosfato.  
PK-A: Proteína cinasa A.

PK-C: Proteína cinasa C.

pNA: paranitroanilina

Sc: Secretina.

TCA: Ácido tricloroacético

TK: Tirosina cinasa.

VIP: Péptido Intestinal Vasoactivo.

# *Índice*



<b>I–JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
<b>II–ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b>	<b>5</b>
<b>1. EL PÁNCREAS EXOCRINO</b>	<b>6</b>
1.1 SECRECIÓN PANCREÁTICA ACINAR	7
1.1.1 Secreción enzimática acinar	7
1.1.1.1 Enzimas glucolíticos	7
1.1.1.2 Enzimas proteolíticos	7
1.1.1.3 Enzimas lipolíticos	9
1.1.1.4 Enzimas nucleolíticos	10
1.1.2 Secreción hidroelectrolítica acinar	10
1.2 SECRECIÓN PANCREÁTICA DUCTULAR	12
<b>2. ACOPLAMIENTO ESTÍMULO–SECRECIÓN</b>	<b>14</b>
2.1 VÍA DEL AMPC	15
2.1.1 Receptores	16
2.1.2 Proteínas G y adenilato ciclasa	16
2.1.3 Efectores	17
2.2 VÍA DE LOS FOSFOLÍPIDOS DE INOSITOL	18
2.2.1 Receptores	18
2.2.2 Proteínas G y fosfolipasa C	18
2.2.3 Importancia y mecanismo de movilización del calcio	19
2.3 OTRAS POSIBLES VÍAS	26
2.3.1 El GMPc como posible mensajero intracelular	26
2.3.2 Efectos del ácido araquidónico en la secreción pancreática	26
2.3.3 Fosforilación de proteínas	27
2.4 EFECTOS DE LA HISTAMINA EN LA SECRECIÓN PÁNCREÁTICA	29
<b>3. INTERACCIONES ENTRE SECRETAGOGOS</b>	<b>31</b>
<b>4. SECRECIÓN PARALELA</b>	<b>33</b>
<b>5. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA SECRECIÓN PANCREÁTICA EXOCRINA</b>	<b>36</b>
5.1 MÉTODOS IN VIVO	36
5.2 MÉTODOS IN VITRO	38
5.2.1 Páncreas aislado y perfundido	38
5.2.2 Perfusión de segmentos o lóbulos pancreáticos	39
5.2.3 Acinos o células acinares dispersas	41
5.2.4 Estudios con células acinares aisladas	43

<b>6. MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA SECRECIÓN PROTEICA</b> .....	<b>44</b>
6.1 MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN EN MUESTRAS DISCRETAS .....	45
6.1.1 Determinación de proteínas totales .....	45
6.1.2 Determinación de la secreción de amilasas .....	48
6.1.3 Determinación de la secreción de tripsinógeno .....	51
6.2 MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN EN CONTINUO .....	53
6.2.1 Determinación de proteínas totales en continuo por absorción UV .....	55
6.2.2 Determinación de amilasas en continuo .....	56
<b>7. CUANTIFICACIÓN DEL TRIPSINÓGENO PANCREÁTICO</b> .....	<b>58</b>
7.1 ENZIMAS PROTEOLÍTICOS .....	58
7.2 DETECCIÓN DE PROTEASAS Y PEPTIDASAS .....	65
7.2.1 Sustratos cromogénicos .....	65
7.2.1.1 Antecedentes históricos .....	67
7.2.1.2 Los sustratos cromogénicos generan color .....	67
7.2.1.3 Elección de un cromóforo .....	69
7.2.2 Otros medios de detección .....	71
7.2.2.1 Sustancias fluorogénicas .....	71
7.2.2.2 Quimioluminiscencia .....	73
7.2.2.3 Detección electroquímica .....	73
7.2.3 Condiciones para las reacciones cromogénicas .....	73
<b>III-MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>76</b>
<b>1. METODOLOGÍA GENERAL</b> .....	<b>78</b>
1.1 ANIMALES .....	78
1.2 OBTENCIÓN DE SEGMENTOS PANCREÁTICOS .....	78
1.3 SOLUCIÓN DE ENTEROCINASA .....	80
1.3.1 Tampón TRIS/HCl 0.1M pH 7.4 .....	80
1.3.2 Enterocinasa (4 Unidades/ml) .....	80
1.4 SOLUCIÓN DE BAPNA (1 mg/ml) .....	81
<b>IV-RESULTADOS</b> .....	<b>84</b>
<b>1. DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DETERMINACIÓN DE TRIPSINA EN CONTINUO</b> .....	<b>86</b>
1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	86
1.2 CONDICIONES DE LA REACCIÓN .....	88
1.2.1 Concentración de BAPNA .....	88
1.2.2 Concentración de enterocinasa .....	88
1.2.3 Condiciones físico-químicas .....	89

1.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA .....	90
1.3.1 Curvas de calibración .....	90
1.3.2 Cálculo de la cantidad de tripsina secretada por el tejido .....	92
1.4 DESCRIPCIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL .....	93
<b>2. VALIDACIÓN DEL SISTEMA DE DETERMINACIÓN DE TRIPSINAS EN CONTINUO .....</b>	<b>95</b>
2.1 SECRECIÓN BASAL DE TRIPSINÓGENO .....	96
2.2 ESTUDIO DE LA SECRECIÓN DE TRIPSINAS DEPENDIENTE DE LA VÍA DEL CALCIO .....	97
2.2.1 Experimentos con ACh .....	97
2.2.2 Experimentos con CCK .....	99
2.2.3 Comparación de los efectos de la CCK y la ACh en la secreción de tripsinas .....	101
2.3 ESTUDIO DE LA SECRECIÓN DE TRIPSINAS DEPENDIENTE DE LA ACTIVACIÓN DE LA PKC POR TPA .....	103
2.4 ESTUDIO DE LA SECRECIÓN DE TRIPSINAS DEPENDIENTE DE LA VÍA DEL AMPc .....	104
2.4.1 Experimentos con secretina .....	104
2.4.2 Experimentos con VIP .....	104
2.4.3 Experimentos con histamina .....	105
2.4.4 Comparación de los efectos del VIP, la secretina y la histamina en la secreción de tripsinas .....	107
2.5 ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS INTERACCIONES CCK–SECRETINA Y CCK–HISTAMINA EN LA SECRECIÓN DE TRIPSINAS .....	108
 <b>V–DISCUSIÓN .....</b>	 <b>110</b>
 <b>VI–CONCLUSIÓN .....</b>	 <b>118</b>
 <b>VII–BIBLIOGRAFÍA .....</b>	 <b>122</b>



# *I–Justificación y objetivos*



El páncreas es un órgano secretor que produce más proteínas por gramo de tejido que cualquier otro del organismo. Al tratarse de un órgano secretor es posible utilizarlo como sustrato biológico en los modelos experimentales orientados hacia estudios de funcionalidad; además, la cuantificación de la secreción proteica, por ser su principal producción, es un buen modelo para evaluar la funcionalidad del páncreas y los mecanismos secretores implicados.

Existen dos técnicas disponibles para cuantificar en continuo la proteína en la secreción exocrina pancreática, por una parte la determinación de proteínas totales, y por otra la determinación de amilasas. La determinación de proteínas totales es una técnica espectrofotométrica que se basa en la valoración de la absorbancia en el ultravioleta cercano y proporciona información precisa sobre la secreción total de proteínas. Sin embargo, esta técnica se ve sujeta a múltiples interferencias porque muchos agentes farmacológicos interfieren con la absorbancia a 280 nm. Por otra parte, la determinación de amilasas es una técnica espectrofluorimétrica que requiere un aparataje específico, no disponible de rutina en la mayoría de laboratorios de experimentación fisiológica.

Se nos plantea entonces la necesidad de desarrollar una nueva técnica en continuo, que aúne simplicidad, al contrario que el sistema de determinación de amilasas, y ausencia de interferencias, al contrario que la técnica de determinación de proteínas totales. Con estas premisas se desarrolla la técnica presentada en esta Memoria de Licenciatura, que cuantifica de forma continua a lo largo del tiempo la producción de tripsinógeno, y con el objetivo principal de emplear esta técnica para caracterizar la secreción de tripsinógeno en el páncreas exocrino de cobaya.

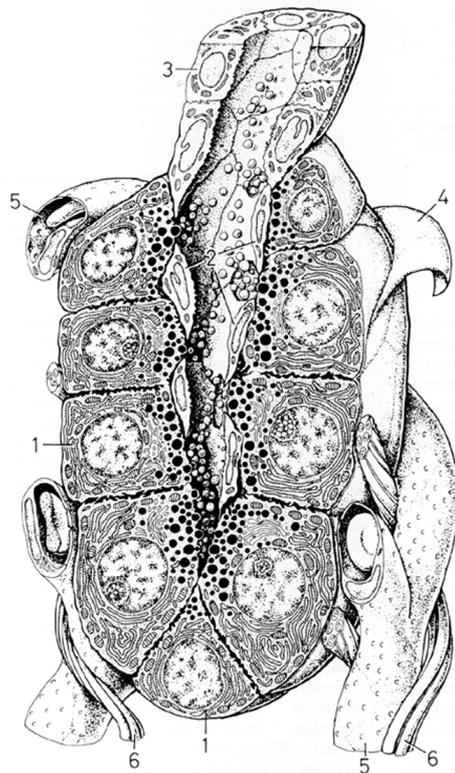


***II–Antecedentes  
bibliográficos***

# 1. El páncreas exocrino

---

Muchos tipos celulares están especializados en la síntesis y secreción de proteínas específicas, para lo cual cuentan con un complejo sistema que les permite almacenar los productos de secreción en compartimentos discretos rodeados de membrana (gránulos). Este es el caso de las células exocrinas del páncreas, que sintetizan y secretan enzimas digestivos glucolíticos, proteolíticos, lipolíticos y nucleolíticos que son vehiculadas en un jugo pancreático rico en  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Cl}^-$ . La secreción enzimática de las células acinares, almacenada en gránulos secretores (zimógeno), es vertida hacia la luz de los acinos, desde donde pasa a los conductos pancreáticos, mezclándose allí con la secreción electrolítica producida por las células ductulares, siendo posteriormente conducida hasta duodeno.



**Figura 1:** esquema de un acino pancreático. (1) Célula acinar, con un gran núcleo redondeado, rica en retículo endoplásmico con ribosomas y gránulos de zimógeno en la zona apical; (2) células centroacinares; (3) células del conducto intercalar; (4) membrana basal; (5) capilares sanguíneos; (6) fibras nerviosas. X3000. De *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (1987), 2ª Ed. Raven Press. New York.

## **1.1 Secreción pancreática acinar**

La participación de las células acinares en la composición del jugo pancreático tiene especial importancia en el contenido enzimático del mismo, aunque las células acinares también secretan agua e iones que entran a formar parte de la secreción hidroelectrolítica.

### **1.1.1 Secreción enzimática acinar**

Los enzimas sintetizados por las células acinares del páncreas tienen un papel fundamental en la digestión, hidrolizando las moléculas procedentes de los alimentos de manera que puedan ser absorbidas. Según el tipo de molécula que hidrolizan, se pueden clasificar en enzimas glucolíticos, proteolíticos, lipolíticos y nucleolíticos. La mayoría de estos enzimas son sintetizados en un estado inactivo como precursores o proenzimas, como medida protectora contra la autólisis del páncreas, siendo rápidamente activados cuando llegan al duodeno (Tournut, 1978; Desnuelle y Figarella, 1979).

#### **1.1.1.1 Enzimas glucolíticos**

La amilasa pancreática es una  $\alpha$ -amilasa y constituye uno de los principales componentes de la secreción pancreática exocrina de los mamíferos no rumiantes (Desnuelle y Figarella, 1979). La  $\alpha$ -amilasa del cerdo es una de las más estudiadas (Cozzone y cols, 1970); presenta dos formas moleculares conocidas como amilasa I y amilasa II, con la misma actividad específica y características estructurales, y pesos moleculares comprendidos entre 50.000 y 56.000 daltons.

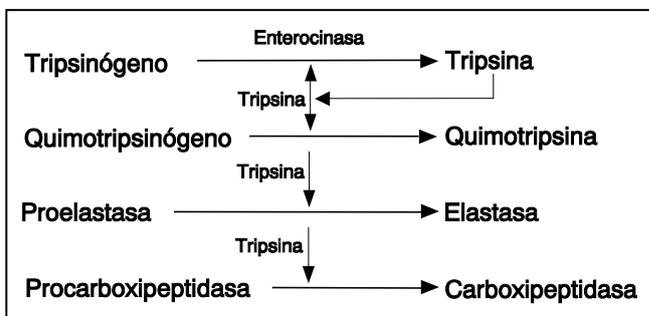
La acción principal es la de hidrolizar las uniones internas glucosídicas  $\alpha\alpha$ -1,4 de los polímeros naturales de glucosa, liberando  $\alpha$ -maltosa. Su pH óptimo se sitúa muy cerca de la neutralidad.

#### **1.1.1.2 Enzimas proteolíticos**

##### **Endopeptidasas**

La tripsina es secretada forma de proenzima, el tripsinógeno, que es convertido en tripsina por la enterocinasa duodenal. El pH óptimo de acción de la tripsina se sitúa entre 7 y 9. Este enzima escinde los enlaces peptídicos, tanto centrales como en el extremo de la cadena, en los que interviene el grupo carboxilo de un aminoácido básico, como la lisina o la arginina, además también hidroliza los

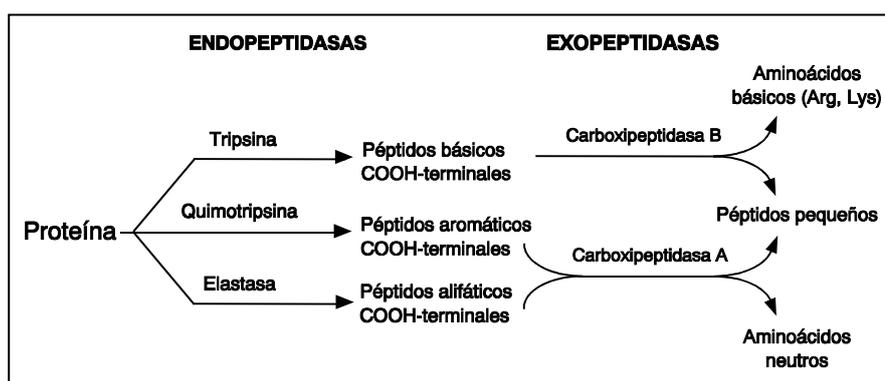
enlaces amida o éster siempre que la lisina o la arginina estén presentes. La tripsina, de este modo, juega un papel importante en los procesos de digestión, y es el enzima responsable de la activación de otros proenzimas pancreáticos (Kayser, 1970).



**Figura 2:** activación de las proteasas pancreáticas en la luz duodenal

La quimotripsina se encuentra en el jugo pancreático como proenzima, el quimotripsinógeno, que pasa a la forma activa en presencia de tripsina (Hartley, 1964). Se estudió en el cerdo donde se han aislado cuatro tipos de quimotripsinógeno, el A (Charles y cols, 1967), el B (Gratecos y cols, 1969), el C (Tobita y Folk, 1967) y el D (Lamy y cols, 1977). La quimotripsina hidroliza preferentemente los enlaces donde interviene el carboxilo de un aminoácido aromático (Kayser, 1970). Su pH óptimo de actuación es 7.5–8.5.

La elastasa se encuentra en el páncreas como proelastasa, y su activación también es llevada a cabo por la tripsina. El pH óptimo de acción es de 8.8 (Desnuelle y Figarella, 1979). Su principal acción es la hidrólisis de los enlaces peptídicos en los que interviene un aminoácido neutro portador de un radical alifático (Tournut, 1978).



**Figura 3:** acción secuencial intraduodenal de las endopeptidasas y exopeptidasas pancreáticas en la dieta proteica. Tras su acción se producen aminoácidos libres (30%) y oligopéptidos (2–6 residuos, 70%).

## Exopeptidasas

Las carboxipeptidasas están presentes en el jugo pancreático en forma de dos proenzimas, las procarboxipeptidasas A y B que son activadas por la tripsina. Estas enzimas actúan en el extremo carboxilo terminal de las cadenas peptídicas: la carboxipeptidasa A puede liberar aminoácidos neutros, ácidos o aromáticos, mientras que la carboxipeptidasa B hidroliza los enlaces peptídicos en los que intervienen aminoácidos básicos como la lisina o arginina. Ambas enzimas son metaloproteínas que contienen zinc (Desnuelle y Figarella, 1979) que es esencial para su actividad (Rinderknecht, 1986).

TIPO/NOMBRE	Residuo reconocido (Ejemplo)
• <i>Endopeptidasas</i>	
Quimotripsina	Aromático (Phe, Tyr)
Elastasa	Alifático (Leu, Met, Ala)
Tripsina	Básico (Arg, Lys)
• <i>Exopeptidasas</i>	
Carboxipeptidasa A	Neutro (alifático o aromático)
Carboxipeptidasa B	Básico (Arg, Lys)

**Tabla 1:** las endopeptidasas escinden el enlace peptídico del residuo reconocido con alta afinidad en el interior de la cadena, para liberar productos con el residuo reconocido (segunda columna) en el extremo -COOH. Las exopeptidasas reconocen el aminoácido particular -COOH terminal y escinden el último enlace peptídico en la cadena para liberar este residuo como aminoácido libre, dejando el penúltimo residuo original como el nuevo extremo -COOH.

### 1.1.1.3 Enzimas lipolíticos

La lipasa pancreática es una glucoproteína con acción óptima a pH cercano a 8. Esta enzima provoca la hidrólisis de los triglicéridos en monoglicéridos y ácidos grasos, en presencia de colipasa, que impide la inhibición de la lipasa por las sales biliares, emulsionando las grasas y aumentando así la superficie de acción de la lipasa.

La colipasa es una pequeña proteína secretada por el páncreas posiblemente como zimógeno (Sternby y Borgstrom, 1979; Wieloch y cols, 1981), la cual actúa como cofactor de la lipasa. La acción de la lipasa es inhibida por los ácidos biliares presentes en el duodeno y la colipasa parece contrarrestar esta inhibición.

El páncreas sintetiza, en forma de proenzima, una fosfolipasa A<sub>2</sub>, estereoespecífica, capaz de hidrolizar el enlace éster en posición 2 de los

fosfoglicéridos y convertirlos en lisofosfoglicéridos. La activación de la profosfolipasa A2 tiene lugar en presencia de tripsina.

La carboxilesterasa es una proteína cuya actividad está muy aumentada en presencia de sales biliares; en contraste con la lipasa, hidroliza ésteres de los ácidos grasos de cadena corta solubles en agua (Desnuelle y Figarella, 1979). Su pH óptimo es de 8 y es activada por CINA.

#### **1.1.1.4 Enzimas nucleolíticos**

Son fosfodiesterasas que actúan hidrolizando los enlaces fosfodiéster que unen los mononucleótidos en los ácidos nucleicos. La ribonucleasa presenta dos variantes moleculares, una de ellas glucosilada con un pH óptimo de 8.2 (Desnuelle y Figarella, 1979). Actúa específicamente en los enlaces fosfodiéster de los ácidos ribonucleicos liberando nucleótidos 3'-fosfato (Richards y Wyckoff, 1971).

La desoxirribonucleasa es una glucoproteína que actúa en el ADN liberando oligonucleótidos cuyos nucleótidos terminales son del tipo 5'-fosfato (Kayser, 1970), en presencia de  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ . Su actividad se desarrolla a pH 7.

#### **1.1.2 Secreción hidroelectrolítica acinar**

La secreción hidroelectrolítica acinar consiste en un fluido isotónico rico en CINA, y la importancia cualitativa de la misma respecto a la secreción hidroelectrolítica ductular varía con la especie.

Como es conocido, la secretina provoca en perro, gato y posiblemente en hombre una secreción rica en bicarbonato procedente de la estimulación de las células ductulares, y la CCK, así como la estimulación vagal, produce una secreción rica en enzimas con una pequeña cantidad de fluido pobre en bicarbonato (Case y Argent, 1989). Sin embargo en rata, la CCK y los agonistas colinérgicos muscarínicos provocan una secreción fluida similar al plasma (Case, 1988; Sewell y Young, 1975).

En el mecanismo de secreción juega un papel fundamental el gradiente de sodio establecido en la membrana basolateral de las células acinares por la bomba de  $Na^+ - K^+$ ; en apoyo de esta teoría está el efecto inhibitorio secretor de la ouabaína, un inhibidor de dicha bomba, en la secreción estimulada por ceruleína (Evans y cols, 1986; Petersen y Ueda, 1977).

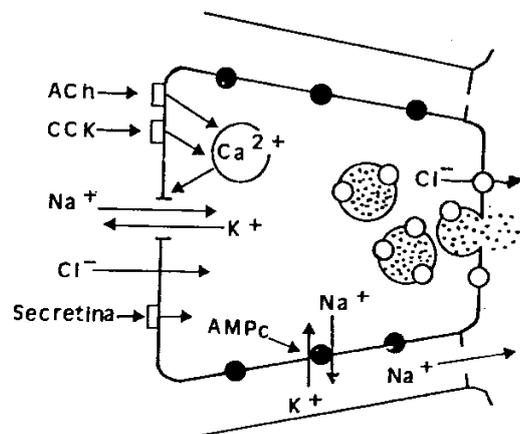
La sustitución de ion cloruro por bromuro en el medio de perfusión no produce un efecto significativo en el páncreas perfundido de rata estimulado con CCK (Kanno y Saito, 1978; Kanno y cols, 1983); sin embargo, la sustitución por acetato produce una reducción del 70% en la secreción estimulada por ceruleína (Seow y cols, 1986). Estos resultados indican que el transporte de fluido en las células acinares es dependiente de un suministro de aniones. En circunstancias

normales utilizan el cloruro extracelular; sin embargo otros aniones (como el acetato) pueden sustituir parcialmente al cloruro en el mecanismo secretorio (Case y Argent, 1989).

En cobaya, distintos estudios han establecido que la CCK provoca la secreción de un fluido rico en bicarbonato; este aumento en la concentración de bicarbonato puede explicarse por la existencia de proteínas de membrana transportadoras en el cobaya diferentes a las existentes en la rata (Padfield y cols, 1988). Experimentos realizados con acinos aislados de páncreas de cobaya demuestran que la ceruleína acelera la recaptación de sodio, lo cual posiblemente refleja la activación de canales de  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  (Dufresne y cols, 1985).

En contraste, en acinos aislados de rata, la ACh (que actúa de un modo similar a la ceruleína) no tiene efecto en el pH intracelular, sugiriendo que el transportador de  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  no es activado, lo cual no es una sorpresa en una especie que secreta más cloruro que bicarbonato. Estos datos demuestran que el patrón de la secreción pancreática acinar en el cobaya difiere del observado en otras especies (Padfield y cols, 1988; Rosado y cols, 1996).

El modelo de acoplamiento estímulo–secreción en la secreción electrolítica acinar está resumido en la figura 4. Algunos aspectos de este modelo son hipotéticos, incluyendo la naturaleza molecular del proceso transportador que media la entrada de  $\text{Na}^+$  y la salida de  $\text{Cl}^-$ , el mecanismo por el cual se regula la permeabilidad celular y el modo de interacción entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y el AMPc.



**Figura 4:** modelo de secreción electrolítica en la rata regulado por secretagogos.

## ***1.2 Secreción pancreática ductular***

La secreción enzimática del jugo pancreático es llevada a cabo totalmente por las células acinares; sin embargo, el componente hidroelectrolítico del jugo pancreático es secretado principalmente por las células ductulares. Dicho componente se origina de dos modos: 1-por secreción; 2-por filtración isosmótica; esto último trae como consecuencia que la concentración de cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) sea prácticamente igual a la del plasma y virtualmente independiente del volumen de flujo.

En contraste con los cationes, la concentración de los aniones en el jugo pancreático depende de la tasa de secreción y de la especie; así la concentración de bicarbonato en perro, gato y hombre aumenta con el volumen de flujo, mientras el ion cloruro sigue una relación inversa, de modo que la suma bicarbonato más cloruro es constante e independiente de la tasa de flujo (Hart y Thomas, 1945).

En el caso del ratón y de la rata, la estimulación con secretina en animales anestesiados, produce un incremento en la secreción de flujo con aumento de la concentración de bicarbonato, mientras la concentración de cloruros disminuye en la misma medida; sin embargo, la CCK o la ceruleína producen un aumento en la secreción de jugo pancreático manteniendo constantes las concentraciones de cloruro y bicarbonato. La estimulación conjunta con secretina y CCK produce incremento del flujo con concentraciones de bicarbonato y cloruro iguales a la suma aritmética de las respuestas individuales (Sewell y Young, 1975).

En el conejo, la concentración de bicarbonato aumenta a medida que lo hace la secreción de jugo pancreático estimulada por CCK o secretina, mientras las concentraciones de cloruro disminuyen en la misma medida (Seow y Young, 1986).

En el cobaya anestesiado, la estimulación con secretina o CCK produce una secreción rica en bicarbonato y pobre en cloruros, mientras las concentraciones de los iones sodio y potasio son similares a las plasmáticas (Case y cols, 1987).

Se han propuesto tres modelos celulares diferentes para explicar la secreción de electrolitos en la célula ductular; los tres dependen del gradiente de sodio creado por la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  que suministra la energía para el transporte activo de bicarbonato.

El primer modelo es el descrito por Swanson y Solomon en 1975, según el cual existe un transporte activo de iones  $\text{H}^+$  tanto en la membrana apical como en la basolateral. Así en el lado luminal se localiza un transporte activo primario, mediante una ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}^+$  y en la membrana basolateral un transporte activo secundario, mediante un mecanismo de intercambio  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  que utiliza la energía del gradiente de sodio. Los protones son liberados al lumen mediante la difusión pasiva de  $\text{CO}_2$  por el epitelio ductular y una posterior hidratación. En las células ductulares no se ha encontrado una ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}^+$ , pero sí una ATPasa dependiente de  $\text{Mg}^{2+}$  (Schulz y Terreros-Aranguren, 1982) que podría actuar como una bomba de protones en el lado luminal de la célula.

Según este modelo el resto de los iones ( $K^+$  y  $Cl^-$ ) atravesarían el epitelio pancreático mediante una ruta celular.

Scratcherd y Hudson (1982) han modificado este modelo incluyendo un mecanismo de intercambio  $HCO_3^- / Cl^-$  en la membrana luminal, sugiriendo que entre el 20 y 30% del bicarbonato total secretado lo hace por un intercambio con cloruro.

El segundo modelo es una modificación del anterior, con el fin de incluir la observación de que la mayor parte del sodio y potasio entran en el jugo pancreático por una ruta paracelular (Bonting y cols, 1980; De Pont y cols, 1982; Kuijpers y cols, 1984). En este caso se sugirió que la hidratación intracelular de  $CO_2$  conducía a un incremento en la concentración celular de bicarbonato, el cual podría atravesar la membrana luminal a favor de un gradiente electroquímico.

Ambos modelos se basan en la actividad de una bomba intercambiadora de  $Na^+/H^+$  en la membrana basolateral.

Kuijpers y cols (1984), propusieron un tercer modelo donde el sistema de intercambio  $Na^+/H^+$  en la membrana basolateral se sustituyó por un mecanismo de intercambio de aniones dependiente de un gradiente de  $Na^+$ , que transporta sodio y bicarbonato dentro de la célula y cloruro fuera de ella, y que podría incluir también una salida de protones. La formación de ácido carbónico intracelular mediante la anhidrasa carbónica suministraba sólo una pequeña parte del bicarbonato secretado por gradiente electroquímico en la membrana apical. La secreción de bicarbonato inducía la secreción de  $Na^+$  y  $K^+$  por una ruta paracelular y la secreción de cloruro y agua por medio de vías transcelulares o paracelulares.

## *2. Acoplamiento estímulo–secreción*

---

La función fisiológica de muchos tipos celulares está regulada por factores hormonales y neurotransmisores, lo cual es aplicable a las células acinares pancreáticas en las que actúan estos factores modulando su actividad secretora. Así, la secreción de jugo pancreático está controlada de forma fisiológica por las hormonas intestinales colecistocinina (CCK) y secretina, y por los neurotransmisores acetilcolina (ACh) y péptido intestinal vasoactivo (VIP). Existen otros péptidos que también pueden actuar como secretagogos, pero su papel fisiológico es menos conocido. Estos factores actúan generalmente en la membrana celular, produciendo cambios en los mecanismos fisiológicos intracelulares responsables de la exocitosis y la secreción de electrolitos.

El intento de explicación de estos mecanismos secretores intracelulares se inició en 1961 cuando Douglas y Rubin estudiaron la secreción de células cromafines. Estos autores desarrollaron el concepto de acoplamiento estímulo–secreción para referirse al conjunto de fenómenos que acontecen entre una señal extracelular y la respuesta celular a ésta. Estas señales extracelulares son factores nerviosos y humorales llamados “primeros mensajeros” o “mensajeros intercelulares”, que actúan en receptores específicos situados en la membrana basolateral en el caso de las células acinares del páncreas. Cuando estos receptores son activados se promueve una respuesta celular mediante la generación de “mensajeros intracelulares” o “segundos mensajeros”, que dan lugar a dicha respuesta actuando en otras moléculas denominadas “efectores”.

Han sido muchos los estudios realizados sobre la acción de agonistas y antagonistas en la secreción pancreática, demostrando claramente la presencia de receptores específicos para la CCK, bombesina (GRP), acetilcolina (ACh), VIP y secretina entre otros. Estos receptores pertenecen a una familia caracterizada por presentar siete dominios hidrofóbicos transmembranales y por interaccionar con un tipo de proteínas de membrana denominadas “proteínas G” o “proteínas de unión a guanina”. También se ha comprobado la existencia de receptores para factores de crecimiento como el EGF (epidermal growth factor), de estructura más sencilla (Korc y cols, 1983). Al igual que en la mayoría de los tejidos, los dos sistemas de acoplamiento estímulo–secreción mejor estudiados son la vía del AMPc y la vía de los fosfolípidos de inositol (FI) o vía del calcio. La idea básica consiste en que al ser activada la célula por un secretagogo, se produce un aumento en la concentración intracelular de AMPc o  $Ca^{2+}$ , respectivamente.

Los mecanismos intracelulares mediante los cuales los mensajeros intracelulares estimulan la exocitosis o la secreción fluida, son conocidos muy superficialmente. Aunque no se descarta la posible existencia de otros mecanismos, se sabe que los mensajeros intracelulares activan proteínas reguladoras, como cinasas y fosfatasas, que actuarían regulando el grado de fosforilación de proteínas funcionales.

## 2.1 Vía del AMPc

El AMPc es un mensajero intracelular que desempeña un papel fundamental en la regulación de la actividad exocrina del páncreas. Esta vía es activada por el grupo de agonistas de la familia de la secretina (secretina, VIP, PHI, GHRH, PACAP) como se infiere de los siguientes resultados:

**a)** El uso del agonista se acompaña de un aumento de la concentración intracelular de AMPc por la activación de la enzima adenilato ciclasa. Así, en acinos de cobaya (Pandol y cols, 1983; Jensen y cols, 1983; García y cols, 1997) se ha comprobado que los niveles celulares de AMPc aumentan de 8 a 30 veces cuando se les aplica secretina y VIP. Otras especies muestran un comportamiento similar (Robberecht y cols, 1977) (ratón, rata, perro y gato), aunque la respuesta ante una estimulación máxima es menor que en el caso del cobaya.

La forskolina, un diterpeno aislado de la raíz de *Coleus*, que activa la adenilato ciclasa actuando directamente en su subunidad catalítica, produce incrementos de hasta 30 veces la concentración de AMPc en células pancreáticas acinares (Heisler, 1983).

**b)** La secreción enzimática y electrolítica es estimulada al usar análogos permeables del AMPc, como el dibutiril AMPc y el 8-bromo AMPc (Heisler y cols, 1972, Robberecht y cols, 1977, Burnham y cols, 1984).

**c)** Cuando se emplean inhibidores de la fosfodiesterasa (teofilina, RO20-174 e IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) se observa un aumento en la actividad secretora, pequeños efectos en la concentración celular de AMPc e incluso potenciación de la secreción y de los aumentos de AMPc inducidos por agonistas como la secretina y el VIP (Gardner y cols, 1982). Se ha comprobado que la teofilina potencia más la acción de la secretina y el RO20-174 potencia más la del VIP, lo que hace pensar en una compartimentalización del AMPc producido por cada una de estas hormonas (Hootman y Williams, 1987).

Aunque la mayor parte de los datos se centran en las células acinares, también en las ductulares se ha comprobado que el AMPc es un mensajero intracelular (Folsch y Creutzfeldt, 1976; Schulz, 1987), siendo de hecho limitante para la producción de fluido y electrolitos por el páncreas exocrino (Kempen y cols, 1975).

Además de secretagogos que estimulan la vía del AMPc, otros pueden inhibirla, como son la somatostatina (Singh, 1985b) y la ACh (Singh, 1983). Esta, a concentraciones subnanomolares, inhibe el AMPc generado por la secretina y el VIP en acinos pancreáticos de cobaya, lo que concuerda con su capacidad de inhibir in vivo la liberación de amilasa.

### **2.1.1 Receptores**

En acinos pancreáticos de cobaya hay dos clases de receptores específicos para el VIP y la secretina (Jensen, 1994): un primer tipo preferente para la secretina (con alta afinidad por la secretina y baja por el VIP) y un receptor preferente para el VIP (con alta afinidad por el VIP y baja por la secretina).

El estímulo de los receptores de VIP de alta afinidad se acompaña de un incremento del AMPc celular que parece ser el causante de la secreción enzimática en acinos aislados (Gardner y Jensen, 1981). Esto fue ratificado por estos mismos autores cuando observaron que tanto el VIP como la secretina ejercen su acción secretora mediante la estimulación de receptores de alta afinidad para el VIP (Gardner y cols, 1982). Por otro lado, recientes observaciones sugieren que la estimulación de receptores de secretina de alta afinidad incrementan el transporte iónico y los niveles de AMPc (Hootman y cols, 1983), pero no la secreción. Junto con otros datos, estas observaciones nos hacen pensar que, al menos en el páncreas de cobaya, los niveles de AMPc se modulan por secretina y VIP pero en compartimentos separados, lo que puede indicar que regulan actividades celulares distintas.

### **2.1.2 Proteínas G y adenilato ciclasa**

Como ya hemos indicado, los receptores de membrana para los secretagogos mencionados transmiten la información al interior celular mediante su interacción con proteínas G intermediarias, las cuales activan la enzima adenilato ciclasa (AC), que cataliza la formación de AMPc a partir de ATP.

Las proteínas G son heterotrímeros situados en la cara interna de la membrana plasmática, compuestos por tres subunidades llamadas  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ , (Birnbaumer y cols, 1987). El nombre de proteína G se debe a que para su activación se unen al nucleótido de guanina GTP (trifosfato de guanina) (Bolander, 1989; Hardie, 1991). Las proteínas G han sido clasificadas en estimuladoras ( $G_s$ ) e inhibidoras ( $G_i$ ) en relación con la existencia de dos subunidades distintas  $\alpha_i$  y  $\alpha_s$  (Spiegel y cols, 1990). Estas subunidades se diferencian por su sensibilidad a la toxina del cólera y a la toxina *pertussis*, las cuales catalizan la ADP-ribosilación de la subunidad  $\alpha_s$  y  $\alpha_i$ , respectivamente, modificándolas funcionalmente. Así, la toxina del cólera imita la acción del VIP y de la secretina en la adenilato ciclasa, mientras

que la toxina *pertussis* bloquea la acción inhibitoria de la somatostatina en la adenilato ciclasa (Yule y Williams, 1994).

El modelo de activación de la proteína G se basa en la existencia en la subunidad  $\alpha$  de un lugar de unión para el nucleótido de guanina, que en estado basal está ocupado por una molécula de GDP. Cuando el secretagogo se une al receptor, éste interacciona con la proteína G, liberándose GDP, que es sustituido por GTP. Es entonces cuando la subunidad  $\alpha$  de la proteína G se disocia del complejo  $\beta\gamma$  y activa la adenilato ciclasa. La subunidad hidroliza el GTP hasta GDP y entonces se reasocia con el complejo  $\beta\gamma$ , inactivándose. Al contrario de la  $G_i$  y de lo que se pensaba inicialmente, parece que la proteína  $G_s$  está constantemente unida a la adenilato ciclasa (Birnbaumer y cols, 1987), aunque su activación implique la disociación de las subunidades.

La adenilato ciclasa posee tres formas bioquímicamente distintas: una forma sensible a la calmodulina, localizada por primera vez en cerebro y una forma insensible a la calmodulina, localizada en distintos tejidos, entre ellos el páncreas. Otro tercer tipo ha sido encontrado exclusivamente en testículo. Estas formas son proteínas de membrana localizadas en la membrana basolateral de las células acinares (Zajic y Schacht, 1983).

### 2.1.3 Efectores

El AMPc activa los mecanismos efectores responsables del efecto biológico de los agonistas. El AMPc se une a la proteína cinasa dependiente de AMPc (proteína cinasa-A), concretamente a la subunidad reguladora de ésta, permitiendo su disociación, con la consecuente activación de la subunidad catalítica.

La función exacta de la PK-A es aún desconocida, si bien se sabe que fosforila proteínas endógenas todavía no bien identificadas, que participan directamente en el fenómeno de exocitosis. En acinos de rata se ha demostrado que la secretina y el VIP aumentan la fosforilación de una proteína ribosomal de 2900 daltons (Vandermeers y cols, 1984). El uso de análogos sintéticos del AMPc inducen en páncreas de ratón fosforilación de proteínas (Roberts y Butcher, 1983). En acinos pancreáticos de rata y gato se ha conseguido aislar una fosfoproteína identificada como proteína ribosomal 32 KD cuya fosforilación es aumentada por CCK, carbolol, secretina e insulina, y está regulada por la cinasa S6, activada por segundos mensajeros (Sung y Williams, 1989; Yule y Williams, 1994).

En cuanto a los efectores de la secretina y del VIP en la secreción electrolítica se sabe bastante poco. Se cree en la existencia de canales específicos regulados por el AMPc, al menos en el páncreas de cobaya, distintos de los modulados por el calcio intracelular. Esto se basa en los resultados obtenidos por Hootman y Williams (1987) en esta especie. En acinos de páncreas de perro también se ha comprobado la activación de canales iónicos por el AMPc (Suzuki y cols, 1992).

## **2.2 Vía de los fosfolípidos de inositol**

Si bien la secretina y el VIP actúan como reguladores de la secreción de jugo pancreático, especialmente del componente electrolítico, los secretagogos fisiológicos más potentes son el neuropéptico CCK y el neurotransmisor ACh. Al igual que otros factores (GRP, neuromedina C y sustancia P) estos mensajeros extracelulares actúan por la vía de los fosfolípidos de inositol. Esta ruta de señalización intracelular es bastante más compleja que la vía del AMPc, y es objeto de un intenso estudio en numerosos modelos experimentales. De hecho, aunque conozcamos su estructura general, aún son muchos los interrogantes no resueltos.

Tras la unión del agonista a su receptor se produce la activación, vía proteína G, de la PLC. Esta hidroliza fosfatidilinositoles, especialmente el PIP<sub>2</sub>, generando dos tipos de mensajeros: DAG y Ins (1,4,5)P<sub>3</sub>, que a su vez desencadena un aumento en la concentración de calcio citosólico ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), que sigue un complejo patrón espacio-temporal.

### **2.2.1 Receptores**

En las células acinares existen receptores para la CCK (de alta y baja afinidad) (Menozzi y cols, 1991) y la ACh (del tipo M3, también clasificados en alta y baja afinidad) (Suzuki y cols, 1992; Jensen, 1994). En ambos casos su ocupación produce un incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, el metabolismo de los lípidos de inositol y los niveles celulares de DAG (Dixon y Hokin, 1984; Doughney y cols, 1987; Matozaki y cols, 1989).

### **2.2.2 Proteínas G y fosfolipasa C**

Como en otros tejidos, distintos estudios han demostrado que en el páncreas exocrino hay proteínas G implicadas en esta vía (Schulz y cols, 1988). Aunque hay cierta divergencia de resultados, los últimos estudios indican que los receptores de la CCK y ACh activan la PLC mediante diferentes proteínas G (Schulz y cols, 1988; Schnefel y cols, 1988). Al menos aparentemente, las proteínas G en las células acinares parecen ser un complejo eslabón en las vías intracelulares: se han identificado 15 diferentes subunidades. Las que conectan el receptor de CCK con la PLC parecen ser ciertas proteínas Gs o Gi, lo que sugiere un punto de interacción con la vía del AMPc (Schnefel y cols, 1988).

La fosfolipasa C es una familia de enzimas presentes en muchos tipos celulares, aunque no se sabe exactamente su localización (Catt y Balla, 1989). Mediante procesos de purificación y clonación molecular se han evidenciado unas 9 formas de PLC encuadradas dentro de 4 familias: alfa, beta, gamma y delta. Las PLC hidrolizan el enlace éster entre el glicerol y el grupo fosfato del inositol existente en

la estructura de los FI, generando diacilglicerol (DAG) y fosfato de inositol y aunque también hidrolizan PIP y PI(4)P, tienen mayor afinidad por el PI(4,5)P<sub>2</sub> (Catt y Balla, 1989).

La PLC necesita de la presencia de calcio, que estimula su actividad en intervalos de hasta 1 μmolar. Esto permite pensar en un posible efecto de retroalimentación positiva del calcio.

Además de fosfolipasa C que hidroliza lípidos de inositol, también existen otros enzimas que hidrolizan fosfolípidos de colina y cuya función es activada por la CCK en el páncreas (Pandol y cols, 1991).

### ***2.2.3 Importancia y mecanismo de movilización del calcio***

Son muchos los estudios de los que se deduce que los secretagogos activadores de la vía de los fosfolípidos de inositol (ACh, CCK) aumentan la concentración del [Ca<sup>2+</sup>]; que actuaría como un mensajero intracelular necesario en su efecto en el páncreas. Además de estos primeros mensajeros existen otras sustancias que también movilizan el calcio citosólico, como bombesina (Pandol y Mendius, 1988), sustancia P (Sjodin y cols, 1990), y neuromedina C (Arita y cols, 1991b).

La concentración citoplasmática del Ca<sup>2+</sup> iónico en células pancreáticas no estimuladas es de 100–200 nM, siendo la concentración extracelular de calcio 1–2 mM, y la estimada para otros orgánulos superior a 10 μM. El calcio tiende a penetrar hacia el interior celular por la membrana plasmática gracias al gradiente descrito y al potencial eléctrico intracelular negativo. Este gradiente electroquímico es contrarrestado por la acción de una ATP-asa dependiente de Mg<sup>2+</sup> y activada por Ca<sup>2+</sup>-calmodulina localizada en la membrana plasmática y que bombea Ca<sup>2+</sup> al exterior celular.

Existen además depósitos intracelulares de almacenamiento de calcio, preferentemente en el retículo endoplásmico, según se desprende de estudios realizados sobre la movilización del calcio a cargo del Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (Strebs y cols, 1983) y de estudios estructurales (Walz y Baumann, 1989) y bioquímicos (Dormer y Williams, 1981). Hay distintas opiniones acerca de la localización e identidad del depósito, algunos lo describen como una zona especializada del retículo endoplásmico pero separado físicamente de él; incluso se ha propuesto la existencia de un orgánulo específico, los calciosomas (Volpe y cols, 1988). Tampoco se conoce su ubicación celular: mientras unos la sitúan cerca de la membrana plasmática (Hase y cols, 1984), otros lo sitúan incluso en el núcleo celular (Nicotera y cols, 1990)

Los datos que demuestran la intervención del ion calcio en el proceso de exocitosis del páncreas, son los siguientes:

1. El estímulo de células acinares pancreáticas con secretagogos que utilizan esta vía se ve acompañada de un incremento en los niveles de calcio libre citoplasmático (Petersen, 1992).

2. Los secretagogos producen en 5–10 minutos una pérdida neta de calcio celular de hasta un 25% del total (Hootman y Williams, 1987; Tepikin y cols, 1992) que posteriormente es captado desde el medio extracelular (Schulz y Kondo, 1976).

3. La secreción enzimática en respuesta a secretagogos disminuye o desaparece cuando se reducen los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto intra como extracelular, mientras que los ionóforos del calcio producen respuesta secretora (Muallem y cols, 1989).

Los primeros estudios se realizaron con fragmentos de páncreas donde se siguió el flujo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (Mathew y cols, 1973; Schulz y Kondo, 1976). Se observó que el aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la secreción inicial producidos por un estímulo son independientes del calcio extracelular, aunque el mantenimiento de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  y la secreción sostenida depende de presencia de calcio extracelular. Esto sugirió la existencia de dos fases en las respuestas mediadas por el calcio:

- una fase inicial, en la que se moviliza el calcio acumulado en almacenes intracelulares.

- una fase sostenida o tardía en la que predomina la entrada de calcio extracelular lo que permite la respuesta secretora y la recarga de los depósitos intracelulares (Schulz y Kondo, 1976).

Con la introducción de indicadores fluorescentes de calcio iónico capaces de penetrar en el citoplasma (Tsien y Tsien, 1990), ha sido posible caracterizar el patrón de movilización del calcio en numerosos tipos celulares.

En las células acinares pancreáticas de cobaya y otras especies, la CCK, la ACh y otros secretagogos producen un aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que llega a su máximo en los primeros 2–5 segundos, para posteriormente reducirse hasta valores cercanos a los basales (Sung y cols, 1988; Pandol y cols, 1989). Este patrón de respuesta fue estudiado en suspensiones acinares en las que se determinó la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  de una población celular.

Al desarrollarse técnicas para la cuantificación microscópica del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células individuales se descubrió, en hepatocitos (Cuthbertson y cols, 1981), la existencia de oscilaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Estas oscilaciones, tanto temporales como espaciales, pasaban desapercibidas con las técnicas de medida precedentes, ya que los ciclos en células diferentes no están forzosamente sincronizados.

Las oscilaciones son muy variables entre distintos tipos celulares, e incluso un mismo tipo celular puede presentar múltiples respuestas a un mismo estímulo. En las células acinares se han descrito dos tipos (Petersen, 1992; Toescu, 1995):

- ondas de propagación del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por el citosol o desde células adyacentes del acino

- oscilaciones o ritmos de  $[Ca^{2+}]_i$  (oscilaciones temporales). La generación de estas oscilaciones o ritmos depende de la concentración de secretagogo. Estas oscilaciones pueden ser de dos tipos, las que parten del nivel basal (transitorias) y espigas superpuestas a una elevación del  $[Ca^{2+}]_i$  medio (sinusoidales).

La ACh a bajas concentraciones (200 nM) produce oscilaciones sinusoidales, mientras que la CCK a concentraciones postprandiales (20 pM) produce oscilaciones transitorias (Petersen y cols, 1991). Sin embargo a altas concentraciones ambos agentes producen respuestas sostenidas, similares a las observadas en determinaciones en masa. En cualquier caso, la señal de  $Ca^{2+}$  es sumamente variable, de modo que en una misma pulsación se pueden observar distintos patrones de respuesta; si bien, las células integrantes de un mismo acino responden de la misma manera (Toescu, 1995). También se han observado, en respuesta a concentraciones umbrales de secretagogos, oscilaciones locales de  $[Ca^{2+}]_i$  en el polo apical que no se extienden al resto del citosol. (Thorn y cols, 1993).

El  $Ca^{2+}$  también actúa como mensajero intracelular en las células ductulares del páncreas de cobaya (Stuenkel y Hootman, 1990) y otras especies (Evans y cols, 1990).

### Papel del Ins (1,4,5) P<sub>3</sub>.

El Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, generado por la PLC, libera el  $Ca^{2+}$  acumulado en depósitos intracelulares (Streb y cols, 1983 y 1984) mediante su unión a un receptor específico situado en la membrana del RE (Tsien y Tsien, 1990).

La unión al receptor es más específica para el estereoisómero D-Ins (1,4,5)P<sub>3</sub>, y puede inhibirse con heparina. La liberación de calcio es un proceso cooperativo que se produce cuando se unen 3 moléculas de Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (Nahorsky y Potter, 1989). El receptor libera calcio del depósito por gradiente electroquímico (en el retículo la concentración de  $Ca^{2+}$  total es menos de 1mM; Williams y cols, 1985) al abrir un canal (Berridge e Irvine, 1989) que parece ser la misma molécula que el receptor (Boynton y cols, 1990). Por cada molécula de inositol se liberan 20 iones de calcio mediante un fenómeno de amplificación (Berridge e Irvine, 1984).

Se han sugerido dos posibles mecanismos moduladores del funcionamiento de este canal. Por un lado la PK-A puede fosforilar al receptor reduciendo la capacidad de liberación del  $Ca^{2+}$  (aunque no la afinidad por el Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) (Boynton y cols, 1990). Por otro lado el  $Ca^{2+}$  puede bien inhibir la unión del Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> al receptor mediante la proteína calmedina (Danoff y cols, 1988) o bien facilitar la apertura del canal vía CAM (Hill y cols, 1988). Sin embargo, en las células acinares del páncreas no parece ser necesaria ninguna reacción metabólica para la actuación del Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (Schulz y cols, 1989).

Puesto que hasta un 50–70 % del  $Ca^{2+}$  total es movilizable por los agonistas pero no puede ser liberado por el Ins (1,4,5)P<sub>3</sub> (Berridge e Irvine, 1989), se sugirió la existencia de dos depósitos intracelulares de calcio, uno sensible al Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> y otro insensible al Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, (aunque no se sabe si realmente se trata de dos

compartimentos físicamente distintos). La movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el depósito insensible al  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  parece deberse a “liberación de calcio producido por calcio” (LCPC), descrito por primera vez en miocitos y luego en páncreas y otros tejidos: una pequeña elevación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  libera  $\text{Ca}^{2+}$  del depósito insensible al  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  al abrir un canal en su membrana (Wakui y cols, 1990). Además es posible que proteínas de unión a nucleótidos de guanina, activadas por GTP, transvasen  $\text{Ca}^{2+}$  desde el depósito no movilizable por el  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  hasta el movilizable, incrementando la liberación total de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  (Berridge e Irvine, 1989). Recientemente se ha propuesto que la ribosa ADP cíclica (formada por GMPc en respuesta a óxido nítrico) sería el mensajero natural liberador del  $\text{Ca}^{2+}$  de este depósito en las células acinares pancreáticas (Thorn y cols, 1994).

Una vez que los niveles citoplasmáticos se han elevado debido a la liberación desde los depósitos, se observan tres fenómenos: salida del  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma, entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y recarga de los depósitos intracelulares

### ***1. Salida de calcio desde el citoplasma.***

Aunque los estudios con  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  indicaron hace ya una década la pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  celular al estimular las células pancreáticas, no ha sido hasta 1992 cuando este fenómeno se ha comprobado y cuantificado directamente (Tepikin y cols, 1992). El transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática se realiza mediante una bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de ATP y  $\text{Mg}^{2+}$  (Muallem y cols, 1989). Esta bomba es posiblemente activada por la PK-C (Muallem y cols, 1988) y el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (Muallem y cols, 1989).

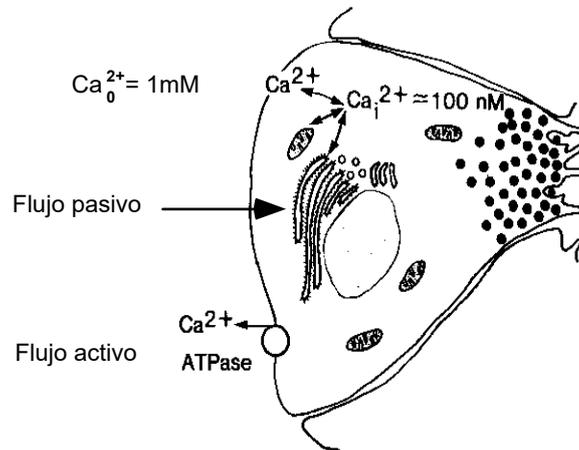
### ***2. Entrada de calcio y recarga de los depósitos.***

La entrada de calcio extracelular, necesaria para el mantenimiento de la respuesta secretora, está favorecida por el gradiente de concentración que hay en la membrana plasmática y permite la recarga de los depósitos intracelulares del mismo.

Se ha observado que la entrada de calcio extracelular se activa en pocos segundos en respuesta a los agonistas (Toescu y Petersen, 1995). En las células pancreáticas exocrinas el canal de entrada del calcio no es específico de este catión (Maruyama y Petersen, 1982).

La entrada de calcio extracelular depende exclusivamente del grado de vaciamiento del depósito y no de la acción directa del agonista (Pandol y cols, 1987). Así, aunque no esté actuando el agonista, la permeabilidad de la membrana está claramente incrementada mientras los depósitos intracelulares estén vacíos. Para explicar esta estrecha relación entre la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y el nivel de los depósitos intracelulares, Putney propuso en 1986 un “modelo capacitativo” en el que el grado de llenado de los depósitos sensibles al  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  es el factor desencadenante de la entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, que pasaría directamente desde el exterior al depósito sin pasar por el citoplasma. Esto sería posible si existe una conexión directa entre la membrana plasmática y el depósito, lo que no ha sido comprobado directamente. No se sabe exactamente si es el vaciamiento de los

depósitos sensibles al  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  la señal para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , o si es el vaciamiento del depósito no sensible al  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , cuyo contenido puede pasar al sensible al  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  mediante el  $\text{IP}_4$  con colaboración del GTP (Berridge e Irvine, 1989).



**Figura 5:** representación esquemática de los depósitos y flujos de calcio en la célula acinar pancreática.

Actualmente se desconoce cual es el mecanismo que abre el canal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Algunas teorías proponen una posible conexión entre la membrana plasmática y los depósitos, la intervención de tirosinas cinasas,  $\text{IP}_4$ ,  $\text{GMPC}$ , o del citocromo  $\text{P}_{450}$  (Penner y cols, 1993).

Una vez que el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular comienza a entrar, aunque algunas teorías postulaban que el  $\text{Ca}^{2+}$  pasaba directamente desde el medio extracelular al depósito, parece claro que el depósito capta  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol (Muallem y cols, 1990). De hecho en las células acinares de páncreas se produce un pequeño aumento del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durante la recarga de los depósitos.

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en los depósitos se produce por transporte activo. En páncreas exocrino se ha demostrado la existencia de una bomba de protones en la membrana del depósito sensible al  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , que crea un gradiente químico utilizado para captar el  $\text{Ca}^{2+}$  mediante intercambio  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ . Esta captación se realiza cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el depósito sensible al  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  es alta (hasta  $1 \mu\text{M}$ ) En el depósito insensible al  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  el transporte lo realiza una  $\text{Ca-ATPase}$  (Schulz y cols, 1989).

Hoy se considera que, al menos en el páncreas y otros tejidos no excitables, las oscilaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  son consecuencia de la liberación y acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  por los depósitos intracelulares, aunque el mecanismo exacto es desconocido. Se cree

que el efecto bifásico del  $\text{Ca}^{2+}$  en los depósitos coopera en las oscilaciones: liberaría  $\text{Ca}^{2+}$  cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es baja pero inhibe cuando  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es alta (Petersen y cols, 1991). De hecho, una adecuada disposición de los depósitos a lo largo de la célula y el tamponamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  por el citosol y por estos depósitos haría posible una adecuada propagación de la onda de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el polo luminal (Kasai y Augustine, 1990; Petersen, 1992). En cualquier caso, la complejidad de las oscilaciones registradas hasta ahora hacen posible que en una célula se desarrollen distintos mecanismos que puedan ser compatibles entre sí.

Las ondas y ciclos de propagación de  $\text{Ca}^{2+}$  deben ser una forma de coordinar distintos procesos celulares y de propagar de forma ordenada la información a distintos puntos del interior celular.

### Mecanismo efector del calcio

El ion calcio ejerce buena parte de sus efectos mediante una molécula ubicua llamada calmodulina. Esta, cuando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentan, une cuatro iones de  $\text{Ca}^{2+}$  con lo que sus grupos hidrófobos interaccionan con cuatro proteínas, a las que regula.

La calmodulina, descrita en el páncreas por Vandermeer y cols (1977), activa proteínas reguladoras como enzimas fosfatasas, fosfodiesterasas y cinasas dependientes del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (Hootman y Williams, 1987). En el citosol de las células acinares existen proteínas cinasas dependientes de calcio (Sung y Williams, 1988) al igual que en los gránulos de zimógeno (Burnham y cols, 1985).

Es probable que la fosforilación de las proteínas dianas citadas conduzca a la activación de la secreción pancreática. Así se han descrito dos proteínas celulares (21 KDa, 20.5 KDa), cuyo grado de fosforilación depende de la concentración de secretagogos y es paralela a la secreción inducida por éstos, lo que hace pensar que intervienen en la secreción (Burnham y Williams, 1982)

También se han realizado estudios sobre el papel del calcio en los mecanismos intracelulares que producen secreción electrolítica. En el páncreas exocrino, se ha demostrado la activación de distintos canales catiónicos y de  $\text{Cl}^-$  dependientes del  $\text{Ca}^{2+}$  (Petersen, 1992). Esto desencadena un transporte de iones y agua en las células acinares que forma parte del proceso secretor. También en las células ductulares existe este tipo de canales (Plant y cols, 1992).

### Papel del diacilglicerol

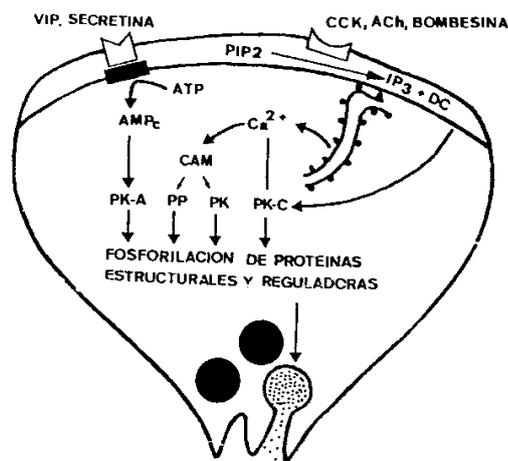
El diacilglicerol, la otra molécula resultado de la hidrólisis de los fosfolípidos de inositol por la PLC, también se comporta como un mensajero intracelular, ejerciendo sus efectos por medio de la proteína cinasa C, presente en todos los tejidos. La estimulación de los receptores pancreáticos colinérgicos y de CCK, aumenta en el páncreas la producción de DAG en dos fases: tras una elevación rápida aparece una segunda fase en la que los niveles de DAG se mantienen altos de forma

constante y prolongada (Dixon y Hokin, 1984; Matozaki y Williams, 1989). El DAG participa en la respuesta secretora: su aplicación produce liberación de enzimas (Francis y Singh, 1990).

El DAG actúa activando la PK-C, que se halla presente en las células pancreáticas (Wrenn, 1983) incluso en los gránulos de zimógeno (Wrenn, 1984). Esta enzima fosforila residuos de Ser y Thr (Nishizuka, 1988) al ser activada por DAG y  $\text{Ca}^{2+}$ , asociándose entonces a la membrana celular (Bazzi y Nelsestuen, 1989). La enzima PK-C puede sufrir dos procesos: uno de reducción de la cantidad de enzima (Sung y cols, 1988) por activación, y otro de autofosforilación (Jaken, 1989), que incrementa su actividad.

El uso de ésteres de forbol, activadores de la PK-C, estimula la secreción pancreática in vivo (De Pont y Fleuren-Jakobs, 1884; Sung y cols, 1988; Camello y cols, 1993) e in vitro, además de modular la secreción y la movilización de calcio inducida por secretagogos (Francis y cols, 1990; Camello y Salido, 1993; Toescu, 1995).

El DAG puede ser generado no solo junto con Ins (1,4,5) $\text{P}_3$ , sino independientemente de él (y por tanto sin señal de calcio asociada), por la acción de la PLC en PI, PIP o en fosfatidilcolina, además de por la activación de PLD. En las células acinares del páncreas ambas rutas resultan activadas por secretagogos (Rydzewska y cols, 1993).



**Figura 6:** acoplamiento estímulo-secreción de la célula acinar pancreática durante la secreción proteica.

## **2.3 Otras posibles vías**

### **2.3.1 El GMPc como posible mensajero intracelular**

Aunque la vía del  $\text{Ca}^{2+}$  y la del AMPc son las más estudiadas y conocidas, existen otros mecanismos de señalización intracelular, aunque peor conocidos.

Así, un posible mensajero intracelular es el GMPc (guanosín monofosfato cíclico). La ACh, CCK e ionóforos del  $\text{Ca}^{2+}$ , como el A23187, incrementan los niveles intracelulares de GMPc (Christophe y cols, 1976; Kapoor y cols, 1978). Puesto que la elevación de los niveles de GMPc usando análogos o activando la guanilato ciclasa con nitrosourea o nitroprusiato, no produce liberación de amilasa ni flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ , se pensó que el incremento de GMPc es secundario a la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  (Gunther y Jamieson, 1979; Menozzi y cols, 1989). Sin embargo, recientemente Pandol ha demostrado que el GMPc activa en acinos pancreáticos la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Pandol y cols, 1994) y que la entrada de calcio inducida por secretagogos es reducida por inhibidores de la vía del NO (vía activada por el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas células). Así han postulado la teoría de que al vaciarse los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  el NO induce la entrada de calcio, aumentando el GMPc al activar la guanilato ciclasa.

### **2.3.2 Efectos del ácido araquidónico en la secreción pancreática**

Secretagogos pancreáticos como CCK y carbacol, aumentan los niveles de ácido araquidónico (AA) libre en las células acinares (Dixon y Hokin, 1984; Pandol y cols, 1991). Su síntesis podría deberse a la hidrólisis de la fosfatidilcolina a cargo de la fosfolipasa A2 junto con la secuencia PLC-DAG cinasa actuando en distintos fosfolípidos (Dixon y Hokin, 1984; Pandol y cols, 1991). En cuanto a la acción del ácido araquidónico en la secreción pancreática se han observado efectos inhibidores (Maruyama, 1990) y efectos estimulantes (Stenson y Lobos, 1982; Pandol y cols, 1991). En acinos de cobaya la presencia de ácido araquidónico produce una pequeña estimulación en la liberación de amilasa; sin embargo en acinos de rata el ácido araquidónico sólo incrementa la liberación de amilasa a altas concentraciones. El efecto estimulante puede estar relacionado con un incremento de calcio (Pandol y cols, 1991; Tsunoda y Owyane 1993) o con la síntesis de leucotrienos y prostaglandinas, aunque los datos existentes son contradictorios.

### 2.3.3 Fosforilación de proteínas

En los últimos años se han ido acumulando evidencias de la existencia de una compleja cascada de señales intracelulares dependientes de la fosforilación de proteínas. Consecuentemente se ha estudiado la actividad cinasa y su posible papel en la secreción pancreática, y también en otros fenómenos mediados por secretagogos clásicos, como la CCK, que no pueden ser categorizados mediante las rutas intracelulares ya descritas. Entre estos otros procesos encontramos la mitogénesis de las células pancreáticas en cultivo, la inducción de la respuesta génica temprana por la CCK, el crecimiento celular o la apoptosis.

Tras el hallazgo de actividad cinasa S6 en lisados acinares, se ha identificado la proteína ribosomal S6 como una fosfoproteína reguladora pancreática (Sung y Williams, 1989), que puede incrementar su actividad tras la estimulación celular con CCK. Posteriormente se han aislado y clonado dos familias de cinasas S6: una de 90 KDa (p90<sup>s6k</sup>) (Bragado y cols, 1997a) que es activada por fosforilación por las MAPK (mitogen-activated protein kinase), y una de 70 KDa (p70<sup>s6k</sup>) (Bragado y cols, 1997b) que es activada por factores de crecimiento, independiente de las MAPK y sensible a rapamicina. Existen, además, otra gran variedad de proteínas pancreáticas con actividad TK (Lutz y cols, 1993).

#### *Activación de las cascadas MAPK*

Hay al menos 3 cascadas paralelas de MAPK (Cano y Mahadevan, 1995) que dependen de la actividad cinasa de 3 grupos de proteínas identificadas como MAP cinasa, MAP cinasa cinasa y MAP cinasa cinasa cinasa. La primera implica la activación de 2 proteínas: p44 y p42 MAPK, también conocidas como ERK1 y ERK2 (extracellular-regulated protein kinase) respectivamente (Dabrowski y cols, 1996; Duan y cols, 1995). Éstas se activan por concentraciones fisiológicas de CCK, tanto *in vivo* como *in vitro*. Junto a éstas se activan simultáneamente otras dos proteínas: una serina-treonina cinasa denominada Raf; y la pequeña proteína G llamada Ras. Todas ellas están implicadas en la cascada de las proteínas cinasa MAP, que parece mediar la respuesta trófica pancreática inducida por la CCK. Es interesante conocer, como implicación directa de esta cascada de proteínas cinasa, que más del 90% de cualquier tipo de cáncer pancreático posee la proteína Ras permanentemente activada por mutación. Este hecho hace pensar que esta cascada de señales está implicada en la mediación de los efectos tróficos que muestra la CCK en varias especies.

La segunda cascada de MAPK implica la activación de una cinasa de tipo *jun* (JNK), también conocida como proteína cinasa activada por estrés (SAPK, stress-activated protein kinase) (Kyriakis y cols, 1994). La CCK es capaz de activar las dos isoformas de JNK (p46 y p55), en acinos y en páncreas intacto (Dabrowski y cols, 1996). Sin embargo, la activación es lenta y requiere concentraciones mucho mayores que las requeridas para activar las ERKs. Estas diferencias en el patrón de activación, junto con el hecho de que los ésteres de forbol son potentes activadores de las ERKs y no de las JNKs, parecen indicar un mecanismo de activación

diferente. Debido a que concentraciones altas de CCK inducen pancreatitis en rata, se ha concluido que la activación de JNKs en respuesta a CCK podría ser una respuesta de estrés y, por lo tanto, más relevante en la regulación fisiopatológica pancreática.

Se conoce mucho menos acerca de la tercera ruta MAPK, que implica la activación de la proteína p38/RK. Su homóloga p38, encontrada en las levaduras, es activada por hiperosmolaridad. En las células de mamíferos, se cree que la p38 activa (o reactiva) es la cinasa que fosforila la pequeña proteína de *shock* térmico 27 (HSP27, heat shock protein). HSP27 podría estar implicada en el reordenamiento del citoesqueleto que ocurre en la célula acinar durante la secreción y está exacerbado en la pancreatitis (Groblewski y cols, 1997).

### ***Activación de proteínas con actividad TK***

Estudios muy recientes indican que la CCK activa al menos otros dos sistemas de señales distintos. Uno de ellos implica la activación de la p70<sup>s6K</sup>, y probablemente también requiere la PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) como intermediario. La activación en acinos de la p70<sup>s6K</sup> es independiente de los cambios de Ca<sup>2+</sup>, de la PKC y del AMPc, pero puede ser bloqueada por el inmunosupresor rapamicina, y también por el inhibidor específico de la PI3K, wortmannina. En otras células, la p70<sup>s6K</sup> es responsable de la fosforilación de la proteína ribosomal S6 y en algunas células es requerida para la progresión del ciclo celular (Bragado y cols, 1997b).

El otro sistema activado por CCK en acinos depende de la tirosina cinasa citosólica p125<sup>FAK</sup> (p125 focal adhesion kinase), y de su sustrato, la proteína del citoesqueleto paxilina, que están asociadas con las placas de adhesión focal. Se ha demostrado que la CCK incrementa la actividad TK de estas proteínas en células acinares pancreáticas, a través de la activación de sus receptores de alta y baja afinidad (García y cols, 1997).

Por otra parte, la fosforilación en restos de tirosina de estas dos proteínas se ha implicado recientemente en el mecanismo de acción de varios neuropéptidos que se comportan como potentes factores de crecimiento celulares. Estos neuropéptidos tienen efectos en el crecimiento y en la reorganización del citoesqueleto, y dichos efectos dependen de la activación de receptores asociados a proteínas G. La bombesina, la vasopresina y la endotelina, estimulan la fosforilación en restos de tirosina de múltiples sustratos, tanto en el tipo celular Swiss3T3 como en otras células. Entre esos sustratos se incluye la p125<sup>FAK</sup> (Zachary y cols, 1992; Sinnott-Smith y cols, 1993) y la paxilina (Zachary y cols, 1993). Varios investigadores han descrito recientemente que la p125<sup>FAK</sup> y la paxilina son también fosforiladas por efecto de las integrinas, oncogenes (Lipfert y cols, 1992; Rozengurt, 1995) y factores de crecimiento como el EGF o el PDGF (Rankin y Rozengurt, 1994). Más aún, recientes estudios con bombesina demuestran que la activación de esta vía intracelular es necesaria en la mediación de los efectos tróficos de esa sustancia en células Swiss3T3 (Seckl y Rozengurt, 1993). Por lo tanto, la fosforilación de la p125<sup>FAK</sup> y de la paxilina podría representar un punto de convergencia en la acción de neuropéptidos mitógenos, integrinas, oncogenes y factores de crecimiento.

## **2.4 Efectos de la histamina en la secreción pancreática**

La histamina es una hormona local o autacoide, producto de la descarboxilación del aminoácido histidina, que fue aislada a partir de tejidos biológicos hace aproximadamente 60 años. Desde entonces se han llevado a cabo numerosos estudios sobre las funciones de la histamina, su biosíntesis y degradación y el modo de acción de la misma.

La histamina ejerce sus acciones activando receptores específicos de membrana. Hasta ahora se han identificado tres tipos de receptores de la histamina: H1, H2 y H3. Los receptores H1, son bloqueados por antagonistas clásicos como mepiramina (Ash y Schild, 1966). El segundo tipo, H2, es específicamente bloqueado por cimetidina (Black y cols, 1972). Arrang y cols (1983) encontraron el tercer tipo de receptores, H3, en el tejido cerebral. Este último tipo de receptores posee propiedades farmacológicas distintas a los anteriores, interviniendo en la transmisión sináptica de neuronas histaminérgicas. Los receptores H3 son susceptibles de ser bloqueados por tioperamida.

El efecto de la histamina en la secreción pancreática ha sido estudiado en el páncreas de perro, tanto *in vivo* (Tankel y cols, 1957) como *in vitro* (Iwatsuki y cols, 1981), en primates (Iwatsuki y cols, 1985), en preparaciones de páncreas aislado de conejo (Liebow y Franklin, 1982) y en segmentos pancreáticos de cobaya (Salido y cols, 1990; Pariente y cols, 1991). En todos los casos, la histamina produce un incremento concentración-dependiente de la secreción pancreática. Además, Lorenz y cols (1968) han demostrado, en el perro, que el jugo pancreático obtenido tras estimulación por secretina y pilocarpina contiene una alta concentración de histamina, la cual se mantiene constante durante todo el período de estimulación.

Cuando se pretendió determinar los efectos de la estimulación de los distintos subtipos de receptores y de esta forma aclarar qué papel (estimulante o inhibidor) tenían cada uno en el control de la secreción pancreática, se obtuvieron resultados bastante contradictorios que podrían explicarse por la diversidad que existe en la morfología y la fisiología de las diferentes especies estudiadas y/o las distintas condiciones de experimentación.

Al menos en el perro, la histamina incrementa la secreción pancreática, actuando directamente en las células secretoras por receptores H2. Sin embargo, Pariente y cols (1989), observaron que la administración de los agonistas selectivos H2, dimaprit e impromidina, ejercen un claro efecto inhibitorio de la secreción enzimática del páncreas de conejo, disminuyendo ligeramente la fracción hidromineral del jugo pancreático. Por el contrario, los bloqueantes selectivos de los receptores H2, cimetidina y oxmetidina, se manifiestan como agentes secretagogos que estimulan preferentemente la fracción enzimática de esta secreción digestiva.

Estos mismos autores, además observaron que la administración intravenosa de 2-tiazoliletilamina, fármaco que estimula selectiva y competitivamente los

receptores H1, determina incrementos concentración–dependientes de los componentes enzimáticos e hidrominerales del jugo pancreático de conejo anestesiado, mientras que la administración de clorfeniramina, un antagonista H1, tenía efectos opuestos (Pariante y cols, 1989). Por otra parte, llegaron a la conclusión de que la estimulación conjunta de los receptores H1 y H2 mediante histamina exógena, sólo ocasiona ligeros incrementos de la fracción enzimática de la secreción pancreática y una débil disminución en la producción de bicarbonato. Sin embargo, cuando la histamina exógena actúa sólo en receptores H1, por estar bloqueados previamente los receptores H2 mediante la acción de cimetidina, se obtienen efectos similares a los ocasionados por agonistas H1 (Pariante y cols, 1990a). También Pariante y cols (1990) obtuvieron resultados similares al analizar el papel de los receptores de la histamina en la secreción pancreática exocrina de conejo estimulada previamente por CCK y secretina.

Por otro lado, Alcon y cols (1995), han observado en cobaya anestesiado que la histamina administrada exógenamente aumenta la secreción pancreática provocada por secretina y CCK, indicando estos resultados que la histamina puede jugar un importante papel fisiológico modulando el control hormonal del páncreas exocrino de cobaya.

En cuanto a los segundos mensajeros responsables de la acción de la histamina y sus agonistas, tampoco está claro si es la vía del AMPc o la del  $Ca^{2+}$  la que estimula el sistema histaminérgico, ya que los resultados obtenidos en los estudios diseñados para determinarlo son contradictorios (Lajas y cols, 1995; Camello y cols, 1997).

En células gástricas, la activación de los receptores H1 está asociada con una movilización del  $Ca^{2+}$  (Hirst, 1991). Este hecho ha sido confirmado recientemente por Salido y cols (1990) en páncreas aislado de cobaya, donde observaron que el incremento en la liberación de amilasa era paralelo al aumento en la movilización del calcio intracelular. Sin embargo, la estimulación de los receptores H2 en células gástricas se asocia al metabolismo del AMPc (Cheret y cols, 1984).

Finalmente, la histamina es capaz de incrementar la producción de amilasa de un modo concentración–dependiente en segmentos perfundidos de cobaya. Este efecto secretor de la amina se acompaña de un incremento en la salida de  $Ca^{2+}$  desde el tejido al medio de perfusión, así como de un pequeño pero significativo incremento en la concentración de calcio intracelular (Salido y cols, 1990; Pariante y cols, 1991). Resultados similares se han encontrado en lóbulos pancreáticos de cobaya (Lajas y cols, 1995), si bien se observó que el efecto estimulante en la secreción de amilasa provocado por la histamina era potenciado tanto por agentes que estimulaban la actividad adenilato ciclasa (como el VIP y la forskolina) como por aquellos que inhibían la fosfodiesterasa específica de AMPc (IBMX).

# 3. *Interacciones entre secretagogos*

---

Aunque la mayoría de los estudios sobre la secreción pancreática se centran en el efecto de un solo secretagogo, en condiciones fisiológicas las células del páncreas están sometidas a concentraciones distintas y fluctuantes de diversos secretagogos e inhibidores. Por tanto, es de particular interés el estudio de las interacciones entre distintas hormonas y neurotransmisores reguladores de la secreción exocrina pancreática.

Las interacciones que pueden darse entre secretagogos son de dos tipos: potenciación y desensibilización. La potenciación es aquella interacción entre dos agentes estimulantes que da lugar a una respuesta celular mayor que la suma de las respuestas obtenidas por separado. La desensibilización es la reducción de la respuesta celular a un agonista cuando el tejido se ha sometido anteriormente a la acción de este agonista o de otro.

La potenciación está ampliamente documentada en el páncreas exocrino. Así, ya a finales de los sesenta e inicios de los setenta se describe su existencia entre la secretina y CCK (Brown y cols, 1967; Csendes y cols, 1971). Tras confirmaciones posteriores (Heisler y cols, 1972; Gardner y Jensen, 1981) se llegó al concepto de que entre dos secretagogos que actúen mediante diferentes vías intracelulares (AMPC y  $Ca^{2+}$ ) se produce potenciación (Gardner y Jensen, 1981). Este proceso de potenciación se da tanto entre hormonas como entre análogos de los mensajeros intracelulares; así aparece entre la CCK y la forskolina (Heisler y cols, 1972; Heisler, 1983) o el IBMX (Burnham y cols, 1984), entre secretina e ionóforos del calcio, entre ésteres del forbol y secretina (Hootman y Williams, 1987), VIP (Lee y cols, 1987; Swandito, 1989), noradrenalina (Singh, 1985a) o ACh (Francis y Singh, 1990) y entre el  $Ca^{2+}$  y el DAG (Kowabayashi y cols, 1990).

La potenciación parece depender de la concentración de secretagogo: es más clara cuando los secretagogos actúan a concentraciones submáximas. También el momento de acción de los secretagogos parece importante: VIP y CCK se potencian si son aplicadas simultáneamente pero no si se aplica primero la CCK (Gardner y Jensen, 1981).

El mecanismo celular subyacente a la potenciación es desconocido. Se cree que no se debe a incrementos en las concentraciones de mensajeros en respuesta a la utilización simultánea de distintos agonistas (Collen y cols, 1982).

Sin embargo el fenómeno de potenciación no parece sencillo ni constante como se pensó inicialmente. Además de que en numerosos estudios no ha sido confirmado, frecuentemente tan solo se refiere a alguno de los parámetros secretores del páncreas: entre secretina y CCK sólo se ha hallado potenciación para la secreción de proteínas (Ali y cols, 1990).

Junto a la potenciación, en el páncreas también se produce el fenómeno inverso o desensibilización. Aunque desde un punto de vista formal la desensibilización es la reducción de la respuesta a un agonista tras el pretratamiento con el mismo u otro agonista, funcionalmente también puede darse cuando ambos son aplicados simultáneamente (lo que algunos autores denominan restricción) (Katsushina y cols, 1990)

La desensibilización en el páncreas exocrino fue inicialmente descrita entre CCK y carbacol (Gardner y Jensen, 1981). Puede tratarse de desensibilización homóloga (la preincubación con un agonista reduce su propio efecto secretor) o heteróloga (reduce la respuesta a otro agonista). Así, en acinos de cobaya, el carbacol reduce su respuesta a CCK-8 y bombesina (Vinayek y cols, 1990).

Entre distintas vías también hay inhibición, así la secretina y la CCK pueden inhibirse mutuamente tanto in vivo como in vitro (Singh y cols, 1992; Camello y Salido, 1993) al igual que la secretina y la ACh (González y cols, 1993; Wisdom y cols, 1994).

Los activadores de la PK-C (ésteres del forbol, diacilglicerol) también inhiben la respuesta a la CCK-8 (Willems y cols, 1978; Ansah y cols, 1986; Lee y cols, 1987) y a la ACh (Ansah y cols, 1986; Lee y cols, 1987; Arita y cols, 1991a). De hecho, la PK-C es posiblemente además de un factor más de la secuencia que conduce a la respuesta secretora del páncreas, un importante modulador de la transducción de señales. Su activación ha sido propuesta para explicar la alteración o pérdida de receptores que tienen lugar durante la desensibilización (Honda y cols, 1987; Lee y cols, 1987; Louie y Owyang, 1991; Morisset y cols, 1991; Ashton y cols, 1992). También es posible que su mecanismo inhibitor sea la movilización intracelular, puesto que reduce la liberación de  $Ca^{2+}$  por  $Ins(1,4,5)P_3$  (Willems y cols, 1989) y agonistas (Arita, 1991a).

Una posibilidad que no debe excluirse es la interacción de distintos tipos de proteínas G con distintos receptores y diferentes rutas de señalización intracelular (Schulz y cols, 1988).

## 4. *Secreción paralela*

---

Estudios realizados por Tartakoff y cols (1974a, 1974b) y Scheele y Palade (1975) en lóbulos aislados de cobaya sobre la descarga de 3 enzimas secretoras (amilasa, lipasa y ARNasa) y 4 zimógenos (quimotripsinógeno, tripsinógeno y procarboxipeptidasas A y B) indican que la descarga enzimática se realiza sincrónicamente y con proporciones constantes, independientemente de las condiciones experimentales y de la naturaleza del secretagogo empleado.

Éstos autores, en un trabajo posterior (Tartakoff y cols, 1975), extienden su investigación a todos los enzimas pancreáticos de cobaya. Usando marcaje radioquímico de masas y SDS-PAGE para estudiar la secreción pancreática, concluyen que todas las proteínas secretoras son descargadas de forma paralela y con proporciones constantes.

Los hallazgos están de acuerdo con los publicados en los años 50 por Bapkin, en los que se describe, mediante estudios *in vivo*, que la secreción de amilasa, lipasa y tripsinógeno, se realiza de forma paralela en páncreas de conejo, gato, perro y hombre. También concuerdan con los resultados obtenidos en segmentos de páncreas de paloma (Schucher y Hokin, 1954) y de rata (Christophe y cols, 1971), que indican que la amilasa, la lipasa y la ARNasa, en el primer caso; y la amilasa y lipasa, en el segundo, son secretadas de forma paralela. Los experimentos de Reggio (1973) realizados en segmentos pancreáticos de paloma indican, de nuevo, que la secreción de amilasa, lipasa y quimotripsina se realiza de forma paralela.

Sin embargo, otros autores (Rothman, 1967; Rothman y Wells, 1969; Rothman, 1974; Adelson y Rothman, 1974) han descrito que la descarga de enzimas pancreáticas se produce de forma no paralela, y que la proporción de enzimas secretadas varía en distintas situaciones, sin embargo, como sus resultados no eran absolutamente concluyentes, se requerían más datos sobre que ocurre en esas situaciones para asumir una descarga no paralela y sus implicaciones: existencia de subpoblaciones de gránulos de zimógeno especializados.

Los experimentos en los que se sigue la liberación acumulada desde lóbulos pancreáticos sugieren que, durante los períodos examinados, las proteínas estudiadas están presentes en proporciones constantes en la célula acinar, en previsión de ser secretadas en paralelo. Asumiendo que no existe una especialización celular o subcelular, estos hallazgos implican que las proteínas secretoras comparten un espacio cinético común dentro de la célula acinar y un mecanismo de descarga común para este espacio (Scheele y Palade, 1975).

Observaciones inmunohistoquímicas han establecido que en el páncreas bovino no hay especialización celular o subcelular para ninguna de las proteínas secretoras estudiadas, entre las que se incluyen tripsinógeno, quimotripsinógeno, desoxirribonucleasa, carboxipeptidasa A y ribonucleasa (Painter y cols, 1973). Usando anticuerpos marcados frente a las proteínas en estudio y condiciones cuidadosamente controladas, los antígenos correspondientes han sido detectados en todos los gránulos de secreción de las células acinares. Observaciones menos minuciosas indican que también pueden ser detectados, por el mismo procedimiento, en elementos del complejo de Golgi (Kraehenbuhl y Jamieson, 1972) y en las cavidades del retículo endoplásmico rugoso.

Por todo lo expuesto, la equivalencia estructural del espacio cinético común se identificó como el espacio cisternal de las células acinares o serie de compartimentos conectados (retículo endoplásmico rugoso, complejo de Golgi, gránulos de secreción), los cuales son usados por la célula para secretar, transportar, modificar y almacenar sus productos secretores.

Estudios comparativos han demostrado convincentemente que las proteínas secretadas están presentes en proporciones constantes en extracto de gránulos de zimógeno, y también en la descarga secretora de varias especies (Jamieson y Palade, 1971), cobaya incluida (Tartakoff y cols, 1974a); esos resultados implican que las proteínas secretadas están presentes en proporciones constantes al menos en el último compartimento del espacio común. Ello debería también ocurrir en proporciones constantes en los compartimentos precedentes (retículo endoplásmico rugoso, complejo de Golgi), pero no existen datos específicos que confirmen esta teoría, y no están excluidas variaciones complementarias de uno a otro compartimento.

El mecanismo habitual de descarga puede ser considerado equivalente a la exocitosis, o precisando más, es el proceso que implica la fusión de la membrana de los gránulos con el plasmalema luminal, seguida por la descarga del volumen del contenido secretor (Christophe y cols, 1973). Estudios morfológicos y biológicos (Tartakoff y cols, 1974b; Jamieson y Palade, 1971) indican que no hay tratamiento diferencial de los componentes de la mezcla secretora en este paso.

Como el páncreas exocrino aparece funcionalmente constituido por una población celular homogénea, y en los gránulos secretores hay una proporción contante de proteínas, la célula acinar no modula la proporción de las proteínas liberadas (enzimas y zimógenos) en cortos períodos de tiempo (2 a 5 horas, que se corresponde con la duración habitual de un ciclo secretor). La célula acinar parece descargar en basal o durante la estimulación con varios secretagogos, una mezcla contante de proteínas de secreción.

Estas células responden a la estimulación por secretagogos acelerando el proceso de descarga (exocitosis), el cual ocurre continuamente (condiciones basales o no estimuladas) si bien de forma lenta. Una regulación fina en la composición proteica de la secreción, dependiente del tipo de alimento ingerido u otra clase de estímulo, probablemente no ocurre.

La existencia de más de un tipo de estímulo fisiológico parece relacionado con la integración (neural, hormonal) de la respuesta a la comida, más que con una modulación funcional de la secreción proteica (Scheele y Palade, 1975).

La regulación basta existe, sin embargo, al menos en ciertas especies (rata, perro, hombre), pero es lenta (días o semanas), de rango muy limitado, y requiere cambios bastante drásticos en la dieta, y probablemente se basa en cambios transcripcionales.

## 5. Procedimientos experimentales para el estudio de la secreción pancreática exocrina

---

El páncreas exocrino es uno de los modelos experimentales más usados en el estudio de los mecanismos secretores, con este fin se han descrito diversas técnicas, tanto *in vivo* como *in vitro*. A la hora de plantear un experimento para el estudio de la secreción pancreática exocrina existe la necesidad de llegar a un compromiso entre el mantenimiento de las condiciones fisiológicas del páncreas y el control estricto de las variables implicadas. De dicho compromiso surgen una variedad de técnicas, cada una de ellas con sus ventajas e inconvenientes.

En estudios *in vivo* se obtienen resultados que pueden estar modulados por infinidad de factores que generalmente escapan al control del investigador y, aunque permiten el estudio neuroendocrino del páncreas, presentan muchas limitaciones técnicas y de diseño experimental. Por otra parte, la técnicas *in vitro* no permiten el estudio integral del páncreas como órgano, pero eliminan muchas de las limitaciones de los estudios *in vivo* y permiten indagar de forma más directa y exacta en los mecanismos celulares secretores, alcanzándose con precisión incluso las rutas bioquímicas que se desencadenan en respuesta a distintos estímulos.

### 5.1 Métodos *in vivo*

Las técnicas *in vivo* desarrolladas para el estudio de la secreción exocrina pancreática permiten realizar análisis de todo tipo en el páncreas como órgano completo, con el concurso de todas las variables que intervienen en el animal vivo. Sin embargo, y por este mismo motivo, no es factible controlar todos y cada uno de los factores que intervienen en el diseño experimental y es posible que mediante este tipo de estudios puedan alcanzarse conclusiones erróneas.

Para evaluar la secreción pancreática en el animal vivo es necesario obtener el jugo pancreático mediante abordaje quirúrgico, que mostrará variantes en función de las necesidades de cada situación, pero que invariablemente requerirá un tratamiento preoperatorio que incluya la anestesia del animal, con el fin de evitarle sufrimientos además de permitir desarrollar la cirugía con precisión. La anestesia es un factor distorsionante más de los estudios *in vivo* que compromete la validez de los resultados experimentales. El protocolo quirúrgico varía en cada situación experimental, pero suele incluir algunos, sino todos, de los siguientes procedimientos:

- *traqueotomía*,
- *canulación de la vena yugular*; permite la infusión intravenosa de drogas y la obtención de muestras de sangre,
- *perfusión intraduodenal*; posibilita realizar estudios sobre la regulación pancreática durante la fase intestinal,
- *canulación del conducto biliar y reconducción del flujo biliar hacia el duodeno*; permite obtener jugo pancreático sin bilis y mantener el efecto que la presencia de bilis en el duodeno ejerce en la secreción de jugo pancreático,
- *canulación del conducto pancreático*, esencial en la obtención de jugo pancreático.

Entre los parámetros que más comúnmente se determinan en este tipo de estudios se incluyen:

<b>EN EL JUGO PANCREÁTICO</b>	
• Secreción hidroelectrolítica	
Flujo	μl/min
Concentración y producción de bicarbonato	mM ó nmol/min
Concentración y producción de potasio	mM ó nmol/min
Concentración y producción de cloro	mM ó nmol/min
• Secreción enzimática	
Concentración y producción de proteínas totales	mg/ml ó μg/min
Concentración, producción y actividad específica de enzimas pancreáticos	U/ml, U/min ó U/mg
<b>EN EL PLASMA</b>	
Concentraciones plasmáticas de péptidos reguladores	fmol/ml
Concentraciones plasmáticas de ciertos enzimas pancreáticos	U/ml

**Tabla 2:** parámetros a evaluar en estudios *in vivo*

## 5.2 Métodos *in vitro*

### 5.2.1 Páncreas aislado y perfundido

Aunque Babkin y Starling en 1926 describieron un método para el estudio del páncreas de perro aislado, estos estudios no adquirieron importancia hasta los años sesenta cuando Rothman y Brooks (1965) pusieron a punto en el conejo una técnica de páncreas aislado que permitía estudiar la secreción electrolítica del páncreas en la luz de los conductos pancreáticos, así como las variaciones ocurridas en el medio de perfusión. Case y cols (1968) desarrollaron una técnica más convencional en la que el páncreas de gato fue quirúrgicamente aislado y perfundido con tampones fisiológicos por medio de un suplemento arterial. Posteriormente se han descrito preparaciones de páncreas aislado y perfundido en perro (Vaysse y cols, 1977), rata (Petersen y Ueda, 1977), cerdo (Jensen y cols, 1976) y cobaya (Camello, 1994).

Los fundamentos del método son idénticos para todas las especies, pero con algunas diferencias debidas a las características anatómicas que deben ser tenidas en cuenta.

Los estudios llevados a cabo siguiendo esta técnica se centran sobre todo en los requerimientos iónicos de la glándula durante el proceso de secreción, ya que se puede variar a voluntad la composición del medio en el que se incluye la glándula, por ello la técnica de páncreas aislado ha sido usada para el estudio de secreción de las células ductulares y, particularmente, para: a) estudiar el mecanismo de acoplamiento estímulo–secreción y así establecer el papel del AMPc como segundo mensajero; b) analizar detalladamente los requerimientos iónicos durante la secreción, ya que esta técnica permite modificar el medio iónico de la glándula; c) investigar la influencia del aporte sanguíneo en los mecanismos de secreción y concluir, en particular, que la vasoconstricción es un inhibidor de la secreción (Case y Scratcherd, 1972).

Probablemente la mayor ventaja de esta preparación sea que se eliminan las interacciones con otros órganos, pero se conserva la organización funcional del páncreas como órgano secretor, manteniendo la polaridad celular en el epitelio glandular existente *in situ* y se conserva su lecho vascular. Además, esta técnica permite el estudio de la secreción fluida, no se observa liberación basal de enzimas por autodigestión y el mantenimiento de la red vascular evita el déficit de oxígeno y nutrientes presente en las otras técnicas *in vitro*, además la presencia de los islotes de Langerhans permite estudiar la interacción entre el páncreas exocrino y el endocrino.

La desventaja más notable es que el efecto de los diferentes agentes en el tejido sólo se puede estudiar añadiéndolos en serie, lo que implicaría un posible agotamiento de la glándula en respuesta a los sucesivos estímulos. Tampoco se pueden obtener múltiples muestras de tejido para examinar los sucesos intracelulares que acompañan a los cambios en la secreción pancreática.

### ***Descripción de la técnica***

Como ya se ha comentado, el protocolo quirúrgico difiere entre las distintas especies debido a las peculiaridades anatómicas, aquí se describe brevemente la técnica para rata (Camello, 1994).

El animal (200–300 g) se mantiene en ayunas 24 h con libre acceso al agua. El protocolo quirúrgico comienza con la anestesia, que se realiza con una inyección intraperitoneal de uretano (1.5 g/kg). Para el acceso a la cavidad abdominal se practica una laparotomía ventral media desde el extremo xifoideo del esternón hasta la cicatriz umbilical. Después de ligar y seccionar las conexiones vasculares, el estómago, el bazo y las asas intestinales (excepto duodeno) son separados del páncreas. El conducto biliar y la arteria hepática se ligan y se seccionan, y se canula el conducto pancreático. A continuación se canulan la arteria celíaca y la arteria mesentérica, que actuarán como conductos de entrada, y la vena portal, como salida. En este momento comienza la perfusión de la solución fisiológica utilizando una bomba peristáltica con un flujo de 2 ml/min. Generalmente se utiliza un tampón *Krebs-Henseleit* (KH) al que se añaden dextrano (5%) y BSA (0.25%), para mantener la presión osmótica y evitar la adhesión de los agonistas peptídicos a las caras internas de los tubos de perfusión, respectivamente. Ahora se retira el mesenterio, donde se encuentran alojados el páncreas y el duodeno, y es alojado en un baño de órganos conteniendo 50 ml de la solución KH sin dextrano. Este tampón se mantiene a 37°C y es gasificado con carbógeno (95% O<sub>2</sub>–5% CO<sub>2</sub>) constantemente.

### ***5.2.2 Perfusión de segmentos o lóbulos pancreáticos***

Las técnicas de incubación tanto de lóbulos como de segmentos pancreáticos tienen la gran ventaja de su fácil preparación, además de que no requieren la utilización de enzimas y quelantes para su obtención, lo que presupone una menor agresión al tejido y unas condiciones experimentales más adecuadas. Estas técnicas permiten examinar, de forma simultánea o de forma consecutiva, los efectos de diferentes agentes en una misma porción de tejido. Se utilizan fundamentalmente para evaluar la secreción enzimática pancreática, además se emplean en el estudio de los procesos bioquímicos intracelulares por medio de sondas marcadoras que permiten analizar la incorporación de aminoácidos (L-[<sup>3</sup>H]-leucina), nucleótidos e iones (<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>) en los procesos de síntesis (Scheele, 1983).

La principal desventaja que implica la utilización de esta técnica es que no se pueden tomar muestras idénticas y representativas de la totalidad del tejido durante el transcurso del experimento. Las muestras, por el contrario, son heterogéneas respecto al tipo de célula, lo cual dificulta la interpretación de los resultados. Así, por ejemplo, los efectos de la secretina y el VIP en la concentración de AMPc en segmentos de páncreas de rata se interpretaron inicialmente como reflejo de los cambios en células de los conductos o centroacinares (Deschodt-Lanckman y cols,

1975); sin embargo, el uso de suspensiones de células acinares purificadas (Gardner y Jackson, 1977) y de células de conductos purificadas (Milutinovic y cols, 1977), demostró que tanto la secretina como el VIP podían aumentar los niveles de AMPc en ambos tipos celulares e inducir, como respuesta, cambios en la secreción de enzimas pancreáticos en células acinares (Gardner y Jackson, 1977; Rothman y Brooks, 1965).

### ***Descripción de la técnica***

Una vez sacrificado el animal por dislocación cervical, se practica una laparotomía ventral media y se localiza el páncreas. Traccionando siempre del bazo, se seccionan los ligamentos, vasos, tejido adiposo y fascias que unen el páncreas y el bazo, con el estómago y las asas intestinales. Una vez extraído el páncreas se deposita en una *placa de petri* que contiene una solución fisiológica, con una composición osmótica similar a la del plasma. El pH de esta solución es de 7.4 y la temperatura se ajusta a 4°C, para el tejido que se reserva, o a 37°C para el tejido que va a ser investigado. La solución fisiológica se mantiene continuamente gaseada con carbógeno (95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>). En esta solución se retira el bazo, y se eliminan los ganglios, el tejido adiposo y conectivo, y cualquier elemento extraño que pudiera encontrarse hasta dejar la glándula completamente limpia.

Una vez limpio el páncreas, se secciona un pedazo de unos 150–200 mg y se corta en pequeños segmentos, de unos 3–5 mg, con un bisturí, procurando seccionar por las zonas donde se aprecia tejido conectivo y vasos sanguíneos. El resto del páncreas se mantiene a 4°C y es gaseado continuamente con carbógeno. El tejido cortado en segmentos se deposita en una cámara de perfusión y se deja equilibrar durante 30–40 min, perfundiendo el medio de incubación con un flujo de 1.5 ml/min. Pasado este tiempo el tejido está preparado para proceder con el diseño experimental.

El sistema *in vitro* de lóbulos, descrito en cobaya por Scheele y Palade (1974), representa una variante respecto al sistema de segmentos expuesto previamente. La técnica únicamente difiere en el modo con el que se procede a cortar las porciones pancreáticas. En este caso la glándula se inyecta previamente con el medio de incubación (1 ml) a través del tejido conectivo, de forma que los lóbulos pancreáticos se disgregan, se visualizan los contornos y pueden ser separados en una pieza. El sistema de lóbulos encuentra su mayor limitante en que depende de la presencia de un tejido conectivo interlobular fácilmente disgregable, que no se encuentra en todas las especies (p.e. perro, vaca).

Este procedimiento minimiza el daño a las células acinares, desde el momento en que el trauma quirúrgico se limita a conductos y vasos. La extracción de lóbulos completos preserva la arquitectura pancreática, y su pequeño tamaño asegura una buena difusión del oxígeno y los solutos desde el medio de incubación. Esto se traduce en una menor cantidad de células dañadas y en una prolongación de la viabilidad. Sin embargo, estudios de corta duración en páncreas de cobaya no revelan diferencias significativas entre los resultados obtenidos por medio de ambas técnicas (Scheele, 1983).

### **5.2.3 Acinos o células acinares dispersas**

Las técnicas de obtención de acinos pancreáticos surgen de la necesidad de desarrollar una preparación que permitiese obtener muestras de tejido múltiples e idénticas, además de la de estudiar el funcionamiento de las células exocrinas pancreáticas en total ausencia de control nervioso, lo cuál sólo puede garantizarse mediante este tipo de técnicas.

En los esfuerzos para desarrollar una preparación que permitiese tomar múltiples muestras idénticas durante la experimentación y que permitiese cambios en la estimulación de la secreción de enzimas por secretagogos comparables a los producidos en segmentos pancreáticos, varios investigadores encontraron que incubando el páncreas con colagenasa purificada y evitando la exposición del tejido a agentes quelantes, se podía obtener una suspensión homogénea de acinos pancreáticos (Peikin y cols, 1978). Estas células responden a secretagogos pancreáticos en términos de cambios en el transporte de calcio (Gardner y Hahne, 1977; Kondo y Schulz, 1976) y metabolismo de nucleótidos cíclicos (Gardner y cols, 1976), entre otros; sin embargo, los cambios inducidos por secretagogos en la liberación de enzimas son menores que los hallados en segmentos de páncreas, lo que se atribuyó a posibles daños en los receptores de membrana producidos durante la dispersión del tejido (Amsterdam y Jamieson, 1974). Realizando medidas directas de la unión de los secretagogos a sus respectivos receptores se demostró que esto no era cierto, al menos cuando se desarrolla el protocolo experimental adecuadamente.

El gran inconveniente de la obtención de acinos pancreáticos es la agresividad del método, que implica el uso de enzimas disgregantes del tejido conjuntivo. Al igual que ocurre en las preparaciones de segmentos pancreáticos, en este caso tampoco es posible medir funciones que requieran la totalidad del tejido.

Una vez que se consiguió tener aisladas las células constituyentes de los acinos y/o conductos del páncreas exocrino, fue posible iniciar, en detalle, el estudio del funcionamiento del proceso secretor celular, desde la unión de los secretagogos a sus receptores en la célula, los sucesos intracelulares que acompañan esta unión, y la secreción pancreática en si misma, como proceso de liberación de enzimas.

#### ***Descripción de la técnica***

A continuación se describe la técnica para la obtención de células acinares dispersas del páncreas de la rata (García y cols, 1997). Los animales se sacrifican mediante dislocación cervical y a continuación se procede a extraer el páncreas con la mayor rapidez posible.

Para el acceso a la cavidad abdominal se practica una laparotomía ventral media desde el extremo xifoideo del esternón hasta la cicatriz umbilical. Posteriormente, mediante tracción del bazo, se extrae el páncreas seccionando todos los tejidos que lo unen a la curvatura mayor del estómago y a las asas intestinales. Tras la liberación del páncreas este se mantiene a 4°C en una solución fisiológica a

pH 7.4 que, además del resto de componentes habituales, contiene un inhibidor de tripsinas (tipo II-S, 0.1 mg/ml).

Una vez libre de grasa, ganglios linfáticos y de los principales vasos sanguíneos, en el intersticio del páncreas, a través del tejido conectivo, se inyectan 10 ml de una *solución de lavado* que contiene colagenasa tipo V y una proporción muy baja de BSA (0.2%). A continuación se incuba durante 10 minutos el páncreas inyectado con colagenasa, en un baño termostático a 37°C con agitación constante (150 ciclos/minuto). Tras la primera incubación se realizan dos incubaciones más de 10 min con 5 ml de colagenasa en las mismas condiciones, renovando la solución de colagenasa entre cada una de ellas. Después de la última incubación se somete al páncreas a una disgregación mecánica, consiguiendo que la mayoría de células acinares queden libres en el medio de incubación.

Inmediatamente después de la disgregación mecánica se añade a la solución de colagenasa un exceso de *solución de lavado* sin colagenasa, que detiene la digestión enzimática del tejido conectivo. A continuación se pipetea esta solución unas 5 veces, a través de dos puntas de pipeta distintas, la primera con un diámetro mayor que la segunda, de esta forma se disgrega totalmente el tejido conectivo y se eliminan los agregados mayores.

A continuación se filtran las células en una malla con un poro de 150 µm de diámetro, que retiene los agregados celulares de gran tamaño, el tejido no digerido o las impurezas.

Tras el filtrado se centrifuga la suspensión acinar (30 xg, 2 min) y se elimina el sobrenadante por decantación. Después se resuspenden las células en *solución de lavado* y se realiza una **centrifugación en gradiente**. Para ello se deposita en tubos de centrifuga una *solución de parada*, con una alta proporción de BSA (4%), y sobre ésta un pequeño volumen de solución de lavado con las células en suspensión. Con esta disposición se centrifugan los tubos a unas 50 xg durante 10 minutos. Las células irán decantándose hacia el fondo al tener mayor densidad que la solución de parada, mientras que los restos de membranas y otras impurezas menos densas permanecen en suspensión.

Finalmente, se elimina el tampón de parada por decantación y las células se resuspenden en unos 40 ml de *tampón de incubación*. En este tampón la proporción de BSA se reduce hasta el 1% y en su composición sigue estando presente el inhibidor de tripsinas. La suspensión acinar se mantiene en este medio a 37°C, con oxigenación constante (100% O<sub>2</sub>) y agitación suave (25 ciclos/min) durante un tiempo variable, que oscila desde unos 30 minutos hasta 3 horas, dependiendo del protocolo experimental.

La viabilidad celular se determina mediante la exclusión de azul tripán, aceptándose como buenas aquellas preparaciones que generan un 90 % de células viables.

#### **5.2.4 Estudios con células acinares aisladas**

Utilizando como sustrato las células aisladas se alcanza un mayor grado de precisión en la investigación de las rutas intracelulares de acoplamiento estímulo–secreción, ya que éstas se estudian a nivel unicelular y subcelular, utilizando sistemas de microscopía clásica o microscopía confocal y sondas intracelulares excitables, técnicas de patch–clamp, y otras.

Se han investigado mediante este tipo de técnicas los cambios iónicos y ácido–básicos que acompañan al proceso secretor, además de realizar estudios sobre la estructura del citoesqueleto celular, organelas subcelulares, gránulos de zimógeno, canales iónicos..., tanto en condiciones basales como durante el proceso secretor.

Algunas de las técnicas cuyo sustrato biológico es la célula aislada se encuentran en un estado muy incipiente, otras han alcanzado un gran desarrollo, pero todas presentan un futuro prometedor.

##### ***Descripción de la técnica***

La técnica es idéntica a la anteriormente descrita. Simplemente se diferencian en que aquí no es objeto de estudio el acino, sino células aisladas seleccionadas.

## *6. Métodos para la cuantificación de la secreción proteica*

---

La producción y secreción de proteínas puede considerarse como el paso final del proceso de acoplamiento estímulo–secreción en el páncreas exocrino. Esta glándula digestiva, además de una secreción fluida rica en electrolitos, produce mayoritariamente enzimas proteicos que serán vertidos al duodeno por el conducto pancreático en respuesta a secretagogos u otros estímulos. La cuantificación de proteínas en la secreción exocrina es, por lo tanto, una buena aproximación para estudiar la funcionalidad pancreática, e investigar cómo los diferentes diseños y condiciones experimentales modulan dicha respuesta.

Respecto a la técnica a emplear se puede afrontar el estudio de la secreción proteica pancreática partiendo de dos premisas generales, o bien se estudia la secreción mediante la toma de muestras discretas a lo largo del tiempo, o bien la secreción se monitoriza continuamente durante el protocolo experimental. En el primer caso, a la hora de obtener resultados experimentales consistentes, adquieren relevancia la frecuencia con que se recogen las muestras y la fase del diseño experimental en que se toman.

Independientemente de la forma en que se van a tomar las muestras también tiene relevancia el enzima en el que se basa el método experimental. En este caso existen de nuevo dos aproximaciones generalistas: 1<sup>a</sup>) es evidente que si deseamos evaluar la forma en que se modula la producción, secreción y actividad de un enzima específico, éste debe ser el objeto de nuestras pesquisas, y se aplicarán las técnicas necesarias para su cuantificación en las distintas condiciones experimentales; 2<sup>a</sup>) por el contrario, si se pretende evaluar el proceso secretor con una visión de conjunto, entonces se procederá a cuantificar la producción de proteínas mediante técnicas que deben aunar dos características: el enzima a determinar debe ser representativo del total de los secretados, y su determinación debe resultar fiable y sencilla. La forma más cómoda de estudiar la secreción pancreática es estimar la producción total de proteínas; esta aproximación, sin embargo, se ve sometida a múltiples interferencias en muchas ocasiones.

Para evaluar el proceso secretor con más precisión debe cuantificarse la producción de amilasas o de tripsinas. Estos enzimas son de elección porque

constituyen el componente enzimático mayoritario en la secreción pancreática. Al igual que la determinación de tripsinas, que se realiza rutinariamente en laboratorios de experimentación fisiológica, la determinación de amilasas es fiable, rápida y sencilla en muestras discretas. Sin embargo, cuando se pretende estudiar la secreción de forma continua a lo largo del tiempo, las técnicas disponibles para amilasas, aunque fiables, son complejas y requieren un aparataje específico no disponible de rutina en la mayoría de laboratorios.

## **6.1 Métodos para la cuantificación en muestras discretas**

### **6.1.1 Determinación de proteínas totales**

#### Determinación de proteínas por absorción UV: absorbancia en el ultravioleta cercano (280 nm)

La cuantificación de la cantidad de proteína en una solución es posible mediante un espectrofotómetro simple. La absorción de radiación en el ultravioleta cercano depende fundamentalmente del contenido de Tyr y Trp, y en muy pequeña proporción del contenido de Phe y de enlaces disulfuro. Por lo tanto, la absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ) varía en gran medida entre diferentes proteínas: para soluciones de 1 mg/ml, desde 0 a más de 4 para algunas proteínas de la lana ricas en tirosina, si bien la mayoría de valores se encuentran en el intervalo 0.5–1.5.

Las ventajas de este método son su simplicidad y que la muestra es recuperable. El método tiene algunas desventajas, entre las que se incluyen la interferencia de otros cromóforos y que la absorción específica para una proteína dada debe ser estimada. El coeficiente de extinción del ácido nucleico en la región de los 280 nm puede ser 10 veces mayor que la extinción de la proteína para su misma longitud de onda; en consecuencia, un pequeño porcentaje de ácido nucleico puede interferir considerablemente en la absorción.

#### Determinación de proteínas por absorción UV: absorbancia en el ultravioleta lejano

El enlace peptídico absorbe fuertemente en el ultravioleta lejano con un máximo en los 190 nm. Esta gran absorción de las proteínas a esas longitudes de onda ha sido usada para su determinación. Debido a las dificultades que entraña la absorción del oxígeno y la baja resolución de los espectrofotómetros convencionales a esa longitud de onda, es más recomendable realizar las mediciones a 205 nm, donde la absorbancia es aproximadamente la mitad que a 190 nm (Scopes, 1974). La mayoría de proteínas tienen coeficientes de extinción para una solución de 1 mg/ml

entre 30 y 35 a 205 nm, y de 20–24 a 210 nm. En la absorbancia a 205 nm contribuyen varias zonas de la cadena peptídica, incluyendo aquellas en que hay Trp, Phe, Tyr, His, Cys, Met, y Arg (en orden decreciente).

Entre las ventajas de este método se incluye la simplicidad y la sensibilidad, además de que la muestra es recuperable sin degradación. También hay pequeñas variaciones en la respuesta entre diferentes proteínas, permitiendo una determinación casi absoluta de proteína. En las desventajas de este método se incluye la necesidad de calibrar con precisión el espectrofotómetro en el ultravioleta lejano. Además, muchos tampones y otros compuestos, como grupos hemo o piridoxal, absorben fuertemente en esta región, y especialmente los ácidos nucleicos.

### Método de Lowry

La mayoría de los métodos utilizados para determinar la concentración proteica son sensibles a la composición en aminoácidos de la proteína, y no pueden ser determinadas concentraciones absolutas. El procedimiento de Lowry y cols (1951) no es una excepción, pero su sensibilidad es moderadamente constante de proteína en proteína y ha sido tan ampliamente usado que la concentración de proteína estimada por el método de Lowry es una alternativa completamente aceptable, frente a determinaciones absolutamente rigurosas, en casi todas las circunstancias dónde están implicadas mezclas de proteínas o extractos crudos.

El método se basa por un lado en la *reacción de Biuret*, dónde el enlace peptídico de las proteínas reacciona con cobre bajo condiciones alcalinas, produciendo  $\text{Cu}^+$ , que a su vez reacciona con el reactivo Folin; y por otro se basa en la *reacción Folin-Ciocalteu*, en la cual el fosfomolibdato tungstico es reducido a heteropolimolibdeno por la oxidación de los aminoácidos aromáticos catalizada por el cobre. La reacción resulta en un fuerte color azul, que depende en parte del contenido de Tyr y Trp. El método es sensible a variaciones de 0.01 mg de proteína/ml aproximadamente, y su utilidad óptima se encuentra en soluciones con un intervalo de concentración de 0.01–1.0 mg/ml de proteína. El ensayo no es lineal a altas concentraciones de proteína, por lo que debemos asegurarnos de medir en la porción lineal de la curva de calibración.

Una desventaja importante del método de Lowry es el hecho de que una amplia variedad de sustancias interfiere con sus determinaciones. Entre éstas se incluyen tampones, drogas, detergentes, ácidos nucleicos y azúcares. En muchos casos las interferencias de esos agentes pueden ser minimizadas diluyendo la muestra, siempre asumiendo que la cantidad de proteína es lo suficientemente grande como para ser detectada después de la dilución. En otros casos deben aplicarse procedimientos para separar las proteínas de las sustancias que interfieren con la medición (Peterson, 1983). Cuando están presentes estas sustancias, es muy importante utilizar un blanco apropiado.

### Método de Bradford

Este método, originalmente descrito por Bradford (1976), ha llegado a ser el preferente en la cuantificación de proteínas en muchos laboratorios, incluido el nuestro. Esta técnica es simple, rápida y más sensible que la cuantificación basada en el método de Lowry. Más aún, cuando se compara con el método de Lowry, esta técnica está sujeta a menos interferencias por agentes comunes y componentes no proteicos de las muestras biológicas.

El método de Bradford se basa en la unión del colorante *Coomassie blue G-250* con las proteínas. Estudios detallados indican que el colorante libre puede encontrarse en tres formas iónicas diferentes, con valores de pKa de 1.15, 1.82 y 12.4 (Chial y cols, 1993). Las formas roja y verde del colorante, que son más catiónicas y predominan en el reactivo de ensayo en medio ácido, tienen absorbancia máxima a 470 nm y 650 nm respectivamente. Por el contrario, la forma aniónica, con coloración azul, se une a las proteínas y tiene una absorbancia máxima a 590 nm. Por lo tanto, la cuantificación de proteína puede ser estimada determinando la cantidad de colorante en la forma azul, esto generalmente se realiza midiendo la absorbancia de la solución a 595 nm. Esta longitud de onda, *a priori*, no parece la más adecuada si se tiene en cuenta que tras la unión con las proteínas, el colorante azul desplaza su absorbancia máxima desde los 590 nm a los 620 nm, por lo tanto se presenta como más sensible leer la absorbancia en esta última longitud de onda. Sin embargo, a pHs de ensayo habituales, una proporción apreciable del colorante se encuentra en la forma verde ( $\lambda_{\max} = 650$  nm), que interfiere con la absorbancia del complejo proteína-colorante medida a 620 nm, por lo tanto el ensayo se realiza midiendo la absorbancia de la solución a 595 nm.

Parece que el colorante *Coomassie blue G-250* tiene más afinidad por los residuos de Arg y Lys de las proteínas, aunque no se une a los aminoácidos libres (Compton y Jones, 1985; Congdon y cols, 1993). Esta especificidad es la principal desventaja de este método, porque puede implicar variaciones en los resultados al ensayar diferentes proteínas (Read y Northcote, 1981; Friedenauer y Berlet, 1989; Stoscheck, 1990). El método de Bradford original mostraba algunas variaciones en la respuesta frente a diferentes proteínas, para solventar este problema se han propuesto varias modificaciones generalmente basadas en el control del pH de la reacción añadiendo NaOH, que presumiblemente incrementa la forma azul, especie iónica que reacciona con las proteínas (Read y Northcote, 1981; Peterson, 1983; Friedenauer y Berlet, 1989; Stoscheck, 1990). Sin embargo, los cambios propuestos provocan un análisis menos robusto porque a menudo existe mayor susceptibilidad a las interferencias con otros compuestos químicos.

Consecuentemente, el método original descrito por Bradford permanece como el más adecuado, y sigue siendo el usado más extensamente. Existen dos variantes: el *ensayo estándar*, que es adecuado para realizar medidas entre 10 y 100  $\mu\text{g}$  de proteína; y el *microensayo*, que se utiliza para detectar cantidades de proteína entre 1 y 10  $\mu\text{g}$ .

### ***Descripción del ensayo estándar:***

Para preparar el reactivo de Bradford se disuelven 100 mg de *Coomassie Brilliant Blue G-250* en 50 ml de etanol al 95%, añadiendo 100 ml de ácido ortofosfórico al 85%, y diluyendo hasta un volumen final de 1 litro con agua destilada. Posteriormente se realiza la mezcla durante aproximadamente 1 hora y se filtra. El reactivo de Bradford se conserva en oscuridad.

Un volumen de 50 µl de la muestra se lleva a 2.5 ml de reactivo de Bradford. Después de 5 minutos, y antes de 1 hora se procede a su lectura en un espectrofotómetro a 595 nm, frente a un *blanco* preparado con 50 µl de agua (u otro solvente donde se encuentre la muestra problema) y 2.5 ml de reactivo de Bradford.

Las lecturas de densidad óptica correspondientes a las muestras se comparan con una curva estándar realizada con seroalbúmina bovina. Los resultados se expresan en mg/ml.

## ***6.1.2 Determinación de la secreción de amilasas***

### **Método de Noelting y Bernfeld**

Esta técnica fue descrita por Noelting y Bernfeld (1948) y modificada por Hickson (1970). Caracteriza la actividad amilásica al determinar colorimétricamente la producción de maltosa liberada a partir de un sustrato de almidón soluble, cuando éste es incubado en presencia de amilasas.

### ***Descripción de la técnica:***

El *reactivo de maltosa* se prepara disolviendo 2 gramos de 3,5-dinitrosalicílico en una solución que contiene 60 ml de NaOH 2N y 60 gramos de tartrato sódico potásico en agua destilada hasta completar 500 ml. El color de esta solución cambia de amarillo a rojo cuando se hierve con un azúcar reductor.

El sustrato es una *solución de almidón soluble*, disuelto al 2% (p/v) en un tampón fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{NaPO}_4\text{H}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0.2M y pH 7.05, con NaCl (0.67 M) para satisfacer los requerimientos de iones  $\text{Cl}^-$  de la amilasa. Este tampón se utiliza también como disolvente para las soluciones estándar de maltosa.

Se añade 1 ml de la muestra a 10 ml de la solución de almidón al 2% y se incuba en un baño a 37°C durante 5 minutos, durante este tiempo el enzima actúa sobre el sustrato liberando la maltosa. A continuación se toma 1 ml del contenido de los tubos problema y se añade a 5 ml de reactivo de maltosa. Paralelamente se procesa un tubo con 1 ml de almidón al 2% para determinar la cantidad de maltosa libre en la solución de almidón utilizada; así mismo se añade un tubo de reactivo de maltosa con 1 ml de tampón. Todos los tubos se tapan con torundas de algodón y se sumergen en agua en ebullición durante 10 minutos. Después se enfrían rápidamente por inmersión en agua fría y se diluye 1 ml del contenido de cada uno de los tubos en 10 ml de agua destilada. Por último, se procede 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 comparan con una curva estándar de maltosa preparada a partir de una *solución madre* que contiene 14 mg de maltosa en solución tampón. La actividad enzimática del sobrenadante y del homogeneizado de las muestras se expresa en unidades de actividad amilásica por ml (U/ml) de acuerdo con los cálculos de Hickson (1970). A partir de estos valores se calcula el tanto por ciento de amilasa liberada.

### Método del reactivo Phadebas® Amylase Test

La técnica descrita en el apartado anterior es suficientemente sensible, pero también es laboriosa y requiere mucho tiempo para su realización. Actualmente se utiliza como alternativa el método *Phadebas Amylase Test*, idóneo para determinar la secreción de amilasas en acinos pancreáticos. Este método colorimétrico es muy adecuado para el análisis cuantitativo de la  $\alpha$ -amilasa en una solución o un líquido biológico. El reactivo en el que se basa el test contiene como sustrato un polímero de almidón insoluble, portador de un colorante azul. Este sustrato se hidroliza por acción de la  $\alpha$ -amilasa dando lugar a la liberación del colorante azul, que es soluble en agua. La absorbancia de la solución se mide a 620 nm y es proporcional a la actividad del enzima en la muestra.

#### ***Descripción de la técnica para acinos pancreáticos:***

En el instante previo a la incubación de los acinos se toma una muestra de la suspensión (300  $\mu$ l), que se centrifuga a 350 xg durante 2 minutos, con objeto de separar el sobrenadante de la suspensión acinar. Estos tubos, denominados ***muestras cero***, se utilizarán posteriormente para cuantificar la cantidad de amilasas existente en el sobrenadante de la solución acinar en el instante previo al inicio de la incubación con los distintos agonistas. El valor será restado de los demás en el momento de realizar los cálculos.

A continuación se incuban 500  $\mu$ l de la suspensión acinar con los agonistas en estudio durante 30 minutos, manteniendo la temperatura en 37°C y con agitación constante (60 ciclos/min). Con el fin de conocer la secreción basal de amilasas se incuban, en ausencia de estímulo y en las mismas condiciones, una serie de muestras tomadas a distintos tiempos. Todos estos tubos (con y sin estímulo) se denominan ***muestras problema***.

De la misma suspensión acinar se toman 500  $\mu$ l a los que se añade 5 ml de *solución de lisis* y se agita. La *solución de lisis* es capaz de romper las membranas citoplasmáticas de las células, permitiendo así que las amilasas que contienen sean liberadas al medio. Estos tubos se denominan ***muestras totales*** y permiten conocer la cantidad total de amilasas presentes en la suspensión acinar, teniendo en cuenta este valor los resultados podrán ser expresados como porcentaje de secreción respecto a la cantidad total de amilasas de la suspensión acinar.

La solución de lisis está compuesta por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10mM, lauril sulfato sódico (SDS) 0.1% (p/v), albúmina sérica bovina 0.1% (p/v), y  $\text{CaCl}_2$  4mM, el pH se ajusta a 7.8.

Como ya se ha mencionado, la incubación se mantiene durante 30 minutos, al término de los cuales se detiene la secreción de amilasas centrifugando 300  $\mu\text{l}$  de cada muestra a 350 xg durante 2 minutos. La determinación de la cantidad de amilasas que se ha secretado durante la incubación, se lleva a cabo mediante el *Phadebas Amylase Test*. La mezcla del reactivo se prepara suspendiendo el sustrato a razón de una tableta de *Phadebas Amylase Test* por cada 20 ml de *reactivo de amilasas*. La mezcla se mantiene en agitación para que la suspensión del reactivo sea uniforme, ya que el sustrato es insoluble en agua.

El reactivo de amilasas tiene la siguiente composición: NaCl 50mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20mM, azida sódica 0.02% (p/v). El pH se ajusta a 7.0.

100  $\mu\text{l}$  de las *muestras cero* y de las *muestras problema*, a las que se añaden 200  $\mu\text{l}$  de solución de lisis, y 300  $\mu\text{l}$  de las *muestras totales*, a las que ya se había añadido el tampón de lisis anteriormente; se incuban con 2 ml del *reactivo de Phadebas* a 37°C, sin agitación y durante 5 minutos aproximadamente. Transcurrido este tiempo se detiene la reacción añadiendo 500  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.5N a cada tubo y se diluye el contenido de esos tubos con 8 ml de agua destilada. Posteriormente, se centrifugan a 700 xg durante 4 minutos, así precipita el sustrato insoluble y permite, finalmente, leer la absorbancia del sobrenadante de cada tubo a 620 nm en un espectrofotómetro.

Se calcula la liberación de amilasas como porcentaje de la actividad amilásica total, considerando la procedente de los acinos al inicio de la incubación y la liberada al medio extracelular durante dicha incubación, para ello se aplica la siguiente fórmula:

$$\% \text{ secreción de amilasas} = \frac{A_i - A_0}{(K \times A_T) - A_0} \times 100$$

Dónde:

$A_i$ : absorbancia de la *muestras problema*

$A_0$ : absorbancia de la *muestras cero* del mismo par de la serie experimental (media de los pares de *ceros* de cada serie)

$A_T$ : absorbancia de las *muestras totales* del mismo par de la serie experimental (media de los pares de *muestras*)

$K$  (= 3.67), es el *factor de corrección* que se debe aplicar. Se obtiene teniendo en cuenta la dilución final de las *muestras totales*: al añadir 500  $\mu\text{l}$  de suspensión acinar a 5 ml de solución de lisis la dilución es 1/11, pero se añade 3 veces más cantidad (300  $\mu\text{l}$ ) que la añadida de las *muestras problema* (100  $\mu\text{l}$ ), por lo tanto el factor de corrección es 11/3 ó 3.67.

### **6.1.3 Determinación de la secreción de tripsinógeno**

#### Técnica de Caldwell y Sparrow

La producción y actividad de tripsinas en el jugo pancreático puede determinarse en muestras discretas mediante la técnica de Caldwell y Sparrow (1976), según la modificación descrita por Manso y cols (1992). Ésta se fundamenta en el empleo del BAPNA, un sustrato de naturaleza peptídica incoloro en disolución acuosa, que cuando es hidrolizado por la acción específica de la tripsina, libera paranitroanilina, un colorante soluble de color amarillo detectable espectrofotométricamente a 405–410 nm.

La técnica puede requerir pequeñas variaciones metodológicas según las condiciones experimentales y el sujeto de investigación. La que a continuación se describe se ha puesto a punto para rata.

#### ***Descripción de la técnica:***

Se diluyen las muestras de jugo pancreático hasta una concentración de 250 µg/ml de proteínas totales en una solución tampón Tris-HCl 0.1 M, pH 7.6 y CaCl<sub>2</sub> 0.05 M, y se incuban con un volumen igual de una solución de 50 µg/ml de tripsina bovina tipo III, en el mismo tampón a 0°C durante 24 horas, para la activación del tripsinógeno del jugo pancreático a tripsina. Simultáneamente, se incuban un tubo control, conteniendo la dilución de tripsina bovina y tampón a partes iguales, sin jugo pancreático.

Se utiliza el BAPNA (N $\alpha$ -benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida) como sustrato de tripsinas a una concentración 0.2 mM.

Para realizar las mediciones se mezclan 2 ml de tampón, 400 µl de BAPNA 1.25mM en metanol/agua (v/v) y 100 µl de la muestra activada, y se incuban 20 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añaden 500 µl de ácido acético al 20% para detener la reacción por precipitación de las proteínas, y se mide la absorbancia a 410 nm. Los valores de densidad óptica se llevan a una recta patrón elaborada con paranitroanilina, para conocer de ese modo la cantidad de sustancia liberada por efecto de la tripsina. A los valores hallados para cada muestra, se les resta el del tubo control, que nos indica la cantidad de paranitroanilina liberada por efecto de la tripsina bovina exógena.

Los resultados se expresan en U/ml, considerando una unidad enzimática de tripsina a la cantidad de este enzima que hidroliza 1 µmol de BAPNA en 1 minuto en las condiciones de la técnica (37°C). Si conocemos el flujo pancreático (µl/min) puede establecerse la producción de tripsinas (mU/min) multiplicando la actividad de la enzima por el flujo. Del cociente entre la actividad y la concentración de proteínas totales se obtiene la actividad específica de tripsinas, que se expresa en U/mg.

### Método de Folsch

Esta técnica, descrita por Folsch y Wormsley (1973), se basa en la hidrólisis por la tripsina del sustrato  $N\alpha$ -p-toluensulfonil-L-arginina-metil-éster, con la consiguiente liberación de  $N\alpha$ -p-toluensulfonil-L-arginina que es capaz de absorber luz a 247 nm. El aumento de absorción luz por minuto es directamente proporcional a la concentración de tripsina presente en la muestra.

Las condiciones óptimas para la medición son: pH 8.1 y una concentración de sustrato de 1mM. Así mismo, el ion  $Ca^{2+}$  estabiliza el enzima a una concentración final de 10 mM. La técnica es sensible, repetitiva ( $\pm 3\%$ , coeficiente de variación para actividades alrededor de 30 U/ml) y, en ausencia de trombina y de plasmina, es específica para tripsina.

#### ***Descripción de la técnica:***

Antes de realizar la determinación de la tripsina en el jugo pancreático, previamente se ha de proceder a la activación del tripsinógeno a tripsina. Para ello se diluyen 10 mg de enterocinasa en 625  $\mu$ l de suero salino, se toman 500  $\mu$ l de esta disolución y se añaden a 9.5 ml de tampón Tris-HCl ( $CaCl_2$ , 0.05 M), esta solución se va a denominar solución de enterocinasa.

Por otra parte, una vez que las muestras de jugo pancreático se han diluido convenientemente con suero fisiológico, se toman 100  $\mu$ l de cada muestra y se añaden a 100  $\mu$ l de solución de enterocinasa, y se incuba la mezcla a 37°C durante 1 hora. Al cabo de este tiempo el tripsinógeno de las muestras se ha activado y se puede realizar la determinación de tripsinas. Para esta determinación de mezclas (por orden) 1.3 ml de tampón para tripsinas, 175  $\mu$ l de solución sustrato de tripsina y 50  $\mu$ l de la muestra activada. Ésta mezcla se agita en la cubeta de medición, se mantiene a 25°C y se procede a la lectura en un espectrofotómetro tras 1, 2 y 3 minutos, calculándose el incremento medio por minuto. Si éste excede de 0.100 debe diluirse la mezcla.

El resultado se expresa en U/ml, y se calcula según la expresión:

$$U/ml = \frac{DE}{t} \times \frac{V}{\epsilon x v}$$

Dónde:

$V$  = volumen del sistema de test en la cubeta (ml)

$v$  = volumen de la muestra en el test (ml)

$\epsilon$  = coeficiente de extinción micromolar (= 0.540  $cm^2/\mu M$ )

$DE$  = cambio en la densidad óptica

$t$  = tiempo (min)

## 6.2 Métodos para la cuantificación en continuo

En páncreas, al hablar de un sistema de cuantificación en continuo nos referimos a un sistema, diseñado de tal forma que permita medir a lo largo del tiempo y sin interrupción la producción proteica (u otro parámetro) de este tejido secretor.

La gran ventaja de estos sistemas es que permiten obtener un patrón dinámico preciso de la secreción en gran variedad de condiciones experimentales, solventando las limitaciones que en este aspecto presentan los sistemas de incubación estática. Por esta característica, los métodos en continuo (también llamados *on line* o automáticos) son adecuados para el estudio de las interacciones droga-receptor en la membrana, y los mecanismos intracelulares de acoplamiento estímulo-secreción implicados. También permiten un acercamiento al estudio de fenómenos farmacológicos tales como taquifilaxia, desensibilización, inhibición e interacciones.

Todas estas técnicas tienen un esquema muy similar, por una parte presentan un sistema de flujo que mantiene viable y funcional el tejido pancreático, a la vez que permite su estimulación. Por otra, presentan un sistema de detección, de complejidad variable, que es aplicado en el efluente del tejido para medir diversos parámetros. Se han descrito varias técnicas para el análisis de estos parámetros, con diversos grados de selectividad, estabilidad y sensibilidad.

Los parámetros estudiados se registran continuamente, y en los registros puede caracterizarse la respuesta utilizando cuatro determinaciones diferentes: la altura del pico, para obtener la respuesta máxima; la integración del área bajo la curva, que ofrece información sobre la amplitud de la respuesta; la pendiente del pico, para ajustar el perfil de la curva; y el tiempo de respuesta, que clarifica la celeridad con que un secretagogo ejerce su acción. Por tanto, para **caracterizar la respuesta** se determina:

- **Respuesta máxima**, algunos secretagogos producirán incrementos máximos en la secreción, mayores que los producidos por otros; para estudiar este parámetro se mide la altura máxima registrada para cada secretagogo y se compara.

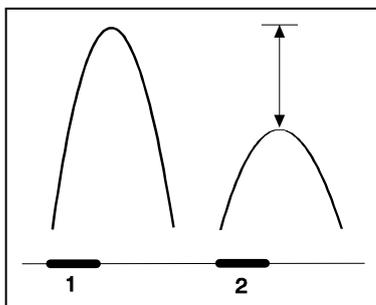


Figura 7: dos registros con diferentes incrementos máximos.

- **Amplitud de la respuesta**, algunos secretagogos presentan una respuesta más sostenida que otros, independientemente de la respuesta máxima y ante estímulos de igual duración; en este caso las comparaciones se realizan integrando el área bajo la curva.

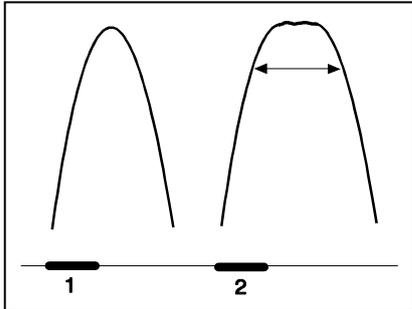


Figura 8: dos respuestas con diferente amplitud.

- **Perfil de la respuesta**: independientemente de la respuesta máxima y del área bajo la curva, algunos secretagogos estimulan la secreción con un incremento por unidad de tiempo mayor que otros, es decir, con mayor pendiente; de igual forma, el descenso en la secreción que se observa cuando el secretagogo es retirado del medio de perfusión, puede producirse de forma más rápida o lenta. En estos casos las comparaciones se realizan determinando las pendientes.

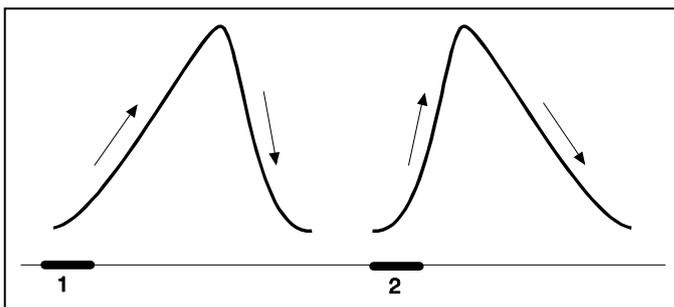


Figura 9: dos registros con perfil diferente.

- **Celeridad de la respuesta**, ciertos secretagogos estimulan la secreción más rápidamente que otros; para estudiar esta constante se determina el tiempo transcurrido entre la adición del secretagogo al medio de perfusión y el momento en que se detecta la respuesta. A los valores así obtenidos se les puede restar el tiempo en que se retrasa la respuesta dependiente del espacio muerto del sistema, y calcular de esta forma el tiempo en el que realmente reacciona el tejido.

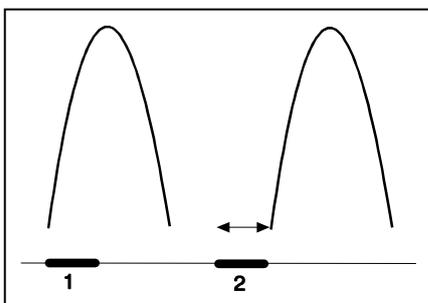


Figura 10: dos secretagogos con distinto tiempo de reacción.

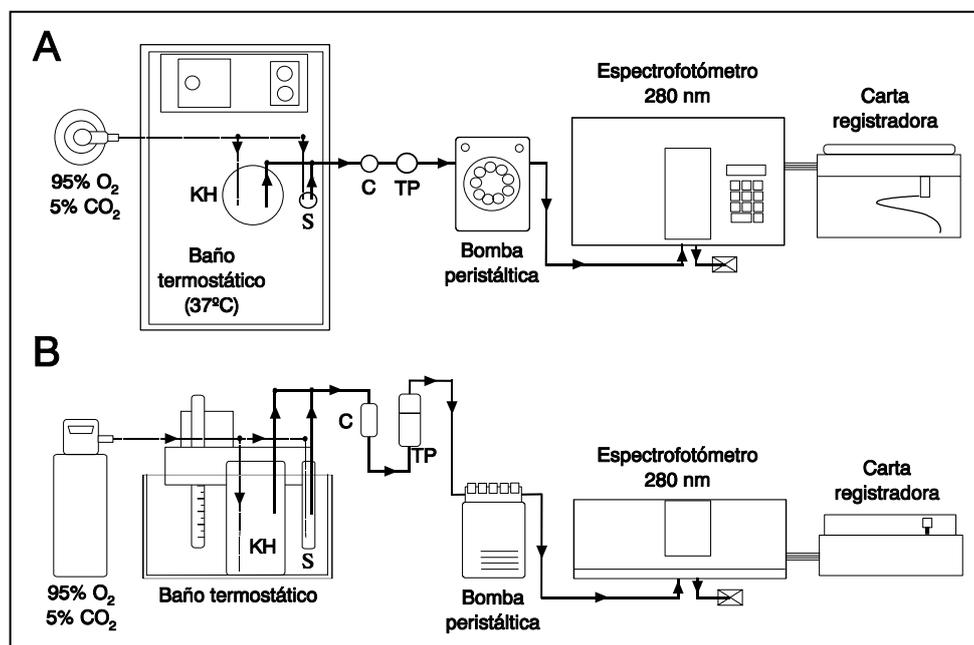
### 6.2.1 Determinación de proteínas totales en continuo por absorción UV

La determinación en continuo de proteínas totales por absorción ultravioleta, ha sido una técnica usada con gran profusión en la investigación de la Fisiología Gastrointestinal. Actualmente está en desuso debido a que se han desarrollado técnicas que están sometidas a menos interferencias que esta. Sin embargo, se trata de una técnica extremadamente sencilla que debe tenerse en cuenta en ciertos diseños experimentales, siempre que se utilicen sustancias que no interfieran con la absorbancia en el espectro UV (Camello y Salido, 1993).

Esta técnica fusiona dos de los procedimientos que ya han sido descritos en esta introducción. Por una parte, el sustrato biológico que se va a utilizar son segmentos o lóbulos perfundidos; por otra, el fundamento metodológico se basa en la capacidad de las proteínas para absorber en el ultravioleta cercano (280 nm), fenómeno que ya ha sido comentado en apartados anteriores.

#### Descripción de la técnica:

Una vez obtenidos, los segmentos pancreáticos (150–200 mg) se depositan en una cámara de perfusión y se dejan equilibrar durante 30–40 min. Pasado este tiempo el tejido está preparado para proceder con el diseño experimental.



**Figura 11:** Diagrama de flujo del sistema de determinación en continuo de las proteínas totales, en una vista en planta (A) y en una vista lateral (B). Abreviaturas: KH, tampón fisiológico (Krebs-Henseleit); S, secretagogo; C, captaburbujas; TP, tejido pancreático en la cámara de perfusión. Símbolos: ☒, sumidero.

El medio de incubación es constantemente perfundido a través de la cámara (1.5 ml/min) por una bomba peristáltica, que recoge el medio de incubación (a 37°C, gasificado con carbógeno) y lo impele por el sistema de tubos que se esquematiza en la figura 11. Antes de la cámara de perfusión donde se halla el tejido, se coloca otra cámara con la función de atrapar las burbujas. El efluente que sale de la cámara de perfusión se hace pasar por un espectrofotómetro, ajustado para registrar absorbancia a 280 nm, que tiene conectada una carta registradora.

La carta recibe datos del espectrofotómetro y los representa en papel. De esta forma podremos registrar continuamente la secreción basal de proteínas y, por supuesto, el efecto de los distintos tratamientos.

Para calibrar el sistema se emplean concentraciones crecientes de seroalbúmina bovina (BSA), posteriormente se hace una regresión lineal con los datos obtenidos midiendo la altura máxima de los picos (respuesta máxima) sobre la línea base. De todas formas, antes de cada experimento se comprueba la calibración del sistema, mediante la perfusión de tampón de incubación con una concentración conocida de BSA.

Los resultados se expresan como  $\mu\text{g/ml}/100 \text{ mg tejido}$ , o bien, al ser conocido el flujo de la bomba peristáltica, como  $\mu\text{g/min}/100 \text{ mg tejido}$ .

### **6.2.2 Determinación de amilasas en continuo**

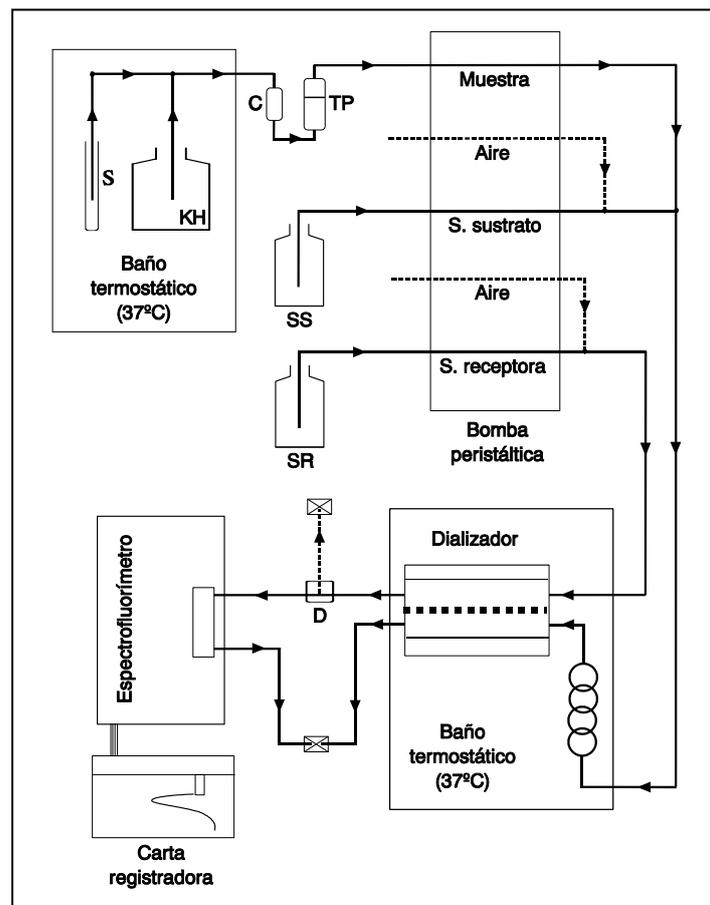
Se han descrito varias técnicas, de complejidad variable, para el análisis de la amilasa en tejidos o en fluidos corporales, incluyendo métodos *viscométricos*, *sacarogénicos* y *colorimétricos* (Searcy y cols, 1966; Rinderknecht y cols, 1967; Klein y cols, 1970). Cada una de ellas ha sido desarrollada con el objetivo de mejorar la selectividad, estabilidad y sensibilidad del sistema precedente. La introducción de una técnica fluorescente para cuantificar la amilasa (Rinderknecht y Marbach, 1970) permitió desarrollar un método para medir en continuo la secreción de amilasas, que aportaba mejoras considerables sobre cualquiera de los precedentes (Matthews y cols, 1974).

El método se basa esencialmente en la liberación de un producto fluorogénico dializable desde la amilopeptina antranilato, usado como sustrato, por la acción de la amilasa. La intensidad de fluorescencia se monitoriza en un espectrofluorímetro a 340 nm de emisión y 414 nm de absorción.

#### ***Descripción de la técnica:***

Los segmentos pancreáticos (150–200 mg) son perfundidos con un tampón fisiológico con un flujo de 1 ml/min. El tampón fisiológico se mantiene a 37°C y es gasificado de la forma habitual. Se mantiene el tejido en estas condiciones durante 30 min antes de iniciar la estimulación, periodo requerido para que se alcance un nivel basal en la liberación de enzimas. La estimulación se realiza añadiendo las drogas en el medio de perfusión durante el tiempo requerido.

La amilasa liberada tras la estimulación se mezcla con la solución denominada como *solución sustrato*. En esta mezcla la amilasa hidroliza el sustrato y libera maltosa unida al fluoróforo. Ahora la mezcla se hace pasar por un dializador (membrana de cuprofano, Tipo C) sumergido en un baño termostático (37°C). De esta forma, la solución se dializa frente una solución, denominada como *solución receptora*, que tiene la misma composición que el sustrato pero sin amilopeptina antranilato. Solamente la maltosa unida al fluoróforo pasa por la membrana de diálisis, y es detectada en el espectrofluorímetro (340 nm de emisión y 414 nm de absorción). La intensidad de fluorescencia es registrada continuamente en una carta conectada al espectrofluorímetro.



**Figura 12:** Diagrama de flujo del sistema de determinación en continuo de las amilasas. Abreviaturas: S, secretagogo; KH, tampón fisiológico (Krebs-Henseleit); C, captaburbujas; TP, tejido pancreático en la cámara de perfusión; SS, solución sustrato; SR, solución receptora; D, desburbujador. Símbolos: ☒, sumidero.

Se utiliza como estándar la  $\alpha$ -amilasa. Los resultados se expresan como U/ml/100 mg tejido. Una unidad (U) de  $\alpha$ -amilasa es definida como la cantidad de  $\alpha$ -amilasa que es capaz de liberar 1.0 mg de maltosa desde el almidón en 3 min, a pH 7 y 20°C. El sistema descrito es muy sensible, detectando variaciones en la concentración de amilasa del orden de 10 mU/ml.

# 7. Cuantificación del tripsinógeno pancreático

---

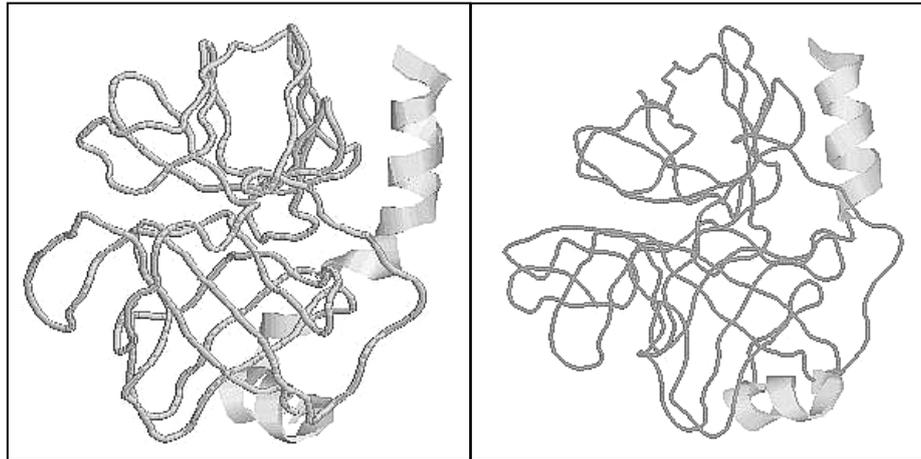
## 7.1 Enzimas proteolíticos

En los organismos vivos los enzimas proteolíticos (proteasas y peptidasas) tienen la función principal de degradar y modificar proteínas. Estos enzimas proteolíticos rompen las proteínas en pequeños péptidos o aminoácidos que serán usados como fuente de energía o como materia prima en la síntesis y renovación de las proteínas. Sin embargo, estos enzimas tienen otras muchas funciones; así los enzimas proteolíticos modifican el ambiente celular y facilitan la migración celular en conexión con la reparación tisular y el cáncer, la ovulación y la implantación del huevo fertilizado, la morfogénesis embrionaria, y la involución de las glándulas mamarias después de la lactación (Saksela, 1985). Otra importante función de las proteasas es su papel regulador en procesos como la inflamación, la infección y la coagulación sanguínea; además, juegan un papel esencial en la activación proteica, la regulación celular y la transducción de señales.

En general las **peptidasas** escinden péptidos muy pequeños, y las **proteasas** péptidos mayores y proteínas. Atendiendo a su lugar de escisión las peptidasas pueden ser clasificadas como **exopeptidasas**, si preferentemente hidrolizan residuos de aminoácidos localizados en el extremo terminal de la cadena, o **endopeptidasas** si escinden enlaces peptídicos internos. Las exopeptidasas son a su vez clasificadas en **aminopeptidasas** y **carboxipeptidasas**, dependiendo de si hidrolizan residuos de aminoácidos desde el extremo amino o carboxilo.

La mayoría de enzimas proteolíticos son altamente específicos para sus sustratos, sin embargo la clasificación de las proteasas que a continuación empleamos no está basada en la especificidad de sustrato, sino en su mecanismo de acción (Banner y cols, 1993). Existen 3 diferentes grupos de enzimas proteolíticos, denominados por el residuo de aminoácido en el *centro activo* (también denominado centro catalítico, *locus* activo o lugar activo) responsable de la acción catalítica, generalmente se distinguen: las **proteasas aspárticas** (e.j. pepsina), las **proteasas cisteínicas** (e.j. catepsina B y catepsina H), y las **proteasas serínicas** (e.j. tripsina, trombina y plasmina).

Aunque los miembros de cada grupo de enzimas proteolíticos pueden tener muy diversas funciones biológicas, el análisis de aminoácidos a menudo muestra un alto grado de similitud estructural entre ellos. Un conocimiento detallado de la estructura y del mecanismo de acción de un enzima puede utilizarse en muchas ocasiones como punto de partida para revelar la estructura y la función de otro enzima dentro del mismo grupo.



**Figura 13:** estructura tridimensional de la tripsina bovina (izda) y porcina (drcha).

El grupo de enzimas proteolíticos más extensamente estudiado es el de las proteasas serínicas (Kraut, 1977). Como indica su nombre cada miembro de este grupo presenta un residuo de serina reactivo en su centro activo.

Las proteasas serínicas se dividen en dos familias, las **tripsinas** y las **subtilisinas**. La familia de tripsinas es la mayor y contiene, entre otras, la tripsina y la quimotripsina, la elastasa, la triptasa de los mastocitos y la mayoría de los factores que regulan la coagulación sanguínea y la proteólisis. El tipo de enzima tripsínico tiene una alta similitud en el contenido de aminoácidos, indicativo de la existencia de un gen ancestral común. Han sido encontradas en vertebrados y en otros animales superiores, y también en hongos y procariotas. En contraste, las subtilisinas sólo se encuentran en bacterias. Los miembros de la familia de tripsinas se clasifican de acuerdo con el tipo de aminoácido que se encuentra preferentemente en el lugar de ruptura. La elastasa y la quimotripsina hidrolizan los enlaces peptídicos donde interviene el carboxilo de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos, mientras que las proteasas tripsínicas escinden solamente enlaces en los que interviene el grupo carboxilo de un aminoácido básico, como la lisina o la arginina.

La secuencia de aminoácidos, y por lo tanto la estructura tridimensional, difiere completamente entre las tripsinas y las subtilisinas. Por ello los dominios activos catalíticos de las tripsinas y las subtilisinas probablemente hayan evolucionado independientemente, convergiendo desde dos genes diferentes (*evolución convergente*). Sin embargo, desde el momento en que los tres

aminoácidos con importancia funcional en el centro activo, serina (Ser), ácido aspártico (Asp) e histidina (His), están dispuestos con la misma relación geométrica en todos los miembros de las dos familias (Ser 195, His 57 y Asp 102, en las tripsinas; y Ser 221, His 64 y Asp 32, en las subtilisinas), los mecanismos proteolíticos son muy similares (Banner y cols, 1993). Este hecho puede inducirnos a suponer que la disposición de los tres aminoácidos del centro activo es una de las muy escasas estructuras efectivas para la hidrólisis de los enlaces peptídicos.

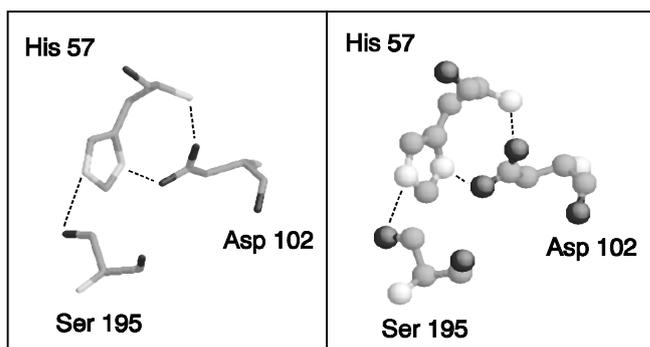


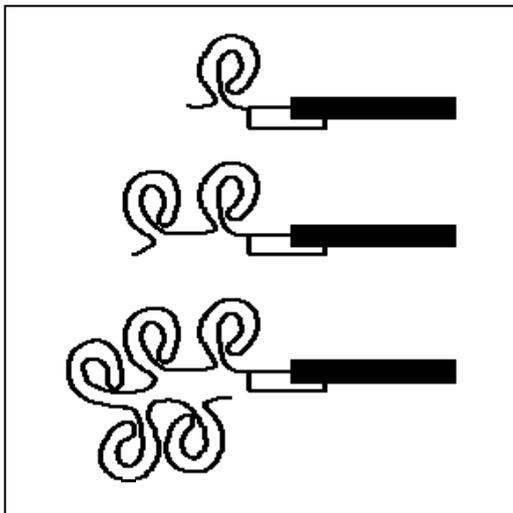
Figura 14: disposición de los 3 aminoácidos del centro activo de la tripsina bovina.

Las proteasas serínicas de los mamíferos se sintetizan generalmente como proenzimas inactivos, los *zimógenos*, que portan una cadena simple de aminoácidos como factor inactivador. La activación ocurre cuando el zimógeno es escindido por uno o más lugares específicos, perdiendo dicha cadena. Lo más habitual es que la escisión del zimógeno dependa de la acción de otra proteasa. Esta escisión es altamente específica y se encuentra muy regulada, sólo se produce en unas condiciones muy determinadas.

La mayoría de las proteasas serínicas contienen dos partes funcionalmente distintas (Mullertz, 1987). Una región dónde se localizan los aminoácidos catalíticamente activos, compuesta por unos 250 residuos de aminoácido y que es muy similar en la tripsina y la quimotripsina, y también en las proteasas serínicas implicadas en la coagulación. La otra región, que contiene los dominios que determinan la especificidad de cada enzima, está localizada en las zonas externas del enzima. Esta región es de un considerable tamaño en las proteasas serínicas que intervienen en la regulación de la coagulación sanguínea y en la fibrinólisis, en ella pueden distinguirse 4 tipos de estructuras principales: dominios de tipo *kringle*, unidades agrupadas por tres puentes disulfuro que tienen la forma clásica de un pastel escandinavo; el dominio del factor de crecimiento; el dominio carboxilado que une calcio y es dependiente de vitamina K; y el dominio dactilar, homólogo a la *estructura en dedo o dactilar* de la fibronectina (Patthy, 1985; Cool y cols, 1985; Ny y cols, 1984).

Se ha postulado que las proteasas digestivas de bajo peso molecular se desarrollaron a lo largo de la evolución a partir de las proteasas serínicas mayores (e.j. protrombina), por una elongación de la región no catalítica dependiente de la

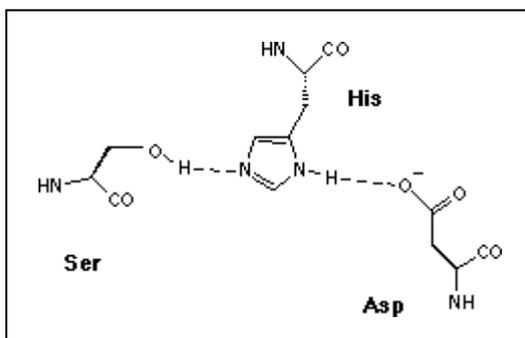
duplicación y mutación del gen ancestral común, en una *evolución divergente* (Doolittle, 1979). Si consideramos que enzimas grandes como la protrombina, el plasminógeno y otros componentes plasmáticos, son muy similares en especies de mamíferos y de aves, los eventos que condujeron a la organización de dominios actual preceden a la divergencia evolutiva de los mamíferos y las aves, y probablemente son anteriores a la aparición de los vertebrados.



**Figura 15:** Representación esquemática de proteasas serínicas de mamíferos. La región activa catalítica (relleno en negro) es homóloga a la tripsina y está altamente conservada en todas las proteasas serínicas de los mamíferos. El número de dominios de tipo *Kringle*. Varía entre las diferentes proteasas serínicas: por ejemplo, 1 en la urocinasa, 2 en la protrombina, 5 en el plasminógeno.

### El mecanismo proteolítico de las proteasas serínicas

La reacción de escisión de los enlaces peptídicos ejercida por una serina proteasa en su sustrato, es el resultado de la interacción entre dicho sustrato y la distribución espacial de la red de cargas de los aminoácidos catalíticos (Craik y cols, 1987; Carter y Wells, 1988) Esta red, que está presente en los centros activos de todas las proteasas serínicas, se conoce como **triada catalítica**. Está constituida por las cadenas laterales de 3 aminoácidos específicos (el grupo hidróxido de la serina, el grupo imidazol de la histidina y el grupo ácido carboxílico del ácido aspártico) que interactúan entre ellos por conexiones en puente de hidrógeno.



**Figura 16:** relación de distribución de cargas de las proteasas serínicas

La acción proteolítica de una serina proteasa en su sustrato implica varios pasos empezando con la formación de un complejo no covalente entre el enzima y el sustrato. Un ataque nucleofílico por el grupo hidroxilo de la serina sobre el carbono amidocarbonilo del sustrato, resulta en la escisión del enlace amido y la formación de un intermediario acil-enzima (Warshel y cols, 1989; Frey y cols, 1994).

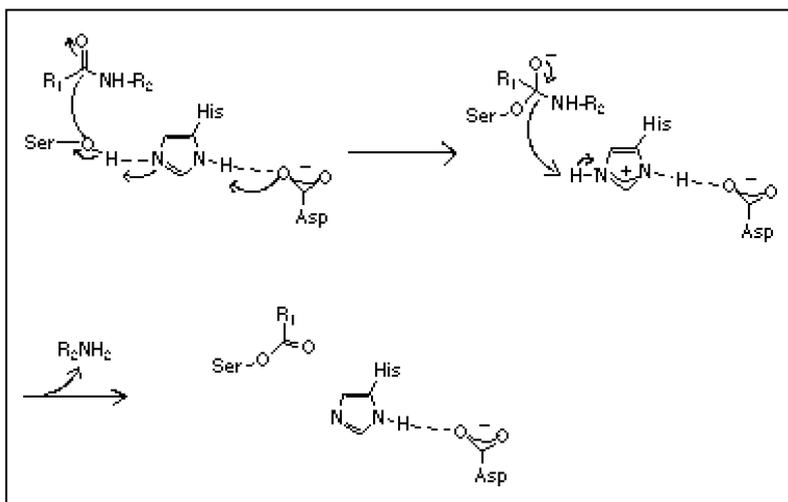


Figura 17: formación de un intermediario acil-enzima

El enlace éster acil-enzima es entonces hidrolizado en el paso consecutivo y la enzima queda libre para catalizar la escisión de otra molécula sustrato.

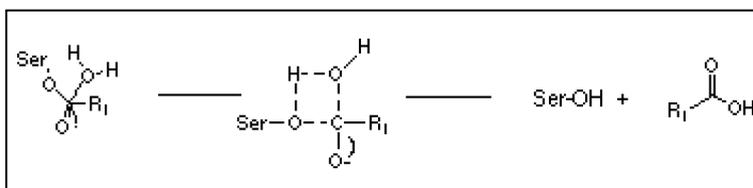


Figura 18: hidrólisis del intermediario acil-enzima

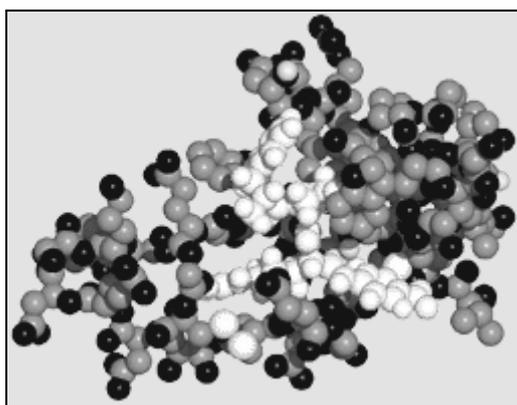
### Especificidad del enzima y selectividad de sustrato

La **especificidad** es la propiedad de los enzimas que determina la mayor o menor restricción de los mismos en la elección de sus sustratos: un enzima completamente específico tendría un único sustrato (Stryer, 1981). La especificidad de las proteasas serínicas normalmente no es muy alta, ya que tienen centros activos similares y actúan con el mismo mecanismo proteolítico. Consecuentemente, una única serina proteasa puede actuar en varios sustratos aunque con diferente grado.

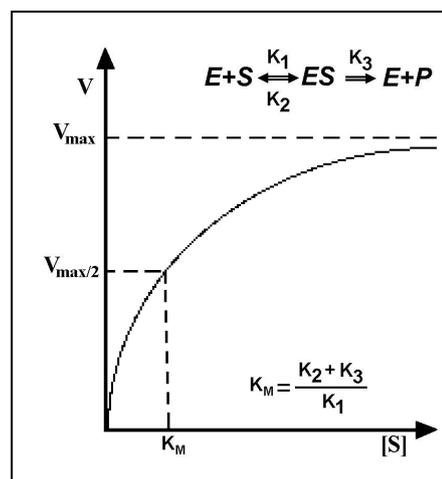
Como el sustrato fija o determina la adecuación del centro activo de la enzima, éste es de crucial importancia para el resultado de la reacción enzima-

sustrato. El enlace que va a ser escindido debe tener una orientación relativa específica para la localización de las cadenas de los aminoácidos de la triada catalítica. El factor más importante que determina la adecuación de un sustrato para un enzima es la secuencia de aminoácidos localizada alrededor del enlace que va a ser escindido. La tripsina escinde amidas y ésteres de los aminoácidos básicos arginina y lisina, la trombina tiene una preferencia similar, pero es más específica para la arginina que para la lisina.

La **selectividad** es una propiedad del sustrato e indica el grado en que el sustrato es ligado y escindido por diferentes enzimas. La mejor medida para la selectividad viene dada por la relación  $k_{cat}/K_M$ , donde  $k_{cat}$  es una constante que indica cuantas moléculas de sustrato son escindidas por un enzima en un segundo, y  $K_M$  la *constante de Michaelis*, que puede definirse como aquella concentración de sustrato a la cual la velocidad inicial de reacción se hace la mitad de su valor máximo (Stryer, 1981).



**Figura 19:** modelo tridimensional que esquematiza el cromóforo S-2238 (*Chomogenix AB*®), con una coloración más pálida, localizado en el centro activo de la trombina .



**Figura 20:** curva de la cinética de un enzima de tipo michaeliano

Los sustratos sintéticos son considerablemente más pequeños que los sustratos naturales y normalmente pueden ser escindidos por más de un enzima, dicho de otro modo, los sustratos sintéticos no son completamente selectivos. Este hecho se comprende fácilmente si consideramos que grandes sustratos como el fibrinógeno no sólo interactúan con el centro activo, sino también con dominios exteriores del enzima. Como estas interacciones permiten a los sustratos discriminar entre diferentes proteasas serínicas, el fibrinógeno llega a ser altamente selectivo para la trombina.

En la tabla siguiente se muestran los datos cinéticos, obtenidos por *Chromogenix AB*, de la escisión enzimática de la molécula de paranitroanilina de diversos sustratos, determinados bajo condiciones estrictamente estandarizadas:

- temperatura estable y adecuada, vital para todos los estudios de cinética enzimática. En este caso todas las reacciones se desarrollaron a 37°C

- se elige el tampón adecuado para la estabilidad del enzima y se ajusta el pH teniendo en cuenta la temperatura: el pH de los tampones Tris-HCl se incrementa a medida que aumenta la temperatura, a razón de aproximadamente 0.1 unidades de pH por cada °C (50mM Tris-HCl).

La cinética de la reacción ha sido seguida espectrofotométricamente midiendo variaciones en la absorbancia a lo largo del tiempo (DA/min), para asegurar la máxima precisión la DA/min se midió para cuatro concentraciones diferentes del sustrato. Con los valores experimentales de DA/min se hace una regresión lineal y seguidamente se calculan los valores  $K_M$ ,  $k_{cat}$ , y con ellos se determina la eficiencia catalítica de la reacción.

Tampón: 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 130 mM NaCl + enzima + sustratos del tipo S	Tipo de sustrato	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (1/s)	$k_{cat}/K_M$ $(1/(mM \times s)) \times 10^{-3}$	Conc. del enzima (mg/ml)
<b>Trombina bovina</b>	S-2238	0.010	200	20	0.02
	S-2366	0.150	295	2.00	0.02
	S-2846	0.045	200	4.40	0.03
<b>Factor Xa bovino</b>	S-2222	0.400	100	0.25	0.06
	S-2337	0.300	110	0.37	0.05
	S-2732	0.350	130	0.37	0.05
	S-2765	0.110	195	1.80	0.03
	S-2767	0.220	160	0.73	0.04
	S-2772	0.700	100	0.14	0.06
	S-2782	0.150	190	1.30	0.03
	S-2787	0.140	120	0.86	0.05

**Tabla 3:** características cinéticas para sustratos cromogénicos proporcionados por *Chromogenix AB* para medir la actividad de la Trombina bovina y el Factor Xa bovino, dos proteasas serínicas. La concentración del enzima viene expresada en mg/ml para DA/min=0.05 a una concentración de sustrato  $[S]=2 \times K_M$

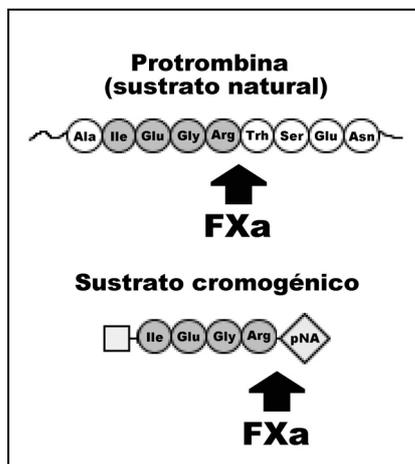
## 7.2 Detección de proteasas y peptidasas

### 7.2.1 Sustratos cromogénicos

Como es bien sabido los enzimas son proteínas que catalizan la mayoría de reacciones químicas que tienen lugar en el organismo, estas reacciones químicas ocurren, por tanto, a pH neutro y a temperatura corporal. El componente químico sobre el que la enzima ejerce su acción catalítica se denomina sustrato.

Las enzimas proteolíticas actúan en sus sustratos naturales, las proteínas, hidrolizando uno o más enlaces peptídicos con la consecuente formación de subunidades de proteínas, péptidos o aminoácidos libres. Normalmente este proceso es altamente específico en el sentido de que son escindidos sólo enlaces peptídicos adyacentes a ciertos aminoácidos.

Por otra parte, los sustratos cromogénicos son péptidos que reaccionan con enzimas proteolíticas con la consiguiente formación de color. Son fabricados sintéticamente y se denominan por su similitud con la selectividad del sustrato natural por el enzima. Asociado a la parte peptídica del sustrato cromogénico se encuentra un grupo químico que cuando es liberado tras la escisión enzimática provoca incremento en el color. El cambio de color puede ser seguido espectrofotométricamente siendo proporcional a la actividad proteolítica.



**Figura 21:** La protrombina (sustrato natural del Factor Xa) es escindida por el Factor Xa en una posición precedida por la misma secuencia de 4 aminoácidos. La actividad del Factor Xa puede ser determinada por el sustrato cromogénico S-2222, el cual está compuesto por los mismos aminoácidos asociados al cromóforo

En la tabla siguiente se relacionan algunas secuencias peptídicas utilizadas en la elaboración de sustratos cromogénicos, con mención del enzima(s) para el que es selectivo.

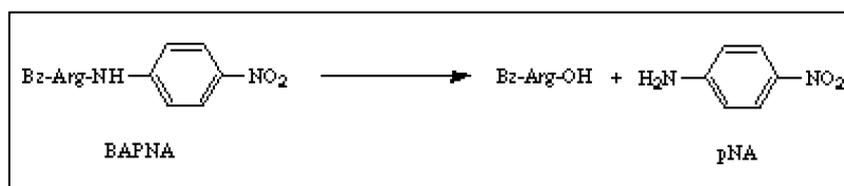
PÉPTIDO	ENZIMA(S)
L-Ala-L-Pro	Dipeptidilpeptidasa IV
<i>t</i> -BOC-L-Leu-Gly-L-Arg	Activador del plasminógeno
CBZ-L-Ala-L-Ala	Elastasa
CBZ-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	Elastasa
CBZ-L-Ala-L-Arg	Elastasa, tripsina
CBZ-L-Ala-L-Arg-L-Arg	Catepsina B, catepsina L
CBZ-L-Arg	Tripsina
CBZ-L-Arg-L-Arg	Catepsina B, catepsina L, catepsina O
CBZ-Gly-Gly-L-Arg	Activador del plasminógeno, urocinasa
CBZ-Gly-L-Pro-L-Arg	Prostatina, trombina, triptasa
CBZ-L-Ile-L-Pro-L-Arg	Tripsina
CBZ-L-Phe-L-Arg	Catepsina B, catepsina C, catepsina L, catepsina O, calicreina, plasmina, prohormona tiol proteasa
CBZ-L-Pro-L-Arg	Trombina, tripsina
CBZ-L-Val-L-Leu-L-Lys	Plasmina, prohormona tiol proteasa
CBZ-L-Val-L-Pro-L-Arg	Trombina
(Glutaril)-Gly-L-Arg	Urocinasa
Gly-L-Arg	Dipeptidilpeptidasa I, urocinasa
Gly-L-Pro	Dipeptidilpeptidasa IV
L-Leu-L-Arg-Gly-Gly	Proteasa del adenovirus humano
L-Phe-L-Pro	Dipeptidilpeptidasa II, Dipeptidilpeptidasa IV
L-Pro-L-Phe-L-Arg	Catepsina C, calicreina

**Tabla 4:** proteasas y sustratos de proteasas. Abreviaturas: CBZ = benciloxycarbonil; *t*-BOC = *ter*-butoxicarbonil.

### 7.2.1.1 Antecedentes históricos

El uso de sustratos cromogénicos (basados en péptidos sintéticos) comenzó a principios de los setenta en el estudio de la hemostasia. Sin embargo, dos décadas antes (1954) Sherry y Troll encontraron que ciertos aminoácidos ésteres eran buenos sustratos para la trombina. Dichos ésteres, no obstante, son de limitado valor debido a su selectividad extremadamente baja y a que los productos liberados, alcohol y ácido carboxílico, no son detectables fácilmente y, por tanto, la actividad proteolítica es de difícil evaluación.

El siguiente paso importante fue dado unos pocos años después por parte de Erlanger y cols (1961), estos autores hallaron que el BAPNA (N $\alpha$ -benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida) es un excelente sustrato para la tripsina. Se ha demostrado que la paranitroanilina, que es detectable espectrofotométricamente, es liberada de la benzoil-arginina por la acción de la tripsina, de forma proporcional a su actividad.



**Figura 22:** Escisión de la paranitroanilina del sustrato cromogénico BAPNA

El BAPNA fue el primer sustrato cromogénico creado para las proteasas serínicas. Sin embargo, el BAPNA por sí mismo es de uso limitado en el análisis de la actividad proteolítica en fluidos biológicos como la sangre, debido a que, por su pobre selectividad, puede ser hidrolizado por varios enzimas diferentes. No fue hasta principios de los setenta cuando comenzó realmente el desarrollo de las posibilidades que presentan los sustratos peptídicos cromogénicos derivados de la paranitroanilina (Blombäck, 1967; Svendsen y cols, 1972), y posteriormente de otros cromóforos.

### 7.2.1.2 Los sustratos cromogénicos generan color

La idea general que subyace en el diseño de un sustrato sintético para una proteasa es crear un agente que reaccione selectivamente con el enzima para la formación de producto(s) que puedan ser convenientemente medidos. Existen varios principios en la medición, pero aquellos basados en la espectrofotometría han ganado la más amplia aceptación debido a la sencillez de la técnica y la disponibilidad de un amplio abanico de instrumentación. En estos casos la parte peptídica del sustrato es químicamente unida a una molécula (llamada cromóforo) que, no sólo es fácilmente escindible, sino que también es medible en un espectrofotómetro. De hecho, la expresión sustrato cromogénico viene a significar etimológicamente *sustrato que genera color*, en el caso de la paranitroanilina el color generado es amarillo.

### Color y absorción de luz

Cuando un átomo o una molécula se ve sometida a una radiación electromagnética (p.e. la luz) éste pasa desde un estado de baja energía a otro de alta energía, dicho de otro modo, tiene lugar la absorción de la radiación. Este es el caso de los cromóforos, son moléculas que incrementan su estado energético al ser excitados por radiaciones electromagnéticas, dando lugar a una absorción medible en un espectrofotómetro. La región del espectro electromagnético que se extiende aproximadamente desde los 400 nm hasta los 750 nm, constituye el espectro visible. Si una sustancia absorbe luz visible, esta tendrá color, en caso contrario aparecerá blanca. Sin embargo, el color percibido por nuestros ojos no es el color de la longitud de onda de la luz absorbida sino más bien la luz reflejada (ver tabla).

Color de la luz absorbida	Longitud de onda de la luz absorbida (nm)	Color observado
Violeta	400	Amarillo
Azul	450	Naranja
Azul-Verde	500	Rojo
Amarillo	550	Violeta
Naranja-Rojo	600	Azul-Verde
Rojo	700	Verde

**Tabla 5:** relación entre el color absorbido y el observado

La intensidad de la absorción puede ser expresada por la ley de Lambert-Beer:

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l$$

donde:

$\log(I_0/I)$  = absorbancia

$\varepsilon$  = coeficiente de extinción molar

$c$  = concentración molar del soluto

$l$  = longitud de la muestra celular (cm)

El coeficiente de extinción ( $\varepsilon$ , molar) está en función del tamaño de la porción de la molécula con capacidad para absorber luz, y de la probabilidad para que tenga lugar la transición entre los distintos estados de energía. Las moléculas que absorben en el espectro visible consisten a menudo en sistemas lineales o cíclicos que contienen dobles enlaces conjugados. Coeficientes de extinción por encima de  $10^4$  son considerados de alta intensidad y, a efectos prácticos, los cromóforos correctos técnicamente presentan  $\varepsilon$  mayores de  $10^4$ – $10^5$ .

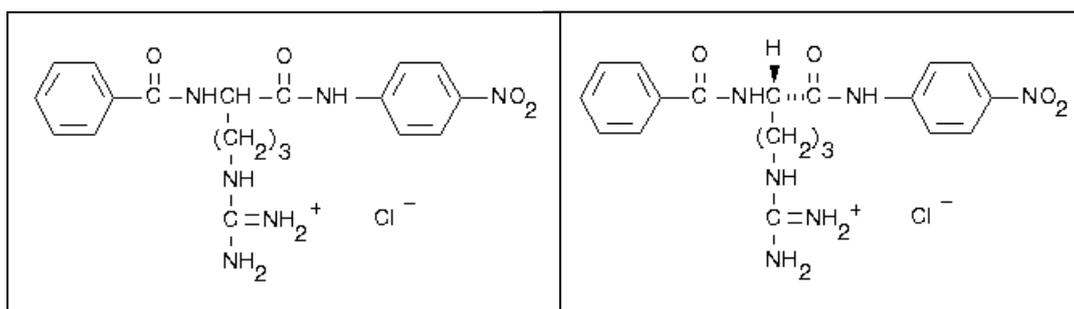
### 7.2.1.3 Elección de un cromóforo

La molécula usada como cromóforo en un sustrato sintético debería tener las siguientes propiedades:

- 1- La máxima absorción del cromóforo libre debe diferir significativamente de la absorción que presenta unido al sustrato.
- 2- El cromóforo debe ser fácilmente escindible y dissociable del enzima, esto significa que la actividad enzimática no debe ser perturbada por las propiedades físicas y químicas inherentes a la molécula cromófora.
- 3- El color de otros reactivos o impurezas presentes en la reacción no deben interferir con el color del cromóforo.
- 4- El color debe ser fuerte (absorción molar alta) para permitir la detección de actividades enzimáticas bajas.
- 5- El cromóforo debe ser, al menos, moderadamente soluble en agua.
- 6- El cromóforo debe tener baja toxicidad y no debe ser agresivo con los instrumentos y equipos de laboratorio.

#### Paranitroanilina

Un cromóforo que cumple la mayoría de los requisitos mencionados es la **paranitroanilina** (para-nitroanilina, p-nitroanilina, 4-nitroanilina, pNA). Esta molécula es, de lejos, el cromóforo más ampliamente usado en sustratos peptídicos sintéticos y es utilizada extensamente en sustratos diseñados para la determinación de la actividad proteasa de la tripsina y de la papaína (Witt, 1991; Claeson, 1994). Uno de esos sustratos es el BAPNA ( $N\alpha$ -benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida), la forma ópticamente activa L-BAPNA es más hidrosoluble que la forma DL-BAPNA.



**Figura 23:** DL-BAPNA (izquierda) y L-BAPNA.

En solución acuosa la molécula pNA presenta coloración amarilla con máxima absorbancia a 380 nm, mientras que la unión sustrato-pNA absorbe aproximadamente a 300 nm (figura 24). El relativamente alto coeficiente de

extinción para la pNA en solución acuosa ( $\epsilon=9650$ ) hace que la sustancia sea fácilmente detectable a bajas concentraciones. La hidrólisis del enlace péptido-pNA en el sustrato cromogénico, por la acción de un enzima proteolítico, resulta en la liberación de pNA evaluable por la variación del color de la solución en la cual tiene lugar dicha hidrólisis. La señal fotométrica, por ejemplo el cambio en absorbancia a lo largo del tiempo, es directamente proporcional a la actividad enzimática. La reacción es habitualmente registrada a 405 nm o a 410 nm con el fin de evitar las interferencias con sustratos no hidrolizados.

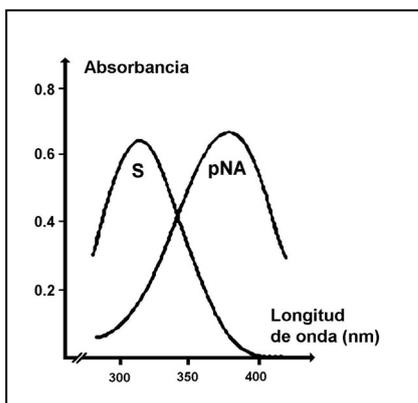


Figura 24: Espectro de absorción de un sustrato cromogénico con pNA (S) y de la pNA libre.

La pNA es moderadamente tóxica con una  $DL_{50}$  (oral, rata) = 750 mg/kg, un valor comparable, por ejemplo, al n-butanol, a la piridina o al ácido salicílico (Lenga, 1988). La absorción de este compuesto en el organismo puede dar lugar a la formación de metahemoglobina, que a concentraciones altas causa cianosis. Más aún, se han demostrado en laboratorio efectos mutagénicos después de la exposición crónica a este compuesto. Por tanto, es aconsejable llevar guantes durante la manipulación prolongada de pNA e inmediatamente lavar la piel con agua en caso de contacto con esta sustancia.

### Otros cromóforos

Otros cromóforos usados menos frecuentemente son:

**ácido 5-amino-2-nitrobenzoico (ANBA)**, de color amarillo con máximo de absorción en 405 nm y  $\epsilon=9800$ ) (Kolde y cols, 1986).

**7-amino-dietilamino-8-metilfenoxacina (ADMP)**, de color azul y absorción máxima en 624 nm y  $\epsilon=80000$ ) (McRae y cols, 1981; Stüber y cols, 1988). Cuando se une a sustratos les confiere color rojo (absorción máxima a 544 nm).

Indirectamente los **derivados tiol-éster** pueden ser usados para la determinación cromogénica de actividad enzimática (McRae y cols, 1981). La liberación de los grupos tiol-éster en sustratos como por ejemplo el tiol-isobutil o el tiol-becil unidos a péptidos, puede ser medida tras la reacción con reactivos como 4,4'-ditiopiridina, que debe estar presente en el medio de reacción.

## 7.2.2 Otros medios de detección

### 7.2.2.1 Sustancias fluorogénicas

Aunque las propiedades del espectro de absorción de los sustratos peptídicos fluorogénicos de proteasas y peptidasas y sus productos de hidrólisis son fácilmente predecibles, la utilidad de un sustrato dado para un enzima depende de la cinética de hidrólisis del sustrato por ese enzima, que a su vez depende de la concentración del sustrato y de la secuencia de aminoácidos, y también del pH, de la temperatura y de la presencia de cofactores en el medio.

Para estudios en células vivas la idoneidad de un sustrato particular también dependerá de su accesibilidad al enzima y de la retención celular de los productos de hidrólisis, por lo que además de los factores antes mencionados, pueden influir en el grado de hidrólisis y en la especificidad de estos sustratos, su permeabilidad y la de sus productos de hidrólisis. Varios de los sustratos más recientes se basan en las secuencias peptídicas que han demostrado ampliamente ser efectivas cuando se conjugan con otros colorantes más clásicos, generalmente la 7-amino-4-metilcumarina o la paranitroanilina, pero aún no se ha comprobado su especificidad.

El carboxilo terminal de un aminoácido individual y de péptidos cortos puede ser conjugado con algunos fluoróforos que contienen aminas, para formar sustratos fluorogénicos de peptidasas (Morita y cols, 1977; Butenas y cols, 1992). Los colorantes empleados para elaborar estos sustratos son fluorescentes a pH fisiológico, sin embargo, es habitual que cuando los colorantes se asocian mediante uniones amidas a péptidos la absorbancia máxima decrece significativamente. El resultado final es un sustrato algunas veces fluorescente pero con un espectro de emisión a una longitud de onda relativamente corta. En un caso extremo, como el de los sustratos basados en la rodamina 110, la absorbancia detectable y la fluorescencia son completamente eliminados después de formarse la amida. La actividad peptidasa libera el fluoróforo, restaurando la fluorescencia del colorante libre, sin embargo los grupos fluorogénicos no son ampliamente usados porque es necesario utilizar un equipamiento más complicado que el requerido en la espectrofotometría clásica.

Actualmente destacan los siguientes fluoróforos:

**7-amino-4-metilcumarina (AMC)**, un colorante fluorescente azul usado ampliamente para marcar sustrato empleados en la detección de la actividad enzimática en células, homogenados y soluciones y en blots.

**7-amino-4-clorometilcumarina (CAMC)**, un análogo de la AMC con grupo tiol reactivo, los sustratos basados en la CAMC producen fluorescencia como productos de la peptidasa y presentan una retención mejorada en células vivas.

**6-aminoquinolina (6-AQ)**, un colorante con un cociente absorción/emisión aproximado de 345/550, produciendo una señal fluorescente claramente distinguible

de la fluorescencia del sustrato y también de la producida por la mayoría de los compuestos autofluorescentes.

**Rodamina 110 (R110)**, un colorante excitable en el espectro visible con una absorbancia mayor que cualquiera de las AMC y 6-AQ; los sustratos basados en R110 contienen dos aminoácidos o péptidos idénticos asociados a un único fluoróforo de forma simétrica mediante enlaces covalentes lo que suprime su absorción visible y su fluorescencia. Cuando se produce la escisión enzimática el sustrato bisamida no fluorescente adquiere la fluorescencia en dos pasos, primero es transformado en una monoamida fluorescente y después en la aún más fluorescente R110. Las intensidades de fluorescencia de la monoamida y de la R110 son constantes en un intervalo de pH de 3 a 9. Ambos productos de hidrólisis muestran propiedades espectrales similares a las de la fluoresceína, con picos de excitación y emisión a longitudes de onda de 496 nm y 520 nm respectivamente. La Bis-(CBZ-Arg)-R110 es un sustrato general para las proteasas serínicas que ha demostrado ser de 50 a 300 veces más sensible que los sustratos análogos basados en AMC. Esta sensibilidad mejorada puede atribuirse por una parte a la mayor fluorescencia del producto enzimático y por otra a la mejora en la reactividad con el centro activo. Además, varios derivados peptídicos de la R110 han sido usados para el estudio de la actividad proteasa en células vivas puesto que muestran la capacidad de introducirse en células intactas donde son hidrolizados por proteasas lisosomales.

**N-(4-clorometil)benzoyl rodamina 110 (CMB-R110)**, una versión de R110 específicamente diseñada para determinar la actividad enzimática en células vivas o tejidos pendiente de ser patentada (*Molecular Probes*<sup>®</sup>); al contrario que los sustratos basados en R110 los sustratos basados en CMB-R110 son monoamidas de aminoácidos y péptidos lo cual simplifica la cinética de la reacción.

**5-(γ-6)clorometilrodamina 110 (CM-R110)** un análogo de la rodamina 110 con un tiol reactivo; los sustratos basados en CM-R110 son bisamidas con retención mejorada en células vivas.

### Sustratos peptídicos diseñados para ensayos en células vivas

Los problemas para la detección de la actividad proteasa en células vivas utilizando sustratos fluorogénicos son:

- 1- Dificultad en la carga de los sustratos bajo condiciones fisiológicas.
- 2- La salida de los productos fluorescentes desde las células vivas.
- 3- La carencia de especificidad de los sustratos sintéticos.

Aunque algunos sustratos basados en los fluoróforos AMC y en la 6-AQ son moderadamente permeables a la mayoría de las membranas celulares, sus productos fluorescentes son escasamente retenidos en el interior celular. Se han desarrollado, sin embargo, algunos derivados moleculares de los cromóforos mencionados que potencialmente mejoran la retención celular de los productos fluorescentes.

### 7.2.2.2 Quimioluminiscencia

Los grupos luminiscentes, como el isoluminol, presentes en las moléculas denominadas luminóforos, han sido satisfactoriamente asociados a péptidos para obtener sustratos altamente selectivos para enzimas proteolíticos (Branchini y cols, 1981). Así por ejemplo, el **6-amino-6-deoxiluciferin (ADL)** es un luminóforo que puede ser detectado por quimioluminiscencia. Bloqueando la amina que presenta la molécula de ADL, por la formación de una amida en el sustrato de peptidasa, se anula completamente la reacción quimioluminiscente, lo cual permite utilizar al ADL en la elaboración de sustratos peptídicos. Uno de ellos, el 6-(N-acetil-L-fenilalanil)-amino-6-deoxiluciferin, ha sido usado en asociación con la luciferasa para detectar selectivamente niveles de  $\alpha$ -quimotripsina del orden de 0.3 ng.

### 7.2.2.3 Detección electroquímica

Además de los métodos con fundamento fotométrico ya mencionados, se ha desarrollado un método electroquímico para determinar la actividad enzimática, denominado *método de absorción en electrodo* (Agner y cols, 1983). Este método se basa en la capacidad de ciertos sustratos peptídicos para presentar señal en la superficie de un electrodo metálico. Cuando el sustrato es escindido enzimáticamente pierde la capacidad mencionada, y las propiedades del electrodo (capacitancia) cambian durante la reacción. La velocidad de variación puede ser monitorizada mediante un puente eléctrico. El método ciertamente tiene ventajas; pueden utilizarse todo tipo de muestras porque incluso las turbias o con coloración no interfieren con la detección de la actividad enzimática; además, los péptidos sintéticos pueden contener los aminoácidos apropiados presentes a ambos lados del enlace peptídico sujeto a la acción enzimática y, por lo tanto, ser más selectivos para ciertos enzimas.

## 7.2.3 Condiciones para las reacciones cromogénicas

### Temperatura

El grado al cual el sustrato cromogénico es escindido depende altamente de la temperatura. Es de crucial importancia conocer a que temperatura(s) se aplica un método particular para la detección de la actividad proteasa, pudiendo efectuarse a temperatura ambiente, 25, 30, o 37°C. Un incremento térmico de 1°C ocasiona una aceleración en la velocidad de la reacción del orden del 2.5–7.5%. La temperatura, por lo tanto, debe mantenerse constante durante el ensayo y si es necesario comparar resultados de diferentes experimentos, deben ser desarrollados a la misma temperatura. Es aconsejable realizar la reacción en cubetas y soluciones termostatazadas.

## pH

Tanto  $K_M$  como  $k_{cat}$  son constantes que dependen del pH, esto significa que los cálculos cinéticos sólo pueden realizarse utilizando resultados obtenidos al mismo pH. Habitualmente, la actividad enzimática es estimada a un pH óptimo para la actividad proteolítica de esa enzima. Sin embargo, cuando varias proteasas están presentes en la misma solución, por ejemplo en la secreción pancreática exocrina, no es siempre ventajoso investigar cuál es el pH que proporciona una máxima reactividad del enzima investigado, por el contrario es más adecuado elegir el pH al que otras proteasas serínicas tienen menor actividad, de forma que la competencia por el sustrato sea menor.

## Tampones

El medio de reacción y la concentración de las sustancias que lo integran debe estar bien definido. Habitualmente se emplean tampones Tris-HCl, porque el pKa del Tris-HCl es 8.1 (25°C), muy adecuado para las mediciones en valores de pH que oscilan entre 7.3 y 9.3, donde la mayoría de las proteasas serínicas muestran máxima actividad, además, este tipo de tampón es estable porque puede autoregularse. También se ha usado para realizar ensayos de este tipo un tampón Tris-imidazol, pero no es recomendable porque está bien establecido que los imidazoles inhiben ciertas proteasas, como la tripsina o la plasmina.

## Fuerza iónica y otros aditivos

La fuerza iónica apropiada se obtiene habitualmente ajustando la concentración de NaCl. Otras sustancias que pueden ser requeridas son  $CaCl_2$ , cuando se estudian enzimas Ca-dependientes, azida sódica (u otro agente bactericida) para prevenir el crecimiento bacteriano, y polietilen glicol o Tween 80 para prevenir la adsorción de los enzimas a los recipientes y tubos de reacción.

## Manipulación del sustrato

La solución del sustrato habitualmente se prepara por la adición de agua estéril al polvo seco en que se presenta comercialmente. Los sustratos con baja solubilidad en agua deben ser disueltos en DMSO (dimetilsulfóxido) y posteriormente diluidos en agua. Es aconsejable que la concentración final de DMSO no exceda el 10% de la mezcla de reacción. Los sustratos disueltos en agua estéril son estables durante más de 6 meses con refrigeración (4–8°C), y durante varias semanas a temperatura ambiente. La estabilidad se ve considerablemente reducida en tampones alcalinos, y más aún por la contaminación con microorganismos o largas exposiciones a la luz solar. La concentración del sustrato debe ser escogida de forma que se obtengan cinéticas lineales, se considera apropiada en la mayoría de las ocasiones una concentración del doble de la constante  $K_M$ .



*III–Materiales y  
métodos*



# *1. Metodología general*

---

## *1.1 Animales*

Para la realización de esta Memoria de Licenciatura se han utilizado exclusivamente cobayas, de ambos sexos y de raza Dunkin-Hsartley, cuyos pesos estaban comprendidos entre 300 y 600 gramos.

Los animales procedían del Servicio de Animalario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura. En estas instalaciones los animales estuvieron estabulados en habitaciones con fotoperiodo controlado (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) y a temperatura ambiente entre 18-21°C, recibiendo una dieta estándar para cobaya.

Antes de la realización de los experimentos los animales fueron sometidos a períodos de ayuno de 18-24 horas, aunque se les permitió libre acceso al agua.

Todos los experimentos comenzaron a las 10.00 a.m. con objeto de sincronizar las variaciones circadianas de la secreción pancreática (Salido y cols, 1984).

## *1.2 Obtención de segmentos pancreáticos*

Aunque ya ha sido descrito en apartados anteriores, a continuación se hace referencia al modo en que se obtienen y se mantienen viables los segmentos pancreáticos de cobaya.

El animal se sacrifica por dislocación cervical y se le practica una laparotomía ventral media para localizar el páncreas. Traccionando siempre del bazo, se seccionan los ligamentos, vasos, tejido adiposo y fascias que unen el páncreas y el bazo, con el estómago y las asas intestinales.

Una vez extraído el páncreas se deposita en una *placa de petri* que contiene una solución fisiológica *Krebs-Henseleit*, cuya composición aparece descrita en la tabla 1. El pH de esta solución se ajusta a 7.4 y la temperatura a 4°C, para el tejido que se reserva, o a 37°C para el tejido que inmediatamente va a ser utilizado. La solución se mantiene continuamente gaseada con carbógeno (95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>).

	mM	g por litro
NaCl	103	6.020
KCl	4.7	0.355
MgCl <sub>2</sub>	1.1	0.223
NaHCO <sub>3</sub>	25	2.100
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.75	0.179
D-Glucosa	2.8	0.504
Na-Piruvato	4.9	0.540
Na-Fumarato	4.9	0.786
Na-Glutamato	4.9	0.916
CaCl <sub>2</sub> 1M(*)	2.56	2.56 ml

**Tabla 1:** composición del tampón fisiológico *Krebs-Henseleit*, y proporciones para preparar diferentes volúmenes. (\*)Una vez se ha ajustado el pH a 7.4, se añade el volumen de CaCl<sub>2</sub> (1M), si se añade con otro pH el calcio precipita.

En esta solución se retira el bazo, y se eliminan los ganglios nerviosos, el tejido adiposo y conectivo, y cualquier elemento extraño que pudiera encontrarse, hasta dejar la glándula completamente limpia.

Una vez limpio el páncreas, se secciona un pedazo de unos 150–200 mg y se corta en pequeños segmentos, de unos 3–5 mg, con un bisturí, procurando seccionar por las zonas dónde se aprecia tejido conectivo y vasos sanguíneos. El resto del páncreas se mantiene a 4°C y es gaseado continuamente con carbógeno. El tejido cortado en segmentos se deposita en la cámara de perfusión.

## **1.3 Solución de enterocinasa**

### **1.3.1 Tampón TRIS/HCl 0.1M pH 7.4**

Se utiliza *Trizma Base* (PM=121.14, Sigma), se disuelve en agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.4 con ClH 35%, y se mantiene a 4°C.

En la tabla siguiente se refleja la cantidad de *Trizma Base* necesaria para preparar distintos volúmenes de tampón Tris-HCl 0.1M pH 7.4.

Volumen (ml)	Peso (g)
100	1.211
200	2.423
500	6.057
1000	12.114

**Tabla 2:** cantidad de *Trizma Base* para preparar el volumen requerido de tampón Tris-HCl 0.1M pH 7.4.

### **1.3.2 Enterocinasa (4 Unidades/ml)**

Se utiliza *Enterokinase from porcine intestine* (EK, 4.7 Units mg<sup>-1</sup> solid, Sigma) disuelta en tampón Tris-HCl con una concentración de 4 U/ml. La solución de EK se mantiene a 4°C durante todo el experimento, para ello se introduce el recipiente que la contiene en hielo.

La solución de EK es el principal factor limitante en el desarrollo y utilización de este método: primero, porque constituye el limitante económico del mismo, al ser ciertamente cara; y segundo, porque debe asegurarse su estabilidad, manteniendo el pH en 7.4 y una temperatura de 4°C.

Esta solución se perfunde por el sistema con un flujo de 0.25 ml/min, preparándose distintas cantidades de acuerdo con el tiempo de experimentación programado (tabla 3).

min de experimentación	mg EK	ml tampón
30	6.38	7.50
60	12.77	15.00
90	19.15	22.50
120	25.53	30.00
150	31.91	37.50
180	38.30	45.00
210	44.68	52.50
240	51.06	60.00
270	57.45	67.50
300	63.83	75.00
330	70.21	82.50
360	76.60	90.00
390	82.98	97.50
420	89.36	105.00

**Tabla 3:** cantidades de EK a disolver en tampón Tris-HCl, según la duración del experimento

### ***1.4 Solución de BAPNA (1 mg/ml)***

Se ha utilizado N $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA, PM=434.9, Sigma) preparando una disolución inicial en DMSO (Sigma), con una proporción de 1 mg de BAPNA cada 5  $\mu$ l DMSO.

Tras esperar aproximadamente 20 min para la disolución completa, se toman 5  $\mu$ l de la disolución inicial por cada 1 ml de agua bidestilada, para alcanzar la concentración final de 1 mg BAPNA/ml. Esta disolución se mantiene a temperatura ambiente.

Del mismo modo que la EK, esta solución se perfunde por el sistema con un flujo de 0.25 ml/min, preparándose diferentes volúmenes de acuerdo con el tiempo de experimentación previsto (tabla 4).

Solución inicial	min de experimentación	$\mu\text{l}$ de la solución inicial (DMSO)	ml de agua
40 mg BAPNA en 200 $\mu\text{l}$ DMSO	40	50	10
	80	100	20
	120	150	30
	160	200	40
80 mg BAPNA en 400 $\mu\text{l}$ DMSO	200	250	50
	240	300	60
	280	350	70
	320	400	80
120 mg BAPNA en 600 $\mu\text{l}$ DMSO	360	450	90
	400	500	100
	440	550	110
	480	600	120
160 mg BAPNA en 800 $\mu\text{l}$ DMSO	520	650	130
	560	700	140
	600	750	150
	640	800	160
200 mg BAPNA en 1000 $\mu\text{l}$ DMSO	680	850	170
	720	900	180
	760	950	190
	800	1000	200

**Tabla 4:** cantidades de BAPNA a disolver en DMSO, y volumen de esta solución a diluir en agua, según la duración del experimento



## ***IV–Resultados***



# *1. Desarrollo de un sistema de determinación de tripsina en continuo*

---

La determinación de la tripsina (tripsinógeno) secretada por segmentos pancreáticos se efectuó según un método espectrofotométrico desarrollado durante la fase experimental de esta Memoria de Licenciatura en el Departamento de Fisiología de UEX (Tapia y cols, 1995; San Roman y cols, 1995). Este método se basa en la capacidad de la tripsina de hidrolizar el sustrato cromogénico BAPNA (N $\alpha$ -benzoyl-DL-arginina-4-nitroanilida). Tras esta hidrólisis se libera la paranitroanilina, un cromóforo fácilmente detectable por espectrofotometría a 405 nm (Geiger y Fritz, 1984). La liberación del cromóforo tras la hidrólisis del sustrato se produce de forma proporcional a la cantidad de tripsinógeno liberado por el tejido pancreático.

Previamente a su determinación hay que activar la tripsina puesto que es secretada por el tejido pancreático como tripsinógeno, un zimógeno o forma inactiva. Para la activación se adiciona a la mezcla de reacción enterocinasa (EK). La activación de tripsinógeno a tripsina ocurre muy rápidamente por la EK o trazas de tripsina, eliminando del proenzima el péptido N-terminal con la secuencia Val-(Asp)<sub>4</sub>-Lys, que está muy cargado negativamente. La escisión, por tanto, ocurre entre los aminoácidos Lys 6 e Ile 7 del zimógeno y es muy selectiva.

## ***1.1 Descripción del protocolo experimental***

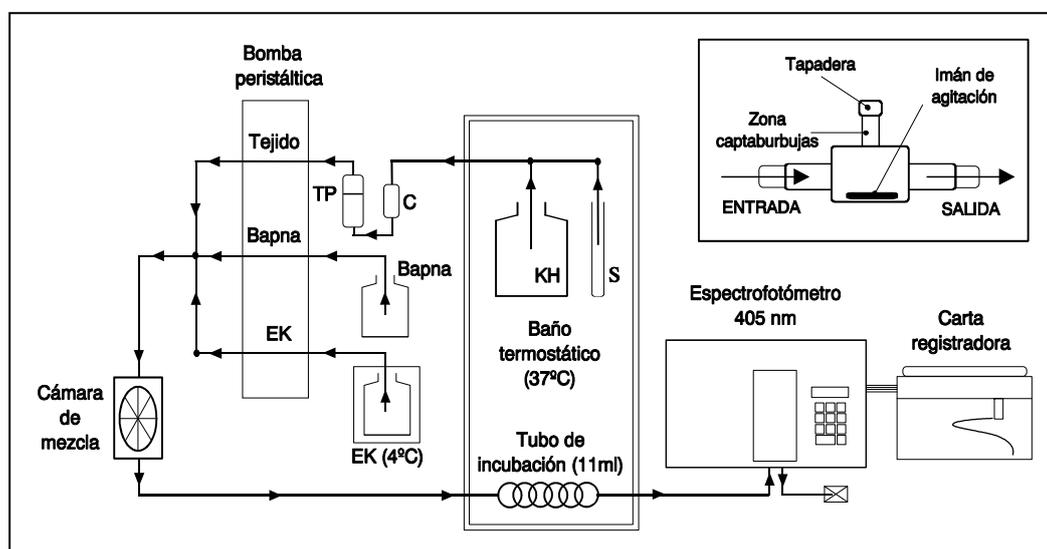
La obtención de los segmentos pancreáticos se realiza mediante el modo descrito en el apartado *Materiales y métodos*. El efluente de la cámara de perfusión (1.5 ml/min) converge por una parte con la solución de EK (0.25 ml/min), y por otra con la solución de BAPNA (0.25 ml/min), según se esquematiza en la figura 1. La solución de EK tiene una concentración de 4 U/ml (Enterokinase from porcine intestine, Sigma), disuelta en un tampón Tris-HCl 0.1M, pH 7.4, para la activación de tripsinógeno a tripsina. La solución de BAPNA (Sigma) se prepara disolviendo

200 mg en 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), a esta disolución se le añaden 200 ml de agua bidestilada para alcanzar la concentración final de 1 mg/ml.

A continuación, el efluente de la cámara de perfusión junto con la disolución de BAPNA y de EK, se hace pasar por la *cámara de mezcla*. Esta cámara tiene una capacidad aproximada de 1.5 ml, y aquí se completa la mezcla de los componentes de la reacción al disponer de un pequeño agitador magnético en su interior.

Una vez mezclados los componentes se permite que la reacción tenga lugar durante aproximadamente 7 minutos, al pasar el efluente por un tubo de incubación de pequeño diámetro y una capacidad de 11 ml, situado en un baño termostático a 37°C. El producto de la reacción pasa, finalmente, por una cubeta de cuarzo diseñada para la medición en continuo y con un volumen muerto muy pequeño (80  $\mu$ l de capacidad). La absorbancia se mide a 405 nm y los valores se registran continuamente en una carta registradora conectada al espectrofotómetro.

El voltaje de la carta registradora se ajusta a 1 voltio, y la velocidad del papel a 160 mm/hora. La ordenada límite del espectrofotómetro se fija en 0.300 unidades de absorbancia (UA), de forma que el intervalo de medición está comprendido entre 0 y 0.300 UA. Cuando la absorbancia es 0 (0 UA) el espectrofotómetro manda 0 voltios a la carta, y con 0.300 UA manda 1 voltio (el máximo). En la carta, cada cm de desplazamiento vertical se corresponde con 0.012 UA, y cada cm de desplazamiento horizontal con 3.75 minutos.



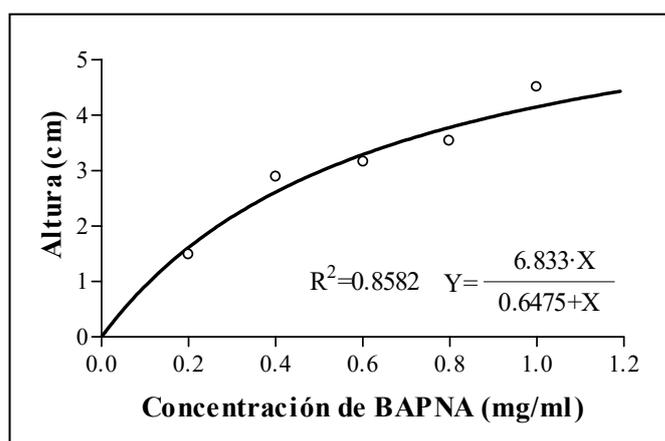
**Figura 1:** diagrama de flujo del sistema de determinación de tripsina en continuo. Abreviaturas: S, secretagogo; KH, tampón fisiológico (Krebs-Henseleit); C, captaburbujas; TP, tejido pancreático en la cámara de perfusión; Bapna, N $\alpha$ -benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida; EK, enterocinasa. Símbolos: ☒, sumidero. En el recuadro: detalle de la cámara de mezcla.

## 1.2 Condiciones de la reacción

### 1.2.1 Concentración de BAPNA

Para calcular la concentración óptima del sustrato se añadieron cantidades crecientes de BAPNA al medio de perfusión, manteniendo constante la concentración de EK (3 U/ml). Como estándar se utiliza una concentración constante de tripsinógeno de 3 µg/ml.

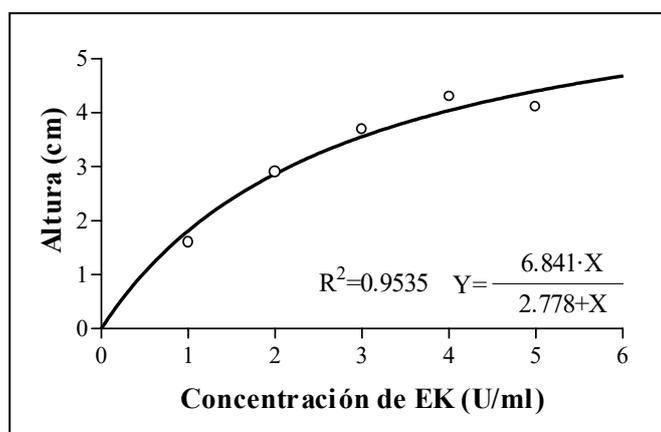
El BAPNA es muy poco soluble en medio acuoso y requiere una disolución previa en dimetilsulfóxido (DMSO), posteriormente se añade a esta disolución la cantidad de agua bidestilada requerida para alcanzar la concentración buscada. Se ensayaron concentraciones de BAPNA en el intervalo 0.2 mg/ml – 1 mg/ml.



**Figura 2:** curva de saturación del BAPNA, a una concentración constante de enterocinasa (3 U/ml).

### 1.2.2 Concentración de enterocinasa

Una vez ajustada la concentración de sustrato que podemos emplear se determina la concentración de EK que ofrece el mejor rendimiento. Para ello se adicionan cantidades crecientes de EK a una concentración constante de BAPNA (0.8 mg/ml). Se utiliza con esta concentración porque el sustrato no está saturado y se pueden detectar más fácilmente variaciones dependientes del cambio en la concentración del enzima. Como patrón para evaluar las diferencias se utiliza el tripsinógeno a una concentración constante de 3 µg/ml.



**Figura 3:** curva de saturación de la enterocinasa para una concentración de sustrato constante (0.8 mg/ml).

En estas condiciones la concentración de EK que se muestra más adecuada es 4 U/ml, la respuesta se incrementa progresivamente hasta esta concentración y mayor cantidad de enzima no ofrece mejor rendimiento.

### 1.2.3 Condiciones físico-químicas

La EK se diluye en un tampón sin calcio Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, y se mantiene a 4°C durante todo el protocolo experimental. Se ha utilizado también un tampón Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4 ofreciendo peor rendimiento.

La reacción se incubó a 37°C durante 7 minutos. La temperatura de incubación se ha variado en un intervalo de 26 a 42°C, sin que se hayan registrado diferencias significativas.

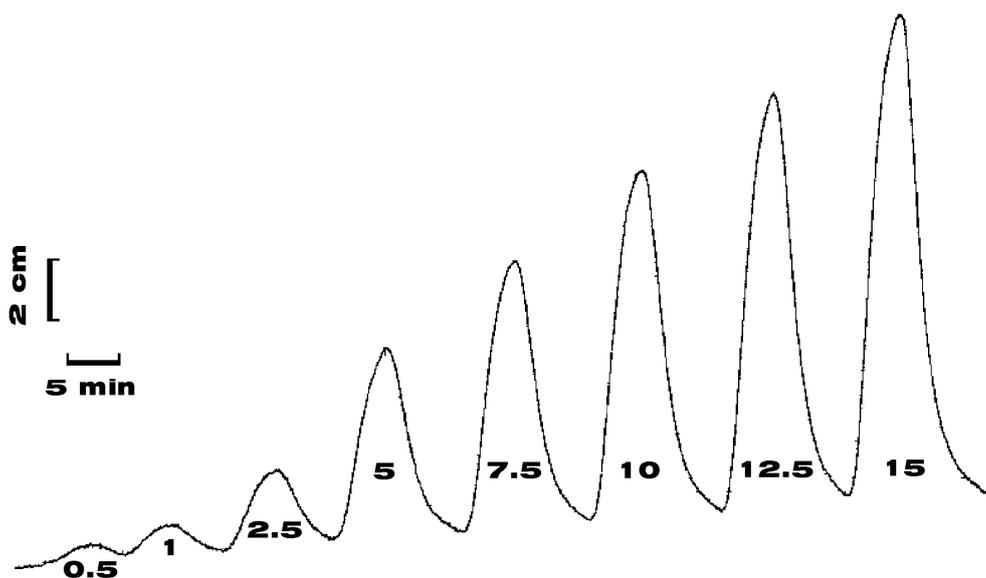
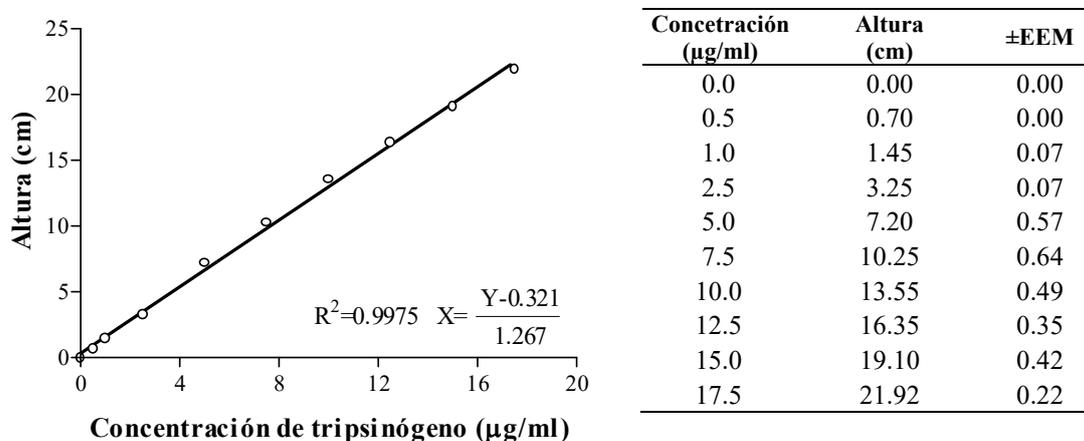
También se ha probado a añadir CaCl<sub>2</sub> (20mM) como fuente de calcio para la función y estabilidad enzimáticas, sin embargo el rendimiento empeora al producirse la precipitación del calcio durante la incubación de la reacción y, de este modo, interferir con las determinaciones espectrofotométricas. El calcio requerido como cofactor por estas enzimas, no es un factor limitante en la reacción puesto que se encuentra en el tampón fisiológico perfundido (Krebs-Henseleit).

## 1.3 Estandarización de la técnica

### 1.3.1 Curvas de calibración

Una vez sentadas las condiciones de la reacción, se realizan dos rectas de calibración del sistema para evaluar la linealidad de las determinaciones. La primera recta se hace con tripsina (*Type II-S*, Sigma), y la segunda con tripsinógeno (*Ttrypsinogen from bovine pancreas*, Sigma). Ambas rectas muestran una correlación lineal muy alta, no llegándose en ninguno de los dos casos a condiciones de saturación.

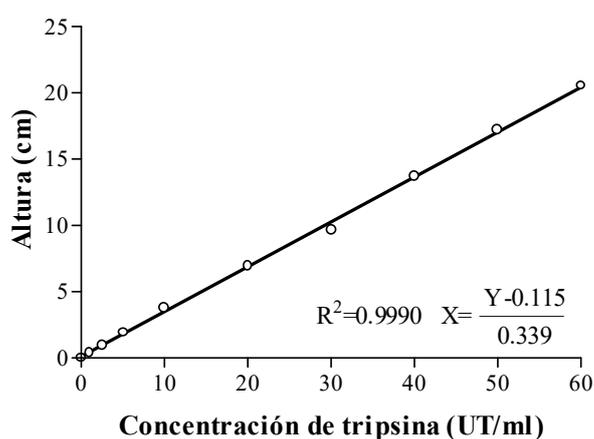
La curva de calibración del tripsinógeno se recoge en la siguiente figura:



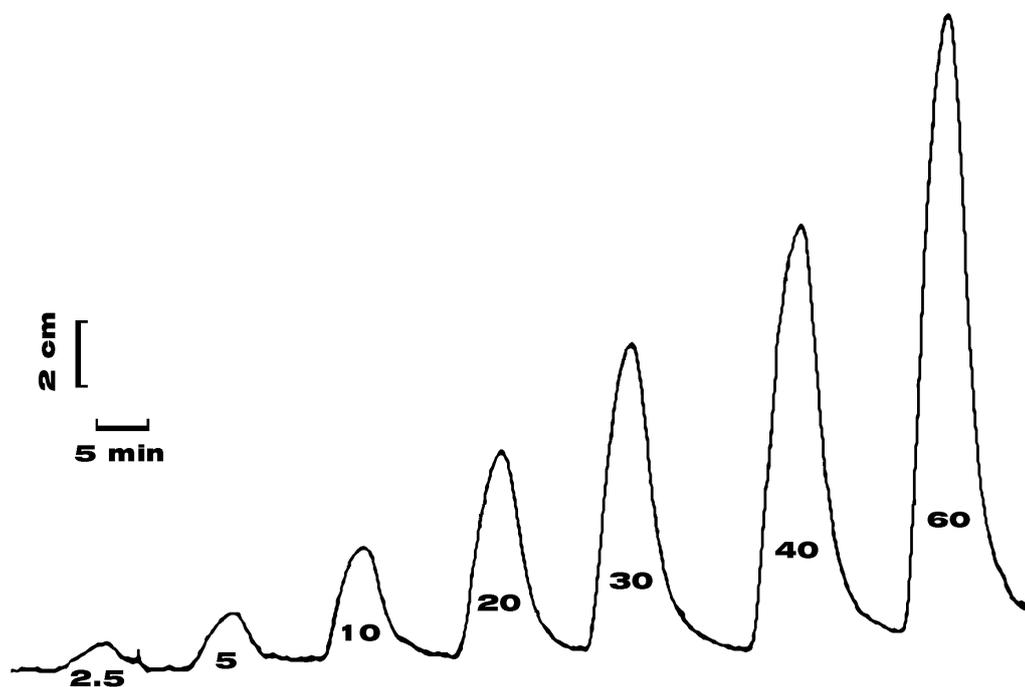
**Figura 4:** Arriba, curva estándar para el tripsinógeno. En la tabla se incluyen los valores obtenidos (n=4). Debajo, registro original de las soluciones estándar de tripsinógeno (µg/ml).

Los valores obtenidos para la curva estándar de tripsina muestran una marcada tendencia lineal en el intervalo ensayado (1–60 UT/ml). Se ajusta una recta por regresión lineal que presenta un grado de correlación muy alto ( $R^2=0.999$ ) y que permitirá determinar posteriormente la cantidad de tripsina secretada por el tejido pancreático.

La curva de calibración de la tripsina es la siguiente:



Concetración (UT/ml)	Altura (cm)	±EEM
0.0	0.00	0.00
1.0	0.43	0.11
2.5	1.00	0.14
5.0	1.93	0.25
10.0	3.80	0.25
20.0	6.90	0.44
30.0	9.70	0.71
40.0	13.67	1.14
50.0	17.17	1.14
60.0	20.55	2.90



**Figura 5:** Arriba, curva estándar para la tripsina. En la tabla se incluyen los valores obtenidos ( $n=5$ ). Debajo, registro original de las soluciones estándar de tripsina (UT/ml).

### 1.3.2 Cálculo de la cantidad de tripsina secretada por el tejido

El intervalo utilizado en la recta de calibración de tripsina (1–60 UT/ml) y su carácter lineal nos permite interpolar con precisión la cantidad de tripsina secretada por el tejido pancreático, que tiene un máximo registrado en algunas aproximaciones experimentales en cerca de 45 UT/min/100mg, y el mínimo en 0.5 UT/min/100mg.

La cantidad de tripsina determinada en el efluente del tejido pancreático se estandariza respecto a UT, ya que ésta es la forma en que se cuantifica la tripsina ensayada en la recta de calibración. Una Unidad BAEE de tripsina (UT) se define como la cantidad de tripsina que produce un incremento de 0.001 por minuto en la absorbancia a 253 nm con BAEE (N $\alpha$ -benzoil-L-arginina etil ester) como sustrato a pH 7.6 y 25°C. Para cuantificar y estandarizar la secreción en UT utilizamos la recta patrón de tripsina:

$$\text{Producción de tripsina (UT / ml)} = \frac{\text{Altura (cm)} - 0.11546}{0.33865}$$

Posteriormente se han estandarizado los valores para minutos (flujo de perfusión de segmentos 1.5 ml/min):

$$\text{Producción de tripsina (UT / min)} = \frac{\text{Altura (cm)} - 0.11546}{0.33865} \times 1.5$$

Finalmente, se estandarizan los valores para 100 mg de tejido seco, resultando la siguiente expresión:

$$P. \text{ de tripsina (UT / min / 100 mg)} = \frac{\frac{\text{Altura (cm)} - 0.11546}{0.33865} \times 1.5}{\text{Peso del tejido (mg)}} \times 100$$

## ***1.4 Descripción del diseño experimental***

El protocolo experimental, que aparece esquematizado en la figura 6, comienza añadiendo al sistema la solución de BAPNA, pero simultáneamente debe mantenerse el mismo flujo que tendrá el sistema durante el resto del experimento. Con este fin también se hace pasar tampón Tris-HCl desde la bomba que impulsa la solución de EK, y tampón fisiológico desde la que impele el efluente de la cámara de perfusión del tejido (ver figura 1).

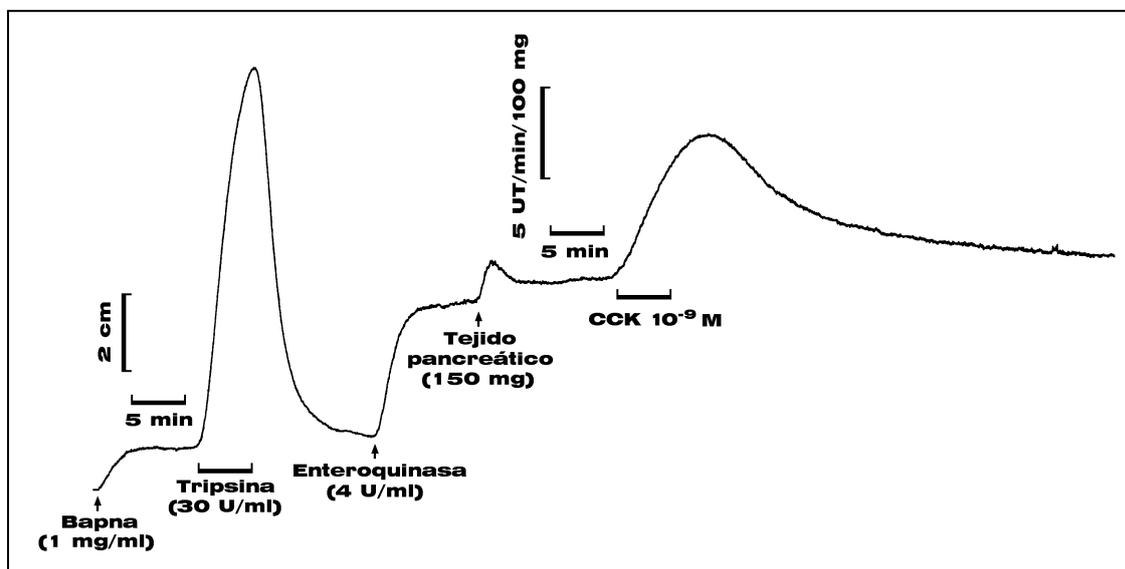
El BAPNA, por si sólo, provoca una absorbancia residual, correspondiente al sustrato no hidrolizado y no a una liberación espontánea de paranitroanilina. La absorbancia residual se registra como un incremento en la línea basal al detectarse el BAPNA en el espectrofotómetro.

Una vez se ha estabilizado la absorción debida al BAPNA, se realiza una calibración del sistema con una concentración estándar de tripsina de 10, 20, 30, 40 ó 50 UT/ml, utilizando de forma alterna una de las 5 concentraciones para cada experimento independiente. Con estos datos se calcula el coeficiente de variación del sistema para la tripsina.

A continuación, y tras alcanzar de nuevo la absorbancia residual del sustrato, se impele por el sistema la solución de EK que, al igual que el BAPNA, incrementa la absorbancia basal, que también se mantendrá constante a lo largo del diseño experimental. En algunas ocasiones, en lugar de tripsina, se han utilizado concentraciones estándar de tripsinógeno para realizar la calibración. En estos casos la calibración debe realizarse después de que la disolución de EK esté circulando por el sistema. De nuevo, con los valores obtenidos se ha calculado el coeficiente de variación para el tripsinógeno.

Cuando se estabiliza el registro de absorbancia debida a la EK, se impele por el sistema el efluente procedente del tejido pancreático mediante una llave de flujo, que redirecciona el efluente hacia la cámara donde se mezclará con la solución de BAPNA y EK (ver figura 1). Previamente, mientras se equilibra el sistema y se realiza la calibración, la bomba que perfunde los segmentos pancreáticos está en funcionamiento, pero el efluente es descartado. De esta forma se permite el equilibrado del tejido, que dura aproximadamente 30 minutos, mientras se realizan las calibraciones. Una vez se ha estabilizado la secreción, puede medirse la liberación basal o no estimulada de tripsinógeno del tejido pancreático. El sistema, por último, está preparado para añadir al medio de perfusión el agonista en estudio y medir sus efectos.

Cuando se termina el experimento con un tejido éste se retira de la cámara de perfusión, se seca en papel de filtro y se pesa, para expresar los datos como 100 mg de tejido seco. Para continuar el diseño experimental debe cargarse la cámara de perfusión con nuevo tejido y, tras el pertinente equilibrado, se impulsa el efluente de este nuevo tejido por el sistema.



**Figura 6:** registro original que recoge la absorbancia a 405 nm a lo largo del protocolo experimental.

## *2. Validación del sistema de determinación de tripsinas en continuo*

---

Una vez desarrollado y establecido, el método se empleó para caracterizar la liberación de tripsina (tripsinógeno) en segmentos pancreáticos de cobaya. Para ello, primero determinamos la secreción basal (o secreción no estimulada) de tripsina, y posteriormente utilizamos secretagogos clásicos, que actúan a través las dos vías mayoritarias de acoplamiento estímulo–respuesta.

Con este último objetivo se utilizaron distintas concentraciones de agonistas que ejercen su acción a través de la vía de los inosítoles fosfato (ACh y CCK), y TPA, sustancia que activa específicamente la PKC, un intermediario en esta vía.

Para estudiar la secreción dependiente de la vía del AMPc se utilizaron secretina y VIP a distintas concentraciones. También se cuantifica la secreción de tripsina estimulada por histamina, secretagogo que parece actuar por esta última vía.

Finalmente, buscando posibles interacciones, se caracterizó la secreción de tripsinas por la estimulación conjunta de secretina y CCK, por una parte, e histamina y CCK, por otra.

## ***2.1 Secreción basal de tripsina***

La secreción basal de tripsina en segmentos pancreáticos de cobaya es de  $2.29 \pm 0.33$  UT/min/100mg (n=10). Ésta se ha estimado tras depositar los segmentos en la cámara de perfusión y esperar 30 min hasta que se estabiliza la secreción, es entonces cuando se mide la secreción basal como la altura que alcanza la línea registrada.

Para calcular la secreción basal de tripsina y para calcular el resto de valores relativos a secreción, se han estimado las unidades de tripsina (UT) partiendo de la curva estándar de tripsina, y estandarizando los resultados para 100 mg y minutos, según las ecuaciones:

Curva estándar de tripsina:

$$\text{Producción de tripsina (UT / ml)} = \frac{\text{Altura (cm)} - 0.11546}{0.33865}$$

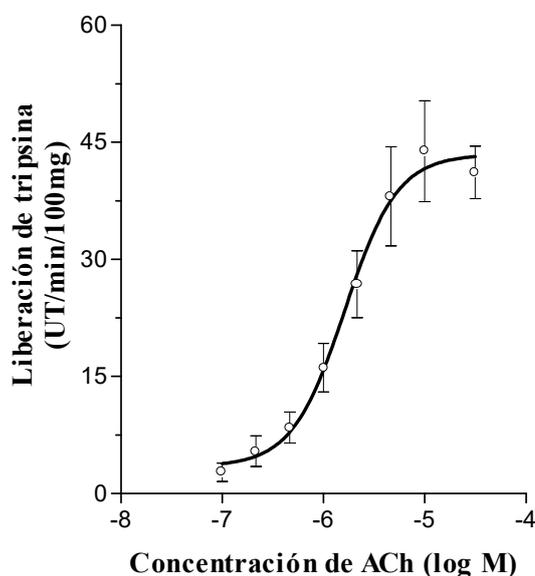
Estandarización de los resultados para 100 mg de peso seco y minutos:

$$\text{Tripsina (UT / min / 100 mg)} = \frac{\frac{\text{Altura (cm)} - 0.11546}{0.33865} \times 1.5}{\text{Peso del tejido (mg)}} \times 100$$

## 2.2 Estudio de la secreción de tripsinas dependiente de la vía del calcio

### 2.2.1 Experimentos con ACh

La perfusión de segmentos pancreáticos con diferentes concentraciones de ACh ( $3.16 \times 10^{-5}$ ,  $10^{-5}$ ,  $2.16 \times 10^{-6}$ ,  $4.64 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-6}$ ,  $2.16 \times 10^{-7}$ ,  $4.64 \times 10^{-7}$  y  $10^{-7}$  M) provoca un marcado incremento en la liberación de tripsina. Este incremento se produce de forma dependiente de la concentración. El efecto máximo ( $43.83 \pm 6.45$  UT/min/100mg) en respuesta a la ACh se obtiene a la concentración  $10^{-5}$  M, y la concentración efectiva 50 ( $EC_{50}$ ) es  $2.16 \times 10^{-6}$  M.



Concentración (M)	Lib. de tripsina (UT/min/100mg)	±EEM
$3.16 \times 10^{-5}$	41.13	3.37
$1.00 \times 10^{-5}$	43.83	6.45
$4.64 \times 10^{-6}$	35.08	8.70
$2.15 \times 10^{-6}$	26.80	3.82
$1.00 \times 10^{-6}$	16.13	3.10
$4.64 \times 10^{-7}$	8.45	1.97
$2.15 \times 10^{-7}$	5.43	1.95
$1.00 \times 10^{-7}$	2.72	1.19

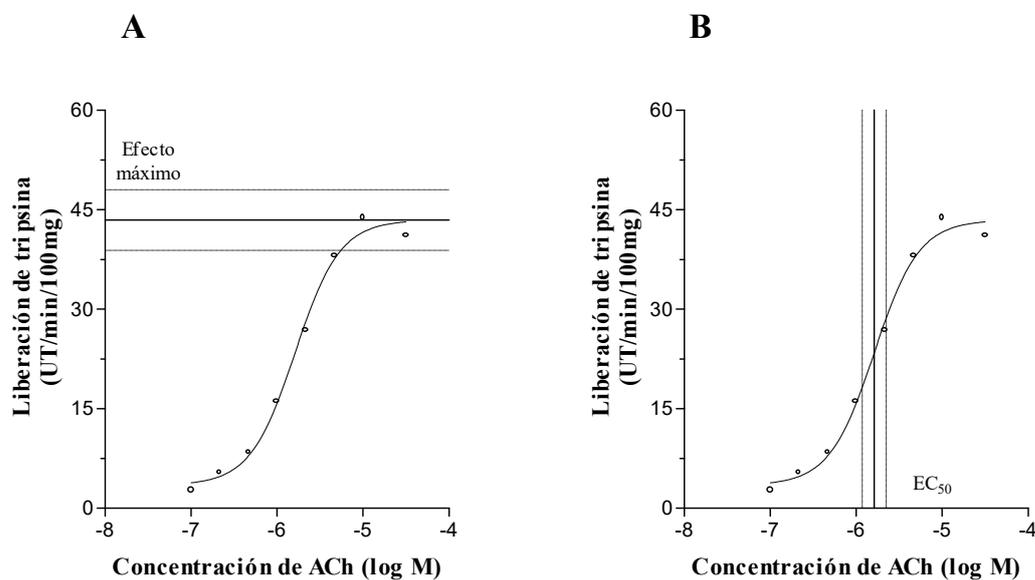
**Figura 7:** curva concentración-efecto de la ACh sobre la secreción de tripsina en segmentos pancreáticos de cobaya. Las respuestas están expresadas como incremento neto sobre el basal, cada punto es la media  $\pm$  EEM de al menos 5 experimentos diferentes. En la tabla se incluyen los valores obtenidos para las diferentes concentraciones de ACh.

Con los valores obtenidos se ha realizado un ajuste de regresión no lineal, que tiene los siguientes parámetros:

Variables		±Error est.	95% Interv. confianza	Calidad del ajuste	
Efec. mínimo	3.449	1.596	-0.9825 a 7.880	Grados de libertad	4
Efec. máximo	43.43	1.651	38.84 a 48.01	R <sup>2</sup>	0.9934
LogEC50	-5.79	0.04942	-5.927 a -5.653	Suma de cuadrados	13.04
Pendiente	1.669	0.297	0.8441 a 2.493	Sy.x	1.806
EC50	1.62E-06	—	1.183E-6 a 2.225E-6	Nº de valores X	8

**Tabla 1:** parámetros del ajuste no lineal para la curva concentración–efecto de la ACh.

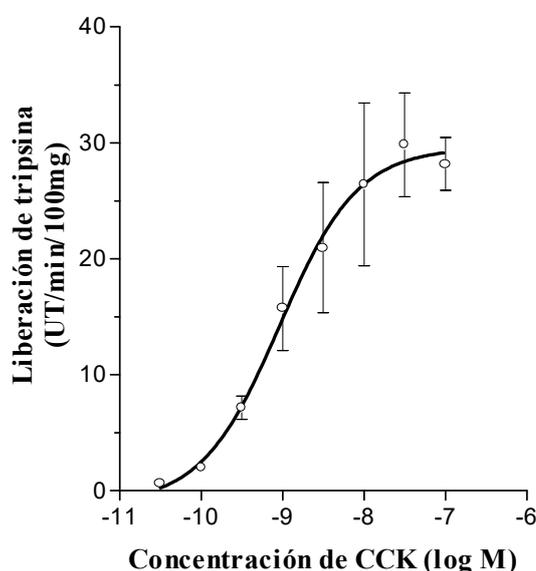
A continuación se representan los intervalos de confianza (95%) para el efecto máximo (43.43 UT/min/100mg) y la concentración efectiva 50 (1.62x10<sup>-6</sup> M) dependientes de la estimulación con ACh, estimados por el ajuste no lineal recogido en la tabla 1.



**Figura 8:** representación de los intervalos de confianza estimados en la curva concentración–respuesta de la ACh, para el efecto máximo (A) y para la EC<sub>50</sub> (B).

### 2.2.2 Experimentos con CCK

De igual forma que con ACh, la perfusión de segmentos pancreáticos con diferentes concentraciones de CCK ( $10^{-7}$ ,  $3.16 \times 10^{-8}$ ,  $10^{-8}$ ,  $3.16 \times 10^{-9}$ ,  $10^{-9}$ ,  $3.16 \times 10^{-10}$ ,  $10^{-10}$  y  $3.16 \times 10^{-11}$  M) provoca un marcado incremento en la liberación de tripsina dependiente de la concentración. La máxima respuesta secretora en respuesta a CCK ( $29.83 \pm 4.48$  UT/min/100mg) se obtiene a la concentración  $3.16 \times 10^{-8}$  M, y la concentración efectiva 50 es  $10^{-9}$  M.



Concetración (M)	Lib. de tripsina (UT/min/100mg)	±EEM
$1.00 \times 10^{-7}$	28.18	2.28
$3.16 \times 10^{-8}$	29.83	4.48
$1.00 \times 10^{-8}$	26.41	7.01
$3.16 \times 10^{-9}$	20.97	5.62
$1.00 \times 10^{-9}$	15.70	3.62
$3.16 \times 10^{-10}$	7.17	1.00
$1.00 \times 10^{-10}$	1.98	0.41
$3.16 \times 10^{-11}$	0.61	0.19

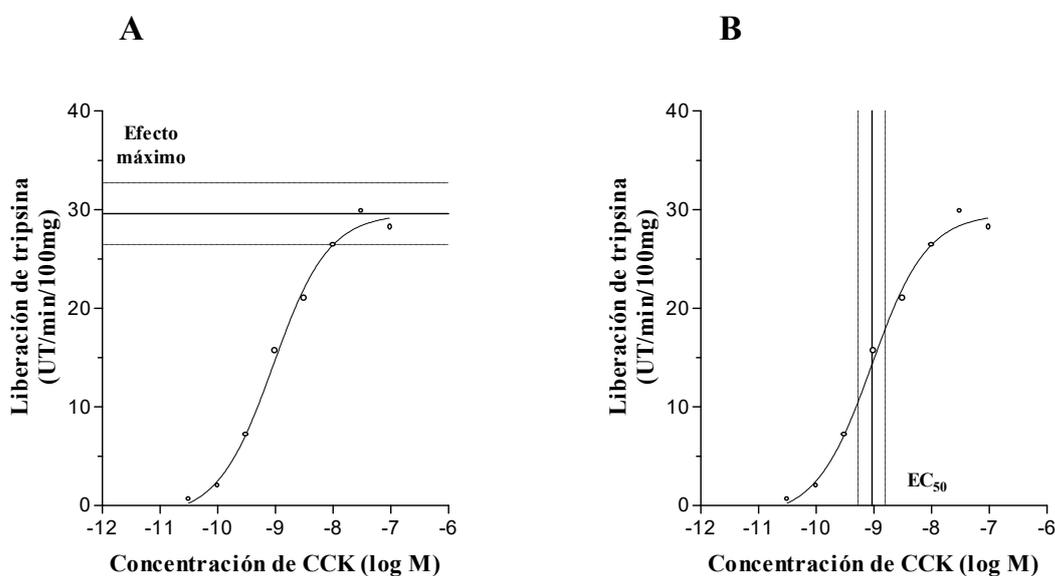
**Figura 9:** curva concentración-efecto de la CCK en la liberación de tripsina. Se representan las medias  $\pm$  EEM de al menos 5 experimentos diferentes. En la tabla se incluyen los valores obtenidos para las diferentes concentraciones de CCK ensayadas.

De nuevo se ajusta una curva de regresión no lineal a los valores obtenidos con CCK, con los siguientes parámetros:

Variables	±Error est.	95% Interv. confianza	Calidad del ajuste
Efec. mínimo	-1.134	1.736	-5.953 a 3.685
Efec. máximo	29.59	1.13	26.45 a 32.72
LogEC50	-9.036	0.08465	-9.271 a -8.801
Pendiente	0.9065	0.1611	0.4594 a 1.354
EC50	9.20E-10	—	5.3e-10 a 1.5e-9
			Grados de libertad
			4
			R <sup>2</sup>
			0.9946
			Suma de cuadrados
			5.34
			Sy.x
			1.155
			Nº de valores X
			8

**Tabla 2:** parámetros del ajuste no lineal para la curva concentración–efecto de CCK.

A continuación se representan los intervalos de confianza para el efecto máximo estimado (29.59 UT/min/100mg) y la concentración efectiva 50 (9.20x10<sup>-10</sup> M), obtenidos ambos por el ajuste no lineal recogido en la tabla 2.

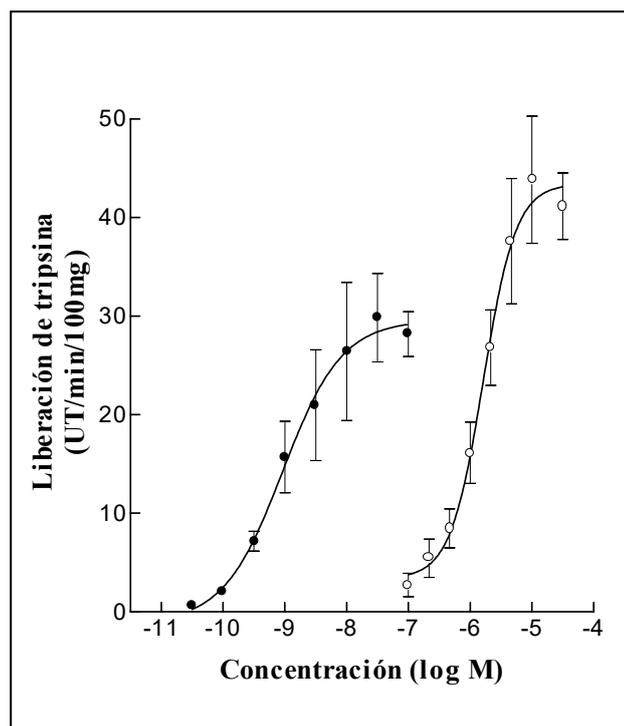


**Figura 10:** representación de los intervalos de confianza estimados para el efecto máximo (A) y la EC<sub>50</sub> (B), sobre la curva concentración–efecto de la CCK.

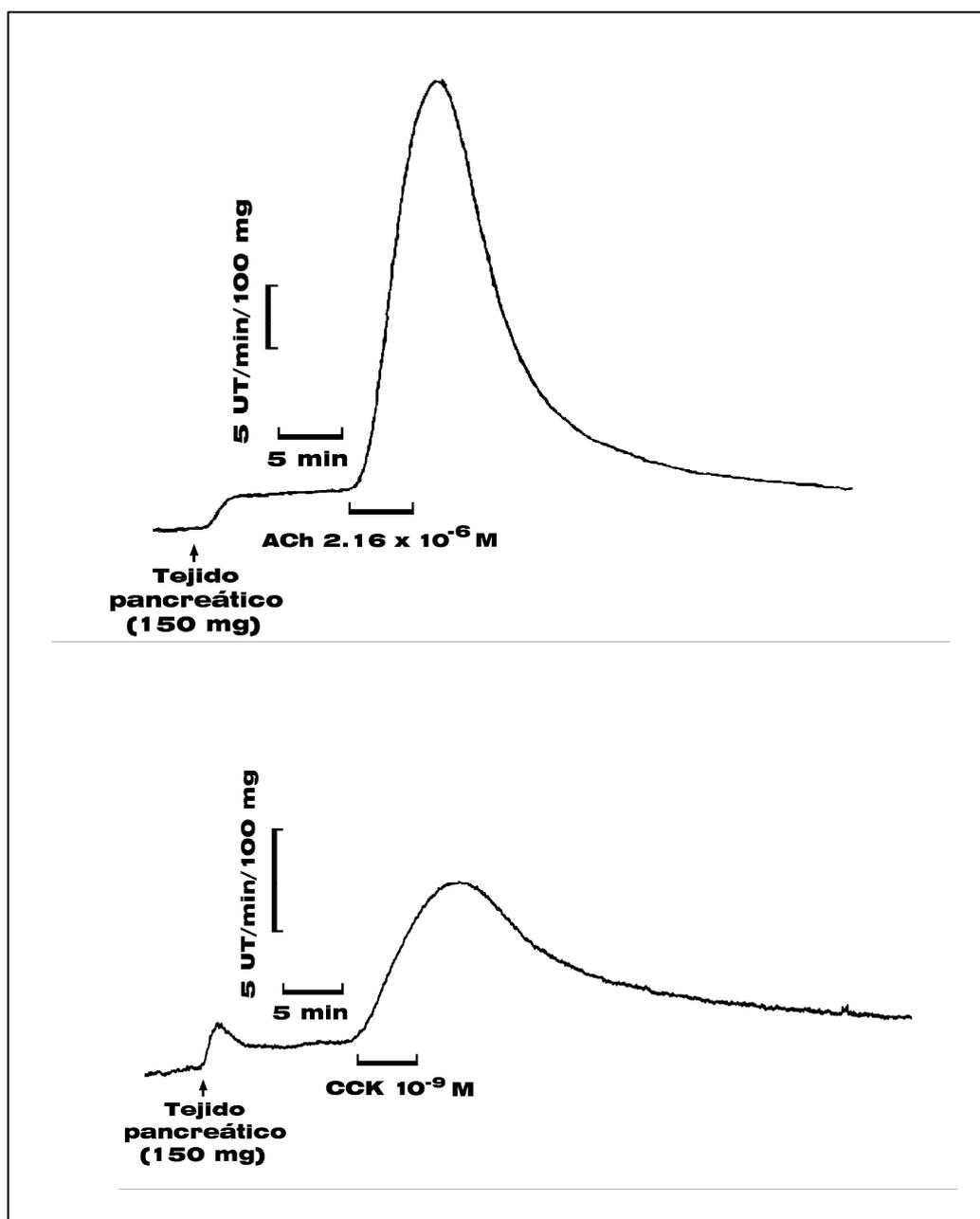
### 2.2.3 Comparación de los efectos de la CCK y la ACh en la secreción de tripsinas

La máxima secreción de tripsinas obtenida por la estimulación con ACh (43.8 UT/min/100mg) es mayor que la obtenida por CCK (29.5 UT/min/100mg); sin embargo, para lograr este efecto máximo la ACh requiere concentraciones más elevadas ( $10^{-5}$  M) en el medio de perfusión que la CCK ( $3.16 \times 10^{-8}$  M). De igual forma, al estudiar la concentración efectiva 50, encontramos que es mayor para la ACh ( $2.16 \times 10^{-6}$  M) que para la CCK ( $10^{-9}$  M) (figura 11).

Por otra parte, el perfil secretor dependiente de ACh es distinto que el de la CCK, como puede comprobarse en los registros originales que se incluyen en la figura 12. El efecto máximo obtenido por la ACh, para cualquier concentración ensayada, se alcanza antes que el obtenido estimulando los segmentos pancreáticos con CCK. Sin embargo, la secreción estimulada por CCK se mantiene durante más tiempo que la estimulada por ACh. Por tanto, la liberación de tripsinas desde segmentos pancreáticos de cobaya en respuesta a la ACh se produce de un modo más rápido pero menos sostenido que en respuesta a la CCK.



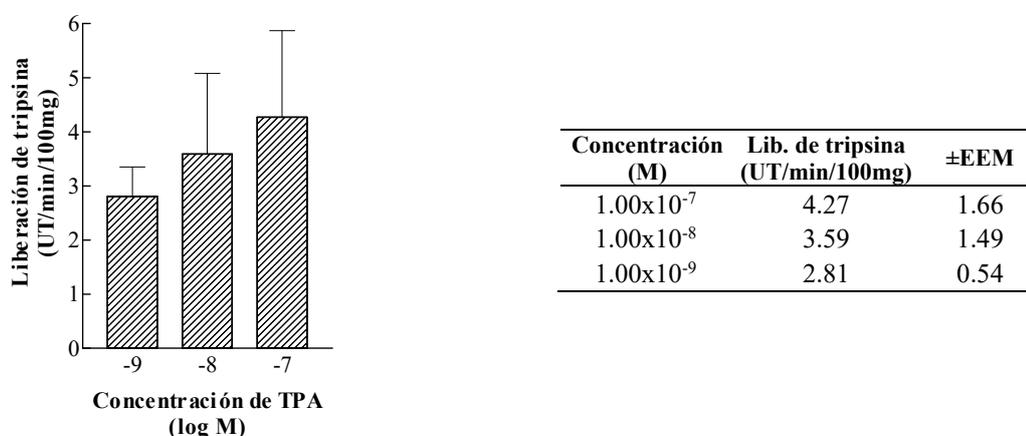
**Figura 11:** curvas concentración-efecto para la CCK (●) y la ACh (○) en la liberación de tripsina desde segmentos pancreáticos.



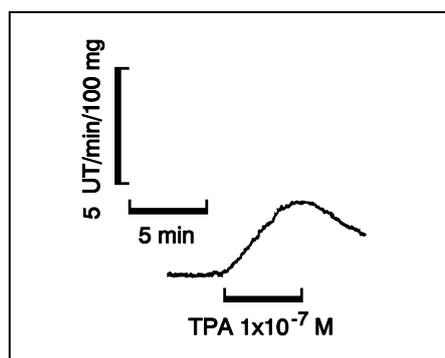
**Figura 12:** registros originales donde se muestra la respuesta secretora de segmentos pancreáticos de cobaya, obtenida tras la estimulación con la concentración EC<sub>50</sub> de ACh (2.16x10<sup>-6</sup> M, superior) y CCK (10<sup>-9</sup> M, inferior). Las barras de calibración horizontales representan 5 minutos, la barra vertical equivale a 5 UT/min/100mg de tejido seco.

### 2.3 Estudio de la secreción de tripsinas dependiente de la activación de la PKC por TPA

El TPA, a concentraciones de  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  M, provoca en segmentos pancreáticos perfundidos de cobaya, un moderado incremento en la liberación de tripsina, si se compara con la secreción inducida por ACh o CCK. Este incremento es dependiente de la concentración, y tiene un efecto máximo de  $4.27 \pm 1.66$  UT/min/100mg con la concentración  $10^{-7}$  M de TPA.



**Figura 13:** histogramas que representan la liberación de tripsina desde el tejido pancreático en respuesta a TPA. Los valores mostrados son la media + EEM de al menos 5 experimentos independientes. En la tabla se incluyen los valores obtenidos para las diferentes concentraciones de TPA.

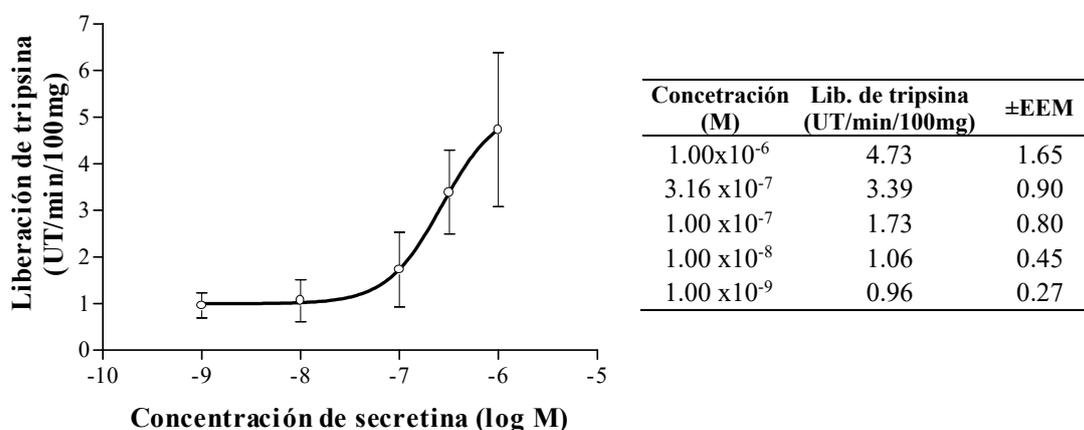


**Figura 14:** registro original de la liberación de tripsina en segmentos pancreáticos de cobaya, obtenido tras la estimulación con  $10^{-7}$  M de TPA. Las barras de calibración horizontales representan 5 minutos, la barra vertical equivale a 5 UT/min/100mg.

## 2.4 Estudio de la secreción de tripsinas dependiente de la vía del AMPc

### 2.4.1 Experimentos con secretina

Los segmentos pancreáticos estimulados con secretina a las concentraciones  $10^{-6}$ ,  $3.16 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  M incrementan la producción de tripsinas sobre el basal, de forma concentración-dependiente, con un efecto máximo en  $10^{-6}$  M.



**Figura 15:** curva concentración-efecto de la secretina en la secreción de tripsina. En la tabla se incluyen los valores obtenidos para las diferentes concentraciones de secretina ( $n \geq 5$ ).

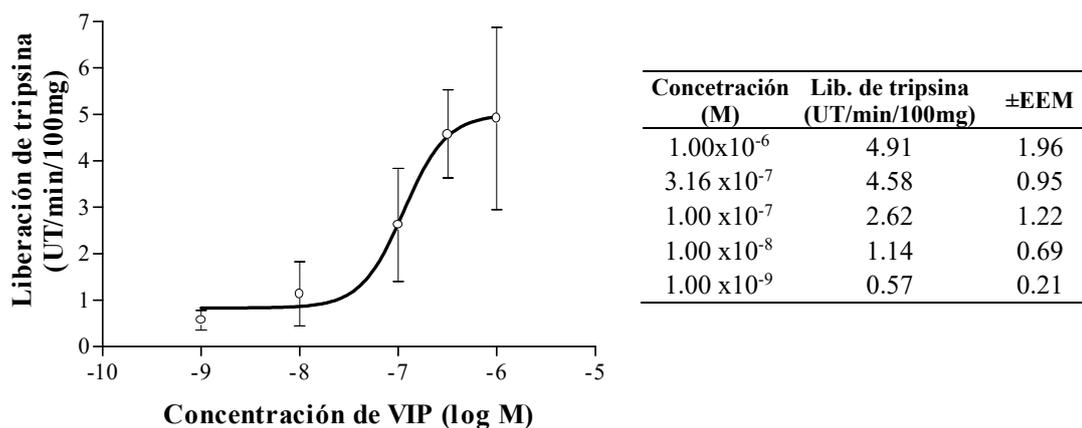
Con los valores obtenidos se ajusta una curva de regresión no lineal, con estos parámetros:

Variables	±Error est.	95% Interv. confianza	Calidad del ajuste	
Efec. mínimo	0.995798	0.040501	0.48119 a 1.51041	Grados de libertad 1
Efec. máximo	5.209174	0.148683	3.32001 a 7.09834	$R^2$ 0.999725
LogEC50	-6.57045	0.02825	-6.9294 a -6.2115	Suma de cuadrados 0.002954
Pendiente	1.56456	0.12309	0.000584649 a 3.12854	Sy.x 0.054351
EC50	2.69E-07	—	1.177e-7 a 6.145e-7	Nº de valores X 5

**Tabla 3:** parámetros del ajuste no lineal para la curva concentración-efecto de secretina.

### 2.4.2 Experimentos con VIP

El VIP provoca un efecto similar al de la secretina. Se han estudiado las mismas concentraciones que con aquella:  $10^{-6}$ ,  $3.16 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  M y, de igual forma, se incrementa la producción de tripsinas sobre el basal, de forma concentración–dependiente, con un efecto máximo en  $10^{-6}$  M.



**Figura 16:** curva concentración–efecto del VIP en la secreción de tripsina. En la tabla se incluyen los valores obtenidos para las diferentes concentraciones de VIP ( $n \geq 5$ ).

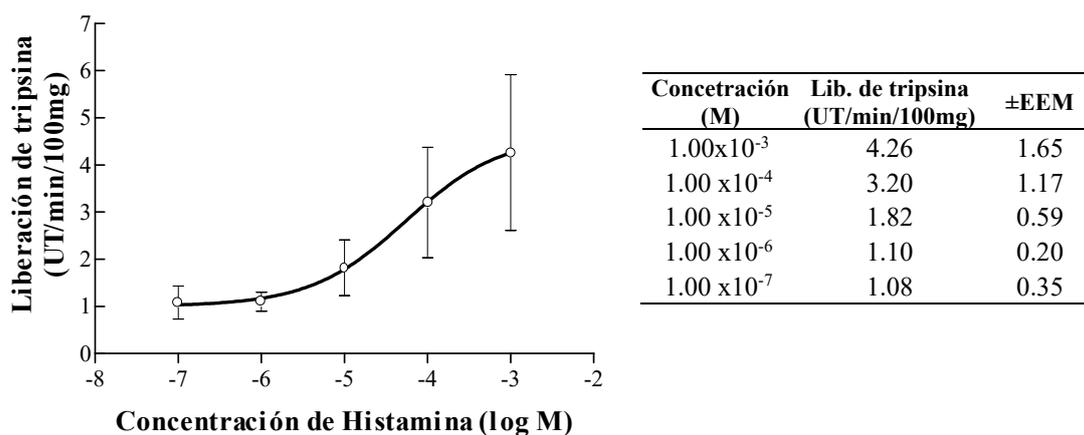
Con los valores obtenidos se ajusta una curva de regresión no lineal, con estos parámetros:

Variables	±Error est.	95% Interv. confianza	Calidad del ajuste		
Efec. mínimo	0.832835	0.283692	-2.77175 a 4.43742	Grados de libertad	1
Efec. máximo	4.998217	0.504728	-1.41486 a 11.4113	R <sup>2</sup>	0.99028
LogEC50	-6.94368	0.106216	-8.29326 a -5.59409	Suma de cuadrados	0.149449
Pendiente	2.000175	1.264748	-14.0697 a 18.0701	Sy.x	0.386587
EC50	1.14E-07	—	5.090e-9 a 2.546e-6	Nº de valores X	5

**Tabla 4:** parámetros del ajuste no lineal para la curva concentración–efecto de VIP.

### 2.4.3 Experimentos con histamina

El efecto máximo de la histamina es muy parecido a los del VIP y secretina, si bien la concentración requerida para lograr este efecto es mucho mayor para la histamina ( $10^{-3}$  M). Se han estudiado el efecto de la histamina a las concentraciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  M, y se observa que la secreción de tripsinas sobre el basal estimulada por histamina es dependiente de la concentración.



**Figura 17:** curva concentración–efecto en la secreción de tripsinas de la histamina. En la tabla se incluyen los valores obtenidos para las diferentes concentraciones de histamina ( $n \geq 5$ ).

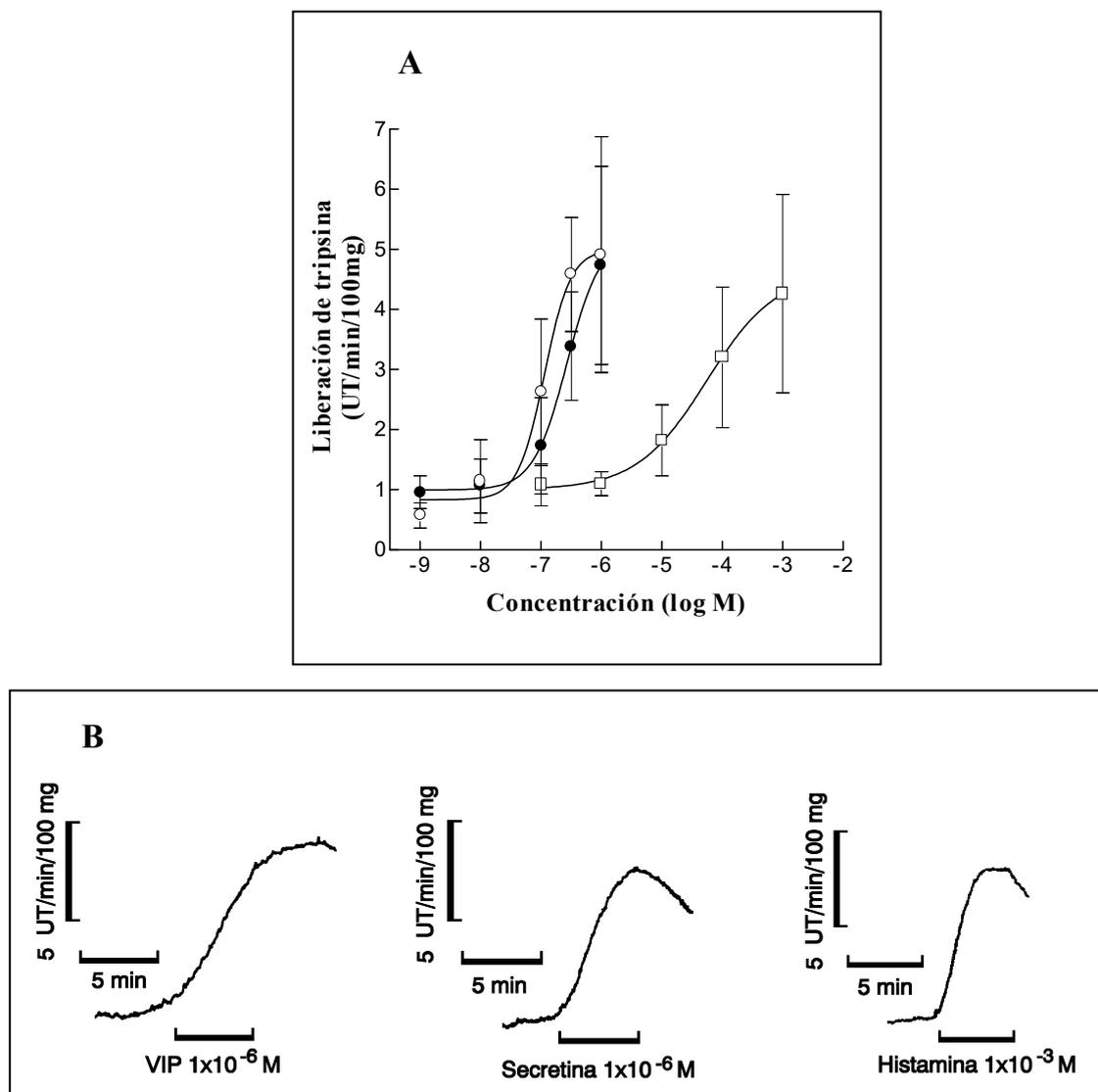
Con los valores obtenidos se ajusta una curva de regresión no lineal, con estos parámetros:

Variables	±Error est.	95% Interv. confianza	Calidad del ajuste		
Eféc. mínimo	1.001713	0.09487	-0.203706 a 2.20713	Grados de libertad	1
Eféc. máximo	4.621515	0.23645	1.61718 a 7.62585	R <sup>2</sup>	0.998915
LogEC50	-4.26031	0.10542	-5.59977 a -2.92085	Suma de cuadrados	0.008476
Pendiente	0.752985	0.12113	-0.786099 a 2.29207	Sy,x	0.092066
EC50	5.49E-05	—	2.513e-6 a 0.0012	Nº de valores X	5

**Tabla 5:** parámetros del ajuste no lineal para la curva concentración–efecto de histamina.

### 2.4.4 Comparación de los efectos del VIP, la secretina y la histamina en la secreción de tripsinas

La secreción de tripsinas estimulada por secretina y VIP, secretagogos que actúan incrementando los niveles intracelulares de AMPc, tiene un patrón muy similar con respuestas máximas en  $10^{-6}$  M de  $4.73 \pm 1.65$  y  $4.91 \pm 1.96$  UT/min/100mg respectivamente. La máxima secreción producida por histamina, en  $10^{-3}$  M, es de  $4.25 \pm 1.65$  UT/min/100mg.

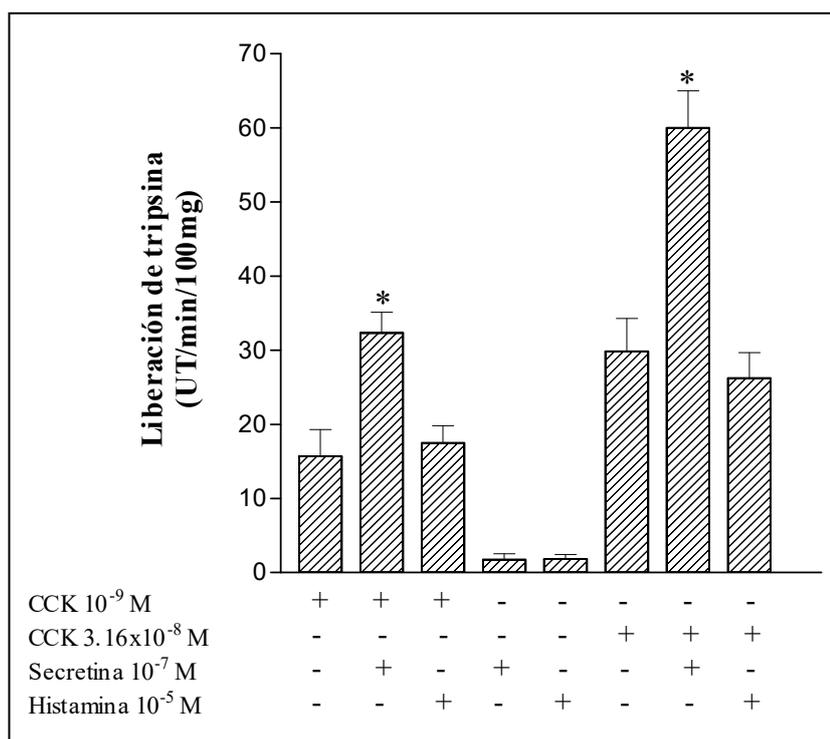


**Figura 18:** (A) curvas concentración–respuesta para el VIP (○), la secretina (●) y la histamina (◻) en la liberación de tripsina desde segmentos perfundidos pancreáticos de cobaya; (B) registros originales donde se muestra la respuesta máxima obtenida tras la estimulación con VIP ( $10^{-6}$  M), secretina ( $10^{-6}$  M) e Histamina ( $10^{-3}$  M). Las líneas de calibración horizontales representan 5 minutos, la vertical equivale a 5 UT/min/100mg de tejido seco.

## 2.5 Estudio del efecto de las interacciones CCK-secretina y CCK-histamina en la secreción de tripsinas

La figura 19 muestra la liberación de tripsina sobre el basal desde segmentos pancreáticos perfundidos tras la estimulación con CCK ( $10^{-9}$  y  $3.16 \times 10^{-8}$  M), secretina ( $10^{-7}$  M), histamina ( $10^{-5}$  M), dos combinaciones de CCK y secretina y dos combinaciones de CCK e histamina.

La liberación de tripsina estimulada por CCK-secretina es estadísticamente mayor ( $p < 0.05$ ) que la liberación estimulada por CCK o la suma de los efectos de CCK y secretina a esas concentraciones. Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas entre la liberación de tripsinas inducida por CCK sola o en combinación con histamina a la concentración  $EC_{50}$ . Estos resultados indican que la secretina puede potenciar el efecto de la CCK, por el contrario, la histamina no tiene un efecto detectable en la liberación de tripsinas estimulada por CCK.



**Figura 19:** histogramas que representan la media + EEM de la liberación de tripsinas desde segmentos pancreáticos perfundidos en respuesta a la presencia (+) en el medio de perfusión de diferentes secretagogos, solos o en combinación (\*  $p < 0.05$ ).



# *V–Discusión*



La necesidad del estudio de la funcionalidad del páncreas sin las influencias que otros órganos pudieran ejercer sobre él, condujo a la puesta a punto de técnicas en las que se aislaba el citado órgano manteniendo su estructura glandular y su irrigación, así como las terminaciones aferentes nerviosas al órgano. Sin embargo, debido a la complejidad metodológica de esta técnica, se desarrollaron abordajes experimentales más sencillos entre los que destacan la perfusión de segmentos o lóbulos pancreáticos.

Pese a que la obtención de lóbulos pancreáticos minimiza el daño en las células acinares, lo que prolonga su viabilidad y los hace adecuados para estudios de larga duración (Scheele y Palade, 1974), la utilización de segmentos pancreáticos permite, debido a su pequeño tamaño, una buena difusión del oxígeno y solutos desde el medio de perfusión, de tal modo que en estudios de corta duración no se han observado diferencias significativas entre los resultados obtenidos con ambos tipos de preparaciones (Scheele, 1983). Esto, junto con la sencillez de su obtención, nos condujo a la elección de la perfusión de segmentos pancreáticos como sustrato biológico para el estudio de la secreción pancreática exocrina.

Para la realización de esta Memoria de Licenciatura hemos elegido el cobaya como animal de experimentación. Esta elección encuentra su explicación en ser una de las especies más reiteradamente utilizada en los estudios de secreción pancreática exocrina, constituyendo uno de los modelos experimentales en que más se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos celulares del acoplamiento estímulo-secreción, hecho que da pie a que cualquier investigación en él desarrollada se continúe con el estudio de tales mecanismos.

Puesto que la secreción pancreática exocrina tiene diferentes componentes que es factible cuantificar, se han desarrollado distintas técnicas para caracterizar la función de este tipo celular con los cambios en la concentración del componente cuantificado (Folsch y Wormsley, 1973; Matthews y cols, 1974; Peterson, 1983; Camello y Salido, 1993). En nuestro estudio experimental se ha puesto a punto un método basado en la cuantificación en continuo del tripsinógeno pancreático producido por las células secretoras pancreáticas. En este método se determina espectrofotométricamente la cantidad de un cromóforo (paranitroanilina), liberado tras la acción de la tripsina sobre el sustrato específico BAPNA.

Dado que en la secreción pancreática exocrina se libera tripsinógeno, precursor inactivo de la tripsina, para que pueda ser cuantificado se precisa añadir al efluente pancreático la enzima convertidora enterocinasa. La utilización de BAPNA como sustrato para la determinación de la concentración de tripsina en diferentes sustratos biológicos está ampliamente documentada (Svendsen y cols,

1972; Wit, 1991; Claeson, 1994), habiéndose puesto también a punto para cuantificar su concentración en el jugo pancreático (Folsch y Wormsley, 1973; Manso y cols, 1992). Sin embargo, no existen trabajos que indiquen que ha sido utilizada en la determinación en continuo de la concentración de tripsina, ni en jugo pancreático, ni en otros medios biológicos.

En nuestras condiciones experimentales, el BAPNA puede ser utilizado como un sustrato adecuado en la determinación continua de la concentración de tripsinógeno ya que genera una cantidad de cromóforo, en estas condiciones, que puede ser determinado espectrofotométricamente.

El BAPNA, por si sólo, provoca un incremento en la absorbancia con un máximo en 300 nm, mientras que la molécula de paranitroanilina que se libera tras la hidrólisis presenta máxima absorbancia a 380 nm. Por este motivo la reacción se registra a 405 nm con el fin de evitar las interferencias con sustratos no hidrolizados. Sin embargo, aún a 405 nm existe una pequeña absorbancia residual dependiente del sustrato no hidrolizado, que no se debe a una liberación espontánea de paranitroanilina. Puesto que ésta absorbancia residual se mantenía estable (Resultados, Figura 6), no afectaba a la determinación posterior de la concentración de cromóforo.

Cuando determinamos la concentración de sustrato adecuada, pudimos comprobar que, debido a su escasa solubilidad en agua, era necesario realizar una disolución previa en DMSO. No se pudieron ensayar concentraciones de sustrato superiores a 1 mg/ml, como consecuencia de esa baja solubilidad, porque a mayores concentraciones el BAPNA precipita. Sin embargo, creemos que en nuestras condiciones experimentales, el sustrato se encuentra en suficiente concentración como para no ser limitante, como lo demuestra la linealidad existente en la relación entre la concentración del cromóforo, la concentración del tripsinógeno o la concentración de la tripsina (Resultados, Figuras 4 y 5).

Al igual que ocurría con la solución de BAPNA, la solución de EK necesaria para la cuantificación de tripsinógeno absorbe a 405 nm, pero por mantenerse esta absorción constante a lo largo del tiempo, y por la linealidad existente en las curvas tripsinógeno–concentración de cromóforo, no consideramos que esto interfiera en la cuantificación.

Pese a que cuando Geiger y Fritz (1984) optimizaron el método en el que el BAPNA era utilizado como sustrato para la cuantificación de tripsina, determinaron que la concentración de calcio final en la solución debería ser 20mM, en nuestras condiciones experimentales la suplementación de calcio al efluente pancreático provocaba una precipitación del mismo, que impedía el análisis espectrofotométrico, por lo que la concentración de calcio en nuestro sistema es la correspondiente al tampón fisiológico de *Krebs–Henseleit* (2.56

mM). Concentraciones similares no han mostrado retardar ni la activación del tripsinógeno, ni la estabilidad de la tripsina en jugo pancreático de avestruz (Bodley y cols, 1995).

La cuantificación de tripsina y tripsinógeno, siguiendo el método propuesto en esta Memoria de Licenciatura, ha demostrado la existencia de un alto grado de correlación lineal entre la concentración utilizada y el incremento en la absorbancia a 405 nm (Resultados, Figuras 4 y 5). En cuanto a la precisión del método, el coeficiente de variación calculado fue de 12% (n=10), que se encuadra dentro de los límites de variación propuestos para esta técnica (Geiger y Fritz, 1984). La curva de tripsinógeno muestra así mismo un coeficiente de variación similar, un 11% (n=10), pese a que incluye el paso de la activación del tripsinógeno por la enterocinasa. Los límites de detección para la tripsina y tripsinógeno, fueron de 1 UT/ml y 0.5 µg/ml respectivamente, que se encuentran así mismo dentro del intervalo descrito para la detección de estos compuestos (Geiger y Fritz, 1984).

Nuestro método se ha mostrado sensible para detectar los cambios en la producción de tripsina de segmentos pancreáticos, inducidos por agonistas que estimulan la secreción pancreática exocrina por diferentes vías de acoplamiento estímulo-secreción.

La ACh estimula la producción de tripsina, presentando un efecto máximo a la concentración de  $10^{-5}$  M y una  $EC_{50}$  de  $2.16 \times 10^{-6}$  M. Uno de los inconvenientes que pudiera conducir a la no utilización de una técnica para la cuantificación de un parámetro concreto en la secreción, es que la citada técnica se mostrara insensible para detectar las respuestas a dosis de un agonista determinado que fehacientemente provocan estimulación del tejido, cuantificables por otros métodos. Sin embargo, los resultados que hemos obtenido con la estimulación de los segmentos con ACh parecen mostrar una mayor sensibilidad de nuestro método, comparado con la detección de amilasas en continuo utilizada por Jennings y cols (1996), quien describe una curva dosis–respuesta en segmentos de cobaya para la ACh con un efecto máximo de  $10^{-3}$  M y una  $EC_{50}$   $2.3 \times 10^{-5}$  M. Sin embargo, puesto que el componente cuantificado no es el mismo, no podemos descartar que la estimulación de cada uno de estos componentes del jugo pancreático sufra un patrón de secreción diferente, si bien los estudios de Tartakoff y cols (1974a y 1974b) y Sceelee y Palade (1975), en la especie de nuestro estudio, indican que la descarga enzimática de amilasa y tripsinógeno se realiza sincrónicamente y con proporciones constantes, independientemente de las condiciones experimentales y de la naturaleza del secretagogo empleado.

La aplicación de CCK provocó, así mismo, una liberación dosis–dependiente de tripsina con un efecto máximo a la concentración  $3.16 \times 10^{-8}$  M y una  $EC_{50}$  de  $10^{-9}$  M. La producción de proteínas medida por Sceelee y Palade

(1975) en lóbulos pancreáticos de cobaya mostró un efecto máximo a  $10^{-9}$  M, lo que supondría una menor sensibilidad de nuestra técnica en la detección de la respuesta del tejido a la CCK. Camello y Salido (1993), en segmentos pancreáticos de rata, encontraron un efecto máximo de la CCK en la producción de proteínas de  $10^{-10}$  M y una  $EC_{50}$  de  $2 \times 10^{-11}$  M. La cuantificación de la producción de amilasas en acinos pancreáticos de cobaya ha mostrado que esa preparación es más sensible, ya que la dosis de  $10^{-12}$  M tiene efectos cuantificables, y el efecto máximo se alcanza a  $3.2 \times 10^{-10}$  M (Alcon y cols, 1996). Otra diferencia importante es que tanto la determinación de proteínas totales como la de amilasas, muestran un patrón secretor bifásico más acusado que el que se detecta con el empleo de la técnica aquí desarrollada, no existiendo en principio ninguna explicación para los resultados obtenidos, si bien ninguno de los estudios anteriormente comentados hacían determinación en continuo, lo que podría apuntar a que los métodos en continuo tienen una pérdida de selectividad con respecto a los de muestras discretas.

Nuestros resultados también demuestran que el éster de forbol TPA, conocido activador de la PKC (Kikkawa y cols, 1984; Nishizuka, 1988; Francis y Singh, 1990) puede también producir una liberación de tripsina en segmentos pancreáticos de cobaya. El efecto estimulador del TPA en la secreción de tripsina parece ser mayor que el obtenido cuantificando la secreción de amilasas en páncreas de rata. En este caso, el éster de forbol evoca un incremento relativamente lento de la producción de amilasas, alcanzando un máximo tras 25-30 minutos de exposición que no se mantiene a lo largo del tiempo (Singh, 1985a). Nuestros resultados, sin embargo, son bastante similares a los descritos por Camello y Salido (1993), utilizando un método en continuo de detección de proteínas totales en segmentos pancreáticos de rata.

En nuestro estudio, la producción de tripsina inducida por secretagogos que estimulan la vía del AMPc, como secretina y VIP, es claramente inferior a la que evocan los clásicos secretagogos que actúan a través de la vía del calcio (CCK, ACh), lo que está en absoluta concordancia con la mayor capacidad en la estimulación de la secreción proteica descrita para estos últimos en la literatura (Gardner y Jensen, 1981 y 1989). La magnitud de las respuestas secretoras para la tripsina es similar a las previamente descritas para la producción de amilasas (Gardner y Jackson, 1977; Burnham y cols, 1984; Sjödin y cols, 1990; Salido y cols, 1992).

Finalmente, los resultados de este estudio confirman que la histamina, cuyo mecanismo de acción en el páncreas está sujeto a controversias (Lajas y cols, 1995; Camello y cols, 1997), provoca un aumento dosis-dependiente en la producción de tripsina, si bien Jennigs y cols (1996) no detectaron incrementos en la liberación de amilasas por segmentos pancreáticos de cobaya, utilizando un método en continuo de detección, lo cual, junto con la mayor sensibilidad de

nuestro método en la respuesta a la ACh, nos indicaría que la técnica por nosotros descrita presenta la doble ventaja de mayor sencillez y mayor sensibilidad. Esto hace a nuestra técnica el método de elección para determinar la secreción en continuo, comparado con la técnica de amilasas.

Además de haberse mostrado útil para cuantificar globalmente la respuesta a los secretagogos pancreáticos, nuestra técnica, al tratarse de un método para la detección en continuo, presenta la ventaja sobre los métodos de incubación estática, de que sirve para caracterizar la cinética de las respuestas, lo que puede ser de gran utilidad para conocer las interacciones entre secretagogos, así como para la caracterización de los fenómenos de taquifilaxia, desensibilización e hipersensibilización que pudieran ocurrir.

Por último, al haberse implicado recientemente la activación intracelular de la tripsina como el factor desencadenante de la pancreatitis (Mithofer y cols, 1998), podemos considerar que este método, al fundamentarse precisamente en la activación y cuantificación de la tripsina, es la herramienta idónea para realizar estudios en la fisiopatología y patocronia de esta enfermedad, y solventa de este modo las restricciones de los otros métodos, que deben limitarse exclusivamente a estudios de funcionalidad sobre el órgano patológico.



## ***VI–Conclusión***



El método espectrofotométrico descrito para medir de forma continua la liberación de tripsinas desde segmentos pancreáticos de cobaya, es sencillo, y suficientemente sensible para cuantificar la liberación de tripsina en respuesta a varios secretagogos, que actúan a través de diferentes sistemas de acoplamiento estímulo–secreción, siendo el método en continuo de elección, comparado con los ya existentes basados en la detección de amilasas o proteínas totales.



## *VII–Bibliografía*



ADELSON JW y ROTHMAN SS (1974). Selective pancreatic enzyme secretion due to a new peptide called chymodenin. *Science*; 183(129):1087-1089.

AGNER E, CLAESON G, PALMQVIST A, ARWIN H y LUNDSTRÖM I (1983). The electrode adsorption method for determination of enzyme activity: a study of substrate requirements. *J Biochem Biophys Meth*; 8:69-83.

ALCON 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.

ALCON S, ROSADO JA, GARCIA 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(12):1342-1350.

ALI AE, RUITSHAUSER SCB y CASE RM (1990). Pancreatic and biliary secretion in the anesthetized Syrian Golden hamster in response to secretin, cholecystokinin-octapeptide, bombesin, and carbachol. *Pancreas*; 5:314-322.

AMSTERDAM A y JAMIESON JD (1974). Studies on dispersed pancreatic exocrine cells. I. Dissociation technique and morphologic characteristics of separated cells. *J Cell Biol*; 63(3):1037-1056.

ANSAH TA, CASE RM y DHO S (1986). The effects of phorbol ester, TPA, on amylase secretion and cytoplasmic free calcium concentration in guinea pig pancreatic acini. *J Physiol*; 378:110P.

ARITA Y, KIMURA T, OGAMI Y y NAWATA H (1991a). Effects of H7 and staurosporine on cytosolic free calcium and amylase secretion in rat pancreatic acini. *Pancreas*; 6:112-119.

ARITA Y, KIMURA T, YAZU T, OGAMI YY y NAWATA H (1991b). Effects of calcium-channel blockers on cytosolic free calcium and amylase secretion in rat pancreatic acini. *Pharmacology & Toxicology*; 68:83-87.

ARRANG JM, GARBARG M y SCHWARTZ JC (1983). Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptors. *Nature*; 302:832-837.

ASH ASF y SCHILD HO (1966). Receptors mediating some actions of histamine. *Pharmac Chemother*; 27: 427-439.

ASHTON N, EVANS RL y ARGENT BE (1992). Protein kinase C has an inhibitory role in the control of fluid secretion in isolated pancreatic ducts. *J Physiol*; 51P.

BABKIN BP y STARLING EH (1926). A method for the study of the perfused pancreas. *J Physiol*; 61:245-247.

BANNER D, ACKERMANN J, GAST A, GUBERNATOR K, HADVARY P, HILPERT K, LABLER L, VAN DE WATERBEEMD H y WIRZ B (1993). Serine proteases: 3D structures, mechanisms of action and inhibitors. En: "Perspectives in medicinal chemistry". Eds. Testa B, Kyburz E, Fuhrer W, Giger R. pp. 27-42. Raven press, New York.

BAZZI MD y NELSESTUEN GL (1989). Properties of the PK-C phorbol ester interaction. *Biochemistry*; 29:3577-3585.

BERRIDGE MJ y IRVINE RF (1984). Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*; 312:315-321.

BERRIDGE MJ y IRVINE RF (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*; 341:197-205.

- BIRNBAUMER L, CODINA J, MATTERA R, YATANI A, SCHERER N, TORO MJ y BROW AM (1987). Signal transduction by G proteins. *Kidney International*; 32:S14-S37.
- BLACK JW, DUNCAN WAM, DURANT CJ, GANELLIN CR y PARSON ME (1972). Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub>-receptors. *Nature*; 236:385-390.
- BLOMBÄCK B (1967). Fibrinogen to fibrin transformation. En: "Blood clotting enzymology". Ed. Seegers WH. pp 143-215. Academic Press, New York.
- BODLEY MD, NAUDE RJ, OELOFSEN W y PATTHY A (1995). Ostrich trypsinogen: purification, kinetic properties and characterization of the pancreatic enzyme. *Int J Biochem Cell Biol*; 27(7):719-728.
- BOLANDER FF (1989). Calcium, calmodulin, and phospholipids. En: "Molecular endocrinology". pp: 146-172. Academic Press, San Diego.
- BONTING SL, DE PONT J y JANSEN J (1980). The role of sodium ions in pancreatic fluid secretion in the rabbit. *J Physiol*; 309:533-546.
- BOYNTON AL, DEAN NM y HILL TD (1990). Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and regulation of intracellular calcium. *Biochem Pharmacol*; 40:1933-1939.
- BRADFORD MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72:248-254.
- BRAGADO MJ, DABROWSKI A, GROBLEWSKI GE y WILLIAMS JA (1997a). CCK activates p90<sup>rsk</sup> in rat pancreatic acini through protein kinase C. *Am J Physiol*; 272:G401-407.
- BRAGADO MJ, GROBLEWSKI GE y WILLIAMS JA (1997b). p70<sup>s6k</sup> is activated by CCK in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*; 273:C101-109.
- BRANCHINI BR, HERMES JD, SALITURO FG, POST NP y CLAESON G (1981). Sensitive enzyme assays based on the production of chemiluminescent leaving groups. *Anal Biochem*; 111:87-96.
- BROWN JC, HARPER AA y SCRATCHARD T (1967). Potentiation of secretin stimulation of the pancreas. *J Physiol*; 190:519-530.
- BURNHAM DB y WILLIAMS JA (1982). Effects of carbachol, cholecystokinin and insulin on protein phosphorylation in isolated pancreatic acini. *J Biol Chem*; 257:10523-10528.
- BURNHAM DB, MCCHESENEY DJ, THURSTON KC y WILLIAMS JA (1984). Interaction of cholecystokinin and vasoactive intestinal polypeptide on function of mouse pancreatic acini in vitro. *J Physiol*; 349:475-782.
- BURNHAM DB, MUNOWITZ P, THORN N y WILLIAMS JA (1985). Protein kinase activity associated with pancreatic zymogen granules. *Biochem J*; 227:743-751.
- BUTENAS S, ORFEO T, LAWSON JH y MANN KG (1992). Aminonaphthalenesulfonamides, a new class of modifiable fluorescent detecting groups and their use in substrates for serine protease enzymes. *Biochemistry*; 31:5399-5411.
- CALDWELL JB y SPARROW LG (1976). Partial purification of two peptide hydrolases from pea seeds. *Plant Physiol*; 57:795-798.
- CAMELLO C, LAJAS AI, GONZALEZ A, CAMELLO PJ y PARIENTE JA (1997). Histamine does not potentiate cyclic AMP-mediated amylase secretion in the guinea-pig pancreatic acinar cells. *Gen Pharmacol*; 29(2):211-215.

CAMELLO PJ (1994). El páncreas perfundido y aislado como modelo de estudio de la secreción. *Acta Veterinaria*; 7:71-79.

CAMELLO PJ y SALIDO GM (1993). Inhibitory interactions between different stimulus-secretion pathways in the exocrine pancreas. *Biochemical Pharmacology*; 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.

CANO E y MAHADEVAN LC (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci*; 20(3):117-122.

CARTER P y WELLS JA (1988). Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature*; 332:564-568.

CASE RM (1988). Physiology and biochemistry of pancreatic exocrine secretion. *Current Opinion in Gastroenterology*; 4:772-789.

CASE RM y ARGENT BE (1989). Pancreatic secretion of electrolytes and water. En: "The gastrointestinal system. Vol III". Eds. Schulz SG, Forte JG, Rauner BB. pp: 383-417. American Physiological Society. Bethesda, Maryland.

CASE RM y SCRATCHERD T (1972). Prostaglandin action on pancreatic blood flow and on electrolyte and enzyme secretion by exocrine pancreas in vivo and in vitro. *J Physiol*; 226(2):393-405.

CASE RM, GARNER A y PADFIELD PJ (1987). Pancreatic electrolyte and amylase secretion in the anaesthetized guinea-pig stimulated with either secretin, cholecystokinin octapeptide (CCK-8) or bombesin. *J Physiol*; 391:104P.

CASE RM, HARPER AA y SCRATCHERD T (1968). Water and electrolyte secretion by the perfused pancreas of the cat. *J Physiol*; 196:133-149.

CATT KJ y BALLA T (1989). Phosphoinositide metabolism and hormone action. *Ann Rev Med*; 40:487-509.

CLAESON G (1994). Synthetic peptides and peptidomimetics as substrates and inhibitors of thrombin and other proteases in the blood coagulation system. *Blood Coag Fibrinol*; 5:411-436.

COLLEN MJ, SUTLIFF VE, PAN GZ y GARDNER JD (1982). Postreceptor modulation of the action of VIP and secretin on pancreatic enzyme secretion by secretagogues that mobilize cellular calcium. *Am J Physiol*; 242:G423-G428.

COMPTON SJ y JONES CG (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem*; 151(2):369-374.

CONGDON RW, MUTH GW y SPLITTGERBER AG (1993). The binding interaction of Coomassie blue with proteins. *Anal Biochem*; 213(2):407-413.

COOL DE, EDGELL C-JS, LOUIE GV, ZOLLER MJ, BRAYER GD y MACGILLIVRAY RTA (1985). Characterization of human blood coagulation factor XII cDNA. *J Biol Chem*; 260:13666-13676.

COZZONE P, PASERO L, BEAPOIL B y MARCHIS-MOUREN G (1970). Characterization of porcine pancreatic isoamylases. Chemical and physical studies. *Biochim Biophys Acta*; 207:409-504.

- CRAIK CS, ROCZNAK S, LARGMAN C y RUTTER WJ (1987). The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases. *Science*; 237:909-913.
- CSENDES A, ISENBERG J y GROSSMAN MI (1971). Pancreatic protein secretion in response to secretin plus C-terminal octapeptide of cholecystokinin. *Gastroenterology*; 60:770 (A).
- CUTHBERTSON KSR, WHITTINGHAM DG y COBBOLD PH (1981).  $Ca^{2+}$  increases in exponential phases during mouse oocyte activation. *Nature*; 294:754-757.
- CHARLES M, GRATECOS D, ROVERY M y DESNUELLE P (1967). Porcine chymotrypsinogen A. Purification and studies of some properties. *Biochim Biophys Acta*; 140(3):395-409
- CHERET AM, SCARPIGNATO C, LEWIN MJM y BERTACCINI G (1984). Inhibition of the histamine-stimulated adenylate cyclase activity of guinea pig gastric cells by the H<sub>2</sub>-receptors antagonists cimetidine, ometidine and SKF93479. *Pharmacology*; 28:268-274.
- CHIAL HJ, THOMPSON HB y SPLITTGERBER AG (1993). A spectral study of the charge forms of Coomassie blue G. *Anal Biochem*; 209(2):258-266.
- CHRISTOPHE J, CAMUS J, DESCHODT-LANCKMAN M, RATHE J, ROBBERECHT P, VANDERMEERS-PIRET MC y VANDERMEERS A (1971). Factors regulating biosynthesis, intracellular transport and secretion of amylase and lipase in the rat exocrine pancreas. *Horm Metab Res*; 3(6):393-403.
- CHRISTOPHE J, VANDERMEERS A, VANDERMEERS-PIRET MC, RATHE J y CAMUS J (1973). The relative turnover time in vivo of the intracellular transport of five hydrolases in the pancreas of the rat. *Biochim Biophys Acta*; 308(2):285-295.
- CHRISTOPHE JP, FRANSDEN EK, CONLON TP, KRISHNA G y GARDNER JD (1976). Action of cholecystokinin, cholinergic agents, and A-23187 on accumulation of guanosine 3':5'-monophosphate in dispersed guinea pig pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*; 251:4640-4645.
- DABROWSKI A, GRADY T, LOGSDON CD y WILLIAMS JA (1996). Jun kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and in vivo. *J Biol Chem*; 271(10):5686-5690.
- DANOFF SK, SUPATTAPONE S y SNYDER SH (1988). Characterization of a membrane protein from brain mediating the inhibition of inositol 1,4,5-triphosphate receptor binding by calcium. *Biochem J*; 254:701-705.
- DE PONT JJHMM y FLEUREN-JACOBS AMM (1984). Synergistic effect of A23187 and phorbol ester on amylase secretion from rabbit pancreatic acini. *FEBS Lett*; 170:64-68.
- DE PONT JJHMM, JANSEN JWCM, KUIJPERS GAT y BONTING SL (1982). A model for pancreatic fluid secretion. En: "Electrolyte and Water Transport Across Gastrointestinal Epithelia". Eds. Case RM, Garner A, Turnberg LA, Young JA. pp: 11-20. Raven Press, New York.
- DESCHODT-LANCKMAN M, ROBBERECHT P, DE NEEF P, LABRIE F y CHRISTOPHE J (1975). In vitro interactions of gastrointestinal hormones on cyclic adenosine 3':5'-monophosphate levels and amylase output in the rat pancreas. *Gastroenterol*; 68(2):318-325.
- DESNUELLE P y FIGARELLA C (1979). Biochemistry. En: "The Exocrine Pancreas". Eds. Howat HT, Sarles H. pp: 86-125. WB Saunders Company Ltd., London.

DIXON JF y HOKIN LE (1984). Secretagogue-stimulated phosphatidylinositol breakdown in the exocrine pancreas liberates arachidonic acid, stearic acid, and glycerol by sequential actions of phospholipase C and diglyceride lipase. *J Biol Chem*; 259:14418-14425.

DOOLITTLE RF (1979). Protein evolution. En: "The Proteins, Vol IV". Eds. Neurath H, Hill RL. pp 1-118. Academic Press, New York.

DORMER RL y WILLIAMS JA (1981). Secretagogue-induced changes in subcellular  $Ca^{2+}$  distribution in isolated pancreatic acini. *Am J Physiol*; 240:G130-G140.

DOUGHNEY C, BROWN GR, MCPHERSON MA y DORMER RL (1987). Rapid hydrolysis of inositol 1,4,5-triphosphate in rat pancreatic acini stimulated by carbamylcholine. *Biochim Biophys Acta*; 928:341-348.

DOUGLAS WW y RUBIN RP (1961). The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcolina. *J Physiol*; 159:40.

DUAN RD, ZHENG CF, GUAN KL y WILLIAMS JA (1995). Activation of MAP kinase kinase (MEK) and Ras by cholecystokinin in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*; 268:1060-1065.

DUFRESNE M, BASTIE MJ, VAYSSE N, CREACH Y, HOLLANDE E y RIBET A (1985). The amiloride sensitive  $Na^+/H^+$  antiport in guinea pig pancreatic acini. Characterization and stimulation by caerulein. *FEBS Lett*; 187(1):126-130.

ERLANGER BF, KOKOWSKI N y COHEN W (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*; 95:271-278.

EVANS LAR, PIRANI D, COOK DI y YOUNG JA (1986). Intraepithelial current flow in rat pancreatic secretory epithelia. *Pflügers Arch*; 407:S107-S111.

EVANS RL, ASHTON N y ELLIOTT AC (1990). Intracellular free  $[Ca^{2+}]$  in rat pancreatic ducts is increased by acetylcholine but not by bombesin or substance P. *J Physiol*; 90P.

FOLSCH UR y CREUTZFELDT W (1976). Electrolyte secretion by pancreatic duct model in the rat in vivo and accumulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in vitro in response to gastrointestinal hormones. En: "Stimulus-secretion coupling in the gastrointestinal tract". pp: 381-384. Eds. Case RM, Goebell A. MTP Press, Lancaster.

FOLSCH UR y WORMSLEY KG (1973). Pancreatic enzyme response to secretin and cholecystokinin pancreozymin in the rat. *J Physiol*; 324:79-94.

FRANCIS LP y SINGH J (1990). Effects of phorbol ester and related compounds on acetylcholine-evoked  $[^3H]$ Leucine-labelled protein secretion in permeabilized rat pancreatic acini. *Exp Physiol*; 75:537-546.

FRANCIS LP, CAMELLO PJ, SINGH J, SALIDO GM y MADRID JA (1990). Effects of phorbol ester and polymixin B on cholecystokinin-octapeptide evoked secretory responses in the pancreas in vivo and in vitro. *J Physiol*; 431:27-37.

FREY PA, WHITT SA y TOBIN JB (1994). A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases. *Science*; 264:1927-1930.

FRIEDENAUER S y BERLET HH (1989). Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. *Anal Biochem*; 178(2):263-268.

GARCIA LJ, ROSADO JA, TSUDA T y JENSEN RT (1997). CCK causes rapid tyrosine phosphorylation of p125<sup>FAK</sup> focal adhesion kinase and paxillin in rat pancreatic acini. *Biochim Biophys Acta*; 1358:189-199.

GARDNER JD y HAHNE WF (1977). Calcium transport in dispersed acinar cells from rat pancreas. *Biochim Biophys Acta*; 71(3):466-476.

GARDNER JD y JACKSON MJ (1977). Regulation of amylase release from dispersed pancreatic acinar cells. *J Physiol*; 270(2):439-454.

GARDNER JD y JENSEN RT (1981). Regulation of pancreatic enzyme secretion in vitro. En: "Physiology of the gastrointestinal tract". Ed. Johnson LR. pp:831-871. Raven Press, New York.

GARDNER JD y JENSEN RT (1989). Receptor for gut peptides and other secretagogues on pancreatic acinar cells. En: "Handbook of Physiologic. The gastrointestinal system. Vol II". Ed. Schultz SG, Makhlouf GM, Rauner BB. pp: 171-192. Am. Physiol. Society, Oxford University Press.

GARDNER JD, CONLON TP, FINK ML y BODANSZKY M (1976). Interaction of peptides related to secretin with hormone receptors on pancreatic acinar cells. *Gastroenterol*; 71(6):965-970.

GARDNER JD, KORMAN LY, WALKER MD y SUTLIFF VE (1982). Effects of inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase on the action of vasoactive intestinal peptide and secretin on pancreatic acini. *Am J Physiol*; 242:G547-G551.

GEIGER R y FRITZ H (1984). Proteinases and their inhibitors: Trypsin. En: "Methods of enzymatic analysis. Vol II". Third Edition. Eds. Jürgen HU, Jürgen B, Grabl M. pp: 119-129. Verlag Chemie, Basel.

GONZALEZ A, POZO MJ, CAMELLO PJ, SALIDO GM y PARIENTE JA (1993). Effect of phorbol esters and secretin on acetylcholine-evoked exocrine pancreatic secretion in the anaesthetized rat. *Pharmacology Communications*; 3:263-273.

GRATECOS D, GUY O, ROVERY M y DESNUELLE P (1969). On the two anionic chymotrypsinogens of porcine pancreas. *Biochim Biophys Acta*; 175(1):82-96

GROBLEWSKI GE, GRADY T, MEHTA N, LAMBERT H, LOGSDON CD, LANDRY J y WILLIAMS JA (1997). Cholecystokinin stimulates heat shock protein 27 phosphorylation in rat pancreas both in vivo and in vitro. *Gastroenterology*; 112(4):1354-1361.

GUNTHER GR y JAMIESON JD (1979). Increased intracellular cyclic GMP does not correlate with protein discharge from pancreatic acinar cells. *Nature*; 280:318-320.

HARDIE DG (1991). Signal transduction. En: "Biochemical messengers: Hormones, neurotransmitters and growth factors". pp: 147-189. Chapman Hall, London.

HART WM y THOMAS JE (1945). Bicarbonate and chloride of pancreatic juice secreted in response to various stimuli. *Gastroenterology*; 4:409-420.

HARTLEY BS (1964). Amino-acid sequence of bovine chymotrypsinogen-A. *Nature*; 201:1284-1287.

HASE W, FRIESE W y HEITMAN R (1984). Electron-microscopic demonstration of the distribution of calcium deposits in the exocrine pancreas of the rat after application of carbachol, atropine, cholecystokinin, and procaine. *Cells Tissue Res*; 235:683-690.

HEISLER S (1983). Forskolin potentiates calcium-dependent amylase secretion from rat pancreatic acinar cells. *Can J Physiol Pharmacol*; 61:1168-1176.

HEISLER S, FAST D y TENENHOUSE A (1972). Role of  $Ca^{2+}$  and cyclic 3'5'-AMP in protein secretion from rat exocrine pancreas. *Biochem Biophys Acta*; 279:561-572.

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, CAMPOS-GONZÁLEZ R y BOYNTON AL (1988). Inhibition of inositol triphosphate-stimulated calcium mobilization by calmodulin antagonist in rat liver epithelial cells. *J Biol Chem*; 263:16479-16484.

HIRST BH, ELLIOTT KJ, RYDER H y SZELKE M (1991). Inhibition of gastrin- and histamine-stimulated gastric acid secretion by gastrin and cholecystokinin antagonists in the rat. *Aliment Pharmacol Therap*; 5:31-39.

HONDA T, ADACHI H, NOGUCHI M, SATO S, ONISHI S, AOKI E y TORUZUKA KK (1987). Carbacol regulates cholecystokinin receptor on pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*; 252:G77-G83.

HOOTMAN SR y WILLIAMS JA (1987). Stimulus-secretion coupling in the pancreatic acinus. En: "Physiology of the gastrointestinal tract". Ed. Johnson LR. pp: 1109-1128. Raven Press, New York.

HOOTMAN SR, ERNST SA y WILLIAMS JA (1983). Secretagogue regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump activity in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*; 245:G339-G346.

IWATSUKI K, IJIMA R, YAMAGISHI F y CHIBA S (1985). Effects of secretagogues on pancreatic exocrine secretion in the monkey and the dog. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 12:67-72.

IWATSUKI K, IKEDA K y CHIBA S (1981). Effect of histamine on pancreatic exocrine secretion in the dog. *Arch Int Pharmacodyn Ther*; 251:166-176.

JAKEN S (1989). Diacylglycerol: the role of stimulated production in activation of PK-C. En: "Inositol lipids in cells signalling". pp: 163-178. Academic Press.

JAMIESON JD y PALADE GE (1971). Synthesis, intracellular transport, and discharge of secretory proteins in stimulated pancreatic exocrine cells. *J Cell Biol*; 50(1):135-158.

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 H3 receptors. *Can J Physiol Pharmacol*; 74(6):744-752.

JENSEN RT (1994). Receptors on Pancreatic Acinar cells. En: "Physiology of the Gastrointestinal Tract. Vol. II". Third Edition. Ed. Johnson LR. pp: 1377-1446. Raven Press, New York.

JENSEN RT, CHARLTON CG, ADACHI H, JONES SW, O'DONOHUE TL y GARDNER JD (1983). Use of 125I-secretin to identify and characterize high-affinity secretin receptors on pancreatic acini. *Am J Physiol*; 245:G186-G195.

JENSEN SL, KUHL C, NIELSEN OV y HOLST JJ (1976). Isolation and perfusion of the porcine pancreas. *Scand J Gastroenterol Suppl*; 37:57-61.

KANNO T, SHIBUYA I y ASADA N (1983). The role of extracellular calcium and other ions in the secretory responses of the exocrine pancreas to cholecystokinin. *Biomed Res*; 4:295-302.

KANNO T y SAITO A (1978). Influence of external potassium concentration on secretory responses to cholecystokinin-pancreozimin and ionophore A23187 in the pancreatic acinar cell. *J Physiol*; 278:251-263.

- KAPOOR CL y KRISHMA GA (1978). A possible role for guanosine 3'-5'-monophosphate in the stimulus-secretion coupling in exocrine pancreas. *Biochim Biophys Acta*; 544:102-112.
- KASAI H y AUGUSTINE GJ (1990). Cytosolic Ca<sup>2+</sup> gradients triggering unidirectional fluid secretion from exocrine pancreas. *Nature*; 348:735-738.
- KATSUSHIMA S, ADACHI H, HONDA T, SATO S, KUSUI T, AOKI E, NOGUCHI M y KONISHI J (1990). Cholecystokinin downregulates receptors for vasoactive intestinal peptide and secretin in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*; 258:G395-G403.
- KAYSER C (1970). La sécrétion pancréatique. En: "Physiologie". Ed. Kayser C. pp: 550-595. Editions Médicales Flammarion, Paris.
- KEMPEN HJ, DE PONT J y BONTING SL (1975). Rat pancreas adenylate cyclase. III. Its role in pancreatic secretion assessed by means of cholera toxin. *Biochim Biophys Acta*; 392:276-287.
- KIKKAWA U, KAIBUCHI K, CASTAGNA M, YAMANISHI J, SANO K, TANAKA Y, MIYAKE R, TAKAI Y y NISHIZUKA Y (1984). Protein phosphorylation and mechanism of action of tumor-promoting phorbol esters. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res*; 17:437-442.
- KLEIN B, FOREMAN JA y SEARCY RL (1970). New chromogenic substrate for determination of serum amylase activity. *Clin Chem*; 16(1):32-38.
- KOLDE HJ, EBERLE R, HEBER H y HEIMBURGER N (1986). New chromogenic substrates for thrombin with increased specificity. *Thromb Haemostas*; 56:155-159.
- KONDO S y SCHULZ I (1976). Calcium ion uptake in isolated pancreas cells induced by secretagogues. *Biochim Biophys Acta*; 419(1):76-92.
- KORC M, MATRISIAN LM, PLANCK SR y MAGUN BE (1983). Binding of epidermal growth factor in rat pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Commun*; 111:1065-1073.
- KOWABAYASHI T, MCKINNEY JS y RUBIN RP (1990). Regulation by diacylglycerol of calcium-evoked amylase secretion from intact and permeabilized pancreatic acinar cells. *Cell Calcium*; 11:851-855.
- KRAEHENBUHL JP y JAMIESON JD (1972). Solid-phase conjugation of ferritin to Fab-fragments of immunoglobulin G for use in antigen localization on thin sections. *Proc Natl Acad Sci USA*; 69(7):1771-1775.
- KRAUT J (1977). Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Ann Rev Biochem*; 46:331-358.
- KUIJPERS GAJ, VAN NOOY IGP, DE PONT J y BONTING SL (1984). The mechanism of fluid secretion in the rabbit pancreas studied by means of various inhibitors. *Biochim Biophys Acta*; 778:324-331.
- KYRIAKIS JM, BANERJEE P, NIKOLAKAKI E, DAI T, RUBIE EA, AHMAD MF, AVRUCH J y WOODGETT JR (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*; 369(6476):156-160.
- LAJAS AI, PARIENTE JA y SALIDO GM (1995). Histamine and the cAMP pathway in the guinea-pig pancreas. *Cellular Signalling*; 7:57-60.
- LAMY F, GIBSON D, LEDOUX M y MOREUX JC (1977). Chymotrypsinogen D, a new zymogen from porcine pancreas with proelastolytic activity. *Adv Exp Med Biol*; 79:165-175.

LEE PC, LEUNG YK, SRIMARUTA N, CUMELLA J y ROSSI T (1987). Phorbol ester attenuates cholecystokinin-stimulated amylase release in pancreatic acini of rats. *Biochim Biophys Acta*; 931:101-109.

LENGA RE (ed.) (1988). Safety. The Sigma-Aldrich library of chemical safety data. Edition II.

LIEBOW C y FRANKLIN JE (1982). Histamine stimulation of digestive enzyme secretion by in vitro rabbit pancreas. *Dig Dis Sci*; 27:234-241.

LIPFERT L, HAIMOVICH B, SCHALLER MD, COBB BS, PARSONS JT y BRUGGE JS (1992). Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase p125FAK in platelets. *J Cell Biol*; 119(4):905-912.

LORENZ W, HAUBENSAK G, HUTZEL M y WERLE E (1968). Histamine release in submaxillary gland and pancreas by parasympathomimetic drugs, peptide hormones, histamine and mepyramine. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmac Exp Path*; 260:416-437.

LOUIE DS y OWYANG C (1991). Carbacol acts through protein kinase C to modulate cholecystokinin receptors on pancreatic acini. *Am J Physiol*; 261:G981-G986.

LOWRY OH, ROSEBROUGHT NJ, FARR AL y RANDALL RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*; 193:265-275.

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(15):11119-11124.

MANSO MA, SAN ROMAN JI, DE DIOS I, GARCIA LJ, LOPEZ MA (1992). Cerulein-induced acute pancreatitis in the rat. Study of pancreatic secretion and plasma VIP and secretin levels. *Dig Dis Sci*; 37(3):364-368.

MARUYAMA Y (1990). Inhibitory effects of arachidonic acid on muscarinic current response in single pancreatic acinar cells of rat. *J Physiol*; 430:471-482.

MARUYAMA Y y PETERSEN OH (1982). Single-channel current in isolated patches of plasma membrane from basal surface of pancreatic acini. *Nature*; 299:159-161.

MATOZAKI T y WILLIAMS JA (1989). Multiple source of 1,2-diacylglycerol in rat pancreatic acini stimulated by cholecystokinin. *J Biol Chem*; 264:14729-14734.

MATTHEWS EK, PETERSEN OH y WILLIAMS JA (1973). Pancreatic acinar cells: acetylcholine-induced membrane depolarization, calcium efflux and amylase release. *J Physiol*; 234:689-701.

MATTHEWS EK, PETERSEN OH y WILLIAMS JA (1974). Analysis of tissue amylase output by an automated method. *Anal Biochem*; 58:155-160.

MCRAE BJ, KURACHI K, HEIMARK RL, FUJIKAWA K, DAVIE EW y POWERS JC (1981). Mapping of the active sites of bovine thrombin, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa, plasma kallikrein, and trypsin with amino acid and peptide thioesters: development of new sensitive substrates. *Biochemistry*; 20:7196-7206.

MENOZZI 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.

- MENOZZI D, VINAYEK R, JENSEN RT y GARDNER JD (1991). Down-regulation and recycling of high affinity cholecystokinin receptors on pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*; 266:10385-10391.
- MILUTINOVIC S, SCHULZ I, ROSELIN G y FAGOLD H (1977). The interaction of pancreatic secretagogues with pancreatic plasma membranes. En: "Hormonal receptors in digestive tract physiology". Eds. Bonfils S, Fromageot P, Roselin G. pp. 213-216. North Holland, Amsterdam.
- MITHOFER K, FERNANDEZ-DEL CASTILLO C, RATTNER D y WARSHAW AL (1998). Subcellular kinetics of early trypsinogen activation in acute rodent pancreatitis. *Am J Physiol*; 274(1):G71-79.
- MORISSET J, PAQUETTE B y BENREZZAK O (1991). The ability of saturosporine to modulate pancreatic acinar cell desensitization by TPA, carbamylcholine and cerulein. *Cellular Signalling*; 3:119-126.
- MORITA T, KATO H, IWANAGA S, TAKADA K, KIMURA T y SAKAKIBARA S (1977). New fluorogenic substrates for  $\alpha$ -thrombin, factor Xa, kallikreins, and urokinase. *J Biochem*; 82:1495-1498.
- 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 pancreatic acini. *J Biol Chem*; 265:2011-2016.
- MUALLEM S, PANDOL SJ y BEEKER TG (1988b). Calcium mobilizing hormones activate the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump of pancreatic acinar cells. *J Membrane Biol*; 106:57-69.
- MUALLEM S, PANDOL SJ y BEEKER TG (1989). Hormone-evoked calcium release from intracellular stores in a quantal process. *J Biol Chem*; 264:205-212.
- MULLERTZ S (1987). Fibrinolysis, general aspects, characteristic features and perspectives. *Fibrinolysis*; 1:3-12.
- NAHORSKI SR y POTTER BVL (1989). Molecular recognition of inositol polyphosphate by intracellular receptors and metabolic enzymes. *TIPS*; 10:139-144.
- NICOTERA P, ORRENIUS S, NILSSON T y BERGGREN PO (1990). An inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  pool in liver nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87:6858-6862.
- NISHIZUKA Y (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulations. *Nature*; 334:661-665.
- NOELTING G y BERNFELD P (1948). Sur les enzymes amylolytiques III. La bête-amylase: Dosage d'activité contrôle de l'absence d' $\alpha$ -amylase. *Helv Chim Acta*; 31: 286-290.
- NY T, ELGH F y LUND B (1984). The structure of the human tissue-type plasminogen activator gene: correlation of intron and exon structures to functional and structural domains. *Proc Natl Acad Sci USA*; 81:5355-5359.
- PADFIELD PJ, GARDNER A y CASE RM (1988). Patterns of pancreatic secretion in the anaesthetized guinea pig following stimulation with secretin, cholecystokinin octapeptide, or bombesin. *Pancreas*; 4:204-209.
- PAINTER RG, TOKUYASU KT y SINGER SJ (1973). Immunoferritin localization of intracellular antigens: the use of ultracyotomy to obtain ultrathin sections suitable for direct immunoferritin staining. *Proc Natl Acad Sci USA*; 70(6):1649-1653.

PANDOL SJ y MENDIUS KE (1988). Calcium metabolism and bombesin-stimulated pancreatic enzyme secretion. En: "Bombesin-like peptides in health and disease". Vol 547 de Annals of the New York Academy of Sciences. pp: 268-276. New York.

PANDOL SJ, HSU Y, KONDRATENKO NF, SCOEFFIELD-PAYNE MS y STEINBACH JH (1991). Dual pathways for agonist-stimulated arachidonic acid release in pancreatic acini: roles in secretion. *Am J Physiol*; 260:G423-G433.

PANDOL SJ, SCOEFFIELD MS, FIMMEL CJ y MUALLEM S (1987). The agonist-sensitive calcium pool in the pancreatic acinar cell. *J Biol Chem*; 35:16963-16968.

PANDOL SJ, SUTLIFF VE, JONES SW, CHARTLON CG, O'DONOHUE TL, GARDNER JD y JENSEN RT (1983). Action of natural glucagon on pancreatic acini: Due to contamination by previously undescribed secretagogues. *Am J Physiol*; 245:G703-G710.

PANDOL SL, RODRIGUEZ G, MUALLEM S y MENDIUS KE (1989). Characteristics of intracellular calcium changes required for augmentation of phorbol ester-stimulated pancreatic enzyme secretion. *Cell Calcium*; 10:256-262.

PANDOL ST, GUKOVSKAYA A, TRISTAM DB y VINCENT ED (1994). Cellular mechanisms mediating agonist-stimulated calcium influx in the pancreatic acinar cell. *Ann NY Acad Sci*; 713:41-48.

PARIENTE JA, FRANCIS LP, SALIDO GM y MADRID JA (1990a). Cimetidine increases the pancreatic response to histamine. *Agents and Actions*; 30:307-312.

PARIENTE JA, MADRID JA y SALIDO GM (1989). Histamine receptors in unstimulated pancreatic exocrine secretion of the rabbit. *Agents and Actions*; 28:1-2.

PARIENTE JA, MADRID JA y SALIDO GM (1990b). Role of histamine receptor in rabbit pancreatic exocrine secretion stimulated by cholecystokinin and secretin. *Exp Physiol*; 1990:657-667.

PARIENTE JA, SINGH J, SALIDO GM, JENNINGS LJ y DAVISON JS (1991). Activation of histamine receptors is associated with amylase secretion and calcium mobilisation in guinea pig acinar cells. *J Cell Physiol Biochem*; 1:11-120.

PATTHY L (1985). Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell*; 41:657-663.

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(6):E743-749.

PENNER R, FASOLATO C y HOTH M (1993). Calcium influx and its control by calcium release. *Current Opinion in Neurobiology*; 3:368-374.

PETERSEN CCH, TOESCU EC y PETERSEN OH (1991). Different patterns of receptor-activated cytoplasmic  $Ca^{2+}$  oscillations in single pancreatic acinar cells: dependence on receptor type, agonist concentration and intracellular  $Ca^{2+}$  buffering. *EMBO Journal*; 10:527-533.

PETERSEN OH (1992). Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. *J Physiol*; 448:1-51.

PETERSEN OH y UEDA N (1977). Secretion of fluid and amylase in the perfused rat pancreas. *J Physiol*; 264:819-835.

PETERSON GL (1983). Determination of total protein. *Methods Enzymol*; 91:95-119.

- PLANT S, GRAY MA y ARGENT BE (1992). K<sup>+</sup> channels on rat pancreatic duct cells in vitro. *J Physiol*; 128P.
- PUTNEY J (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*; 7:1-12.
- RANKIN S y ROZENGURT E (1994). Platelet-derived growth factor modulation of focal adhesion kinase (p125FAK) and paxillin tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. Bell-shaped dose response and cross-talk with bombesin. *J Biol Chem*; 269(1):704-710.
- READ SM y NORTHCOTE DH (1981). Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem*; 116(1):53-64.
- REGGIO H (1973). Influence of different in vivo treatments on the rate of secretion of amylase, lipase and chymotrypsin by slices of pigeon pancreas. *Biochim Biophys Acta*; 297(1):81-92.
- RICHARDS FM y WYCKOFF HW (1971). Bovine pancreatic ribonuclease. En: "The Enzymes. Vol III". Ed. Boyer P. pp: 647-806 Academic Press, New York.
- RINDERKNECHT H (1986). Pancreatic secretory enzymes. En: "The exocrine Pancreas. Biology, Pathobiology and Diseases". Eds. Go VLW, Gardner JD, Brooks FP, Lebenthal E, Di Magno EP, Scheele GA. pp: 163-183. Raven Press, New York.
- RINDERKNECHT H y MARBACH EP (1970). A new automated method for the determination of serum alpha-amylase. *Clin Chim Acta*; 29(1):107-110.
- RINDERKNECHT H, WILDING P y HAVERBACK BJ (1967). A new method for the determination of alpha-amylase. *Experientia*; 23(10):805.
- ROBBERECHT P, DESCHODT-LANCKMAN M, LAMMENS M, DE NEEF P y CHRISTOPHE J (1977). In vitro effects of secretine and vasoactive intestinal peptide on hydrolase secretion and cyclic AMPc levels in the pancreas of five animal species. A comparison with caerulein. *Gastroenterol Clin Biol*; 1:519-525.
- ROBERTS ML y BUTCHER FR (1983). The involvement of protein phosphorylation in stimulus-secretion coupling in the mouse exocrine pancreas. *Biochem J*; 210:353-359.
- 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.
- ROTHMAN SS (1967). "Non-parallel transport" of enzyme protein by the pancreas. *Nature*; 213(75):460-462.
- ROTHMAN SS (1974). Molecular regulation of digestion: short term and bond specific. *Am J Physiol*; 226(1):77-83.
- ROTHMAN SS y BROOKS FP (1965). Electrolytic secretion from the rabbit pancreas in vitro. *Am J Physiol*; 208:1171-1176.
- ROTHMAN SS y WELLS H (1969). Selective effects of dietary egg white trypsin inhibitor on pancreatic enzyme secretion. *Am J Physiol*; 216(3):504-507.
- ROZENGURT E (1995). Convergent signalling in the action of integrins, neuropeptides, growth factors and oncogenes. *Cancer Surv*; 24:81-96.
- RYDZEWSKA R, ROSSIGNOL B y MORISSET J (1993). Involvement of phospholipase D in caerulein-induced phosphatidylcholine hydrolysis in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*; 265:G725-G734.

SAKSELA O (1985). Plasminogen activator and regulation of pericellular proteolysis. *Biochim Biophys Acta*; 823:35-65.

SALIDO GM, LENNARD D, SINGH J y PARIENTE JA (1990). 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, MARTIN EA, ESTELLER A y LOPEZ MA (1984). Circadian rhythmicity in the 'basal' pancreatic secretion of the domestic fowl. *Chronobiol Int*; 1(3):173-176.

SALIDO GM, SINGH J, RENDER CL y CAMELLO PJ (1992). Secretagogue-evoked time-course changes on pancreatic juice secretion in the anaesthetized rat. *Gen Pharmacol*; 23:33-38.

SAN ROMAN JI, TAPIA JA, CALVO JJ y GARCÍA LJ (1995). Description of an automated method for the in vitro measurement of trypsinogen secretion from pancreatic segments. *Anal Biochem*; 232:129-132.

SCOPES RK (1974). Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal Biochem*; 59(1):277-282.

SCRATCHERD T y HUTSON D (1982). The role of chloride in pancreatic secretion. En: "Electrolyte and Water Transport Across Gastrointestinal Epithelia". Eds. Case RM, Garner A, Turnberg LA, Young JA. pp: 61-72. Raven Press, New York.

SCHEELE G (1983). Pancreatic lobules in the in vitro study of pancreatic acinar cell function. *Methods Enzymol*; 98:17-28

SCHEELE GA y PALADE GE (1975). Studies on the guinea pig pancreas. Parallel discharge of exocrine enzyme activities. *J Biol Chem*; 250: 2660-2670.

SCHNEFEL S, BANFIC H, ECKHARDT L, SCHULTZ G y SCHULTZ I (1988). Acetylcholine and cholecystokinin receptors functionally couple by different G-proteins to phospholipase C in pancreatic acinar cells. *FEBS Lett*; 230:125-130.

SCHULZ I (1987). Electrolyte and fluid secretion in the exocrine pancreas. En: "Physiology of the Gastrointestinal Tract". Second Edition. Ed. Johnson LR. pp: 1147-1171. Raven Press, New York.

SCHULZ I y KONDO S (1976). The role of extracellular calcium in the mechanism of pancreatic enzyme secretion. En: "Stimulus-secretion coupling in the gastrointestinal tract". Eds. Case RM, Goebell A. pp: 269-272. MTP Press, Lancaster.

SCHULZ I y TERREROS-ARANGUREN D (1982). Sidedness of transport steps involved in pancreatic HCO<sup>3-</sup> secretion. En: "Electrolyte and Water Transport Across Gastrointestinal Epithelia". Eds. Case RM, Garner A, Turnberg LA, Young JA. pp: 143-156. Raven Press, New York.

SCHULZ I, SCHNEFEL S y SCHAFFER R (1988). Regulation of signal transduction by G proteins in exocrine pancreas cells. En: "The calcium channel: structure, function and implications". Eds. Morad, Nayler, Kazda, Schramm. pp: 363-371. Springer Verlag, Berlin.

SCHULZ I, THEVENOD F y DEHLINGER-KREMER M (1989). Modulation of intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration by IP<sub>3</sub>-sensitive and IP<sub>3</sub>-insensitive nonmitochondrial Ca<sup>2+</sup> pools. *Cell Calcium*; 10:325-336.

- SEARCY RL, HAYASHI S, BERK JE y STERN H (1966). Electrophoretic behavior of serum amylase in various mammalian species. *Proc Soc Exp Biol Med*; 122(4):1291-1295.
- SECKL M y ROZENGURT E (1993). Tyrphostin inhibits bombesin stimulation of tyrosine phosphorylation, c-fos expression, and DNA synthesis in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem*; 268(13):9548-9554.
- SEOW KTF y YOUNG JA (1986). Cholecystokinin evokes secretion of a bicarbonate-rich juice by the rabbit pancreas. *Proc Aust Physiol Pharmacol Soc*; 17:199P.
- SEOW KTF, LINGARD JM y YOUNG JA (1986). Anionic basis of fluid secretion by rat pancreatic acini in vitro. *Am J Physiol*; 250:G140-G148.
- SEWELL WA y YOUNG JA (1975). Secretion of electrolytes by the pancreas of the anaesthetized rat. *J Physiol*; 252:379-396.
- SHERRY S y TROLL W (1954). The action of thrombin on synthetic substrates. *J Biol Chem*; 208:95-105.
- SINGH J (1983). Effectes of aminoacids, glucagon, insulin and acetylcholina on cyclic nucleotide metabolism and amylase secretion in isolated mouse pancreatic fragments. *Biochem Pharmacol*; 32:2017-2023.
- SINGH J (1985a). Phorbol ester (TPA) potentiates noradrenaline and acetylcholine-evoked amylase secretion in the rat pancreas. *FEBS Lett*; 180:191-195.
- SINGH J, LENNARD R, SALIDO GM, WISDOM D, RENDER CL, POZO MJ, PARIENTE JA y CAMELLO PJ (1992). Interactions between secretin and cholecystokinin-octapeptide in the exocrine rat pancreas in vivo and in vitro. *Exp Physiol*; 77:191-204.
- SINGH M (1985b). Effects of endorphins on amylase secretion from rat pancreas in vivo and in vitro. *Dig Dis Sci*; 30:257-262.
- SINNETT-SMITH J, ZACHARY I, VALVERDE AM y ROZENGURT E (1993). Bombesin stimulation of p125 focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation. Role of protein kinase C, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*; 268(19):14261-14268.
- SJODIN L, DAHLEN HG, LUND PE y GYLFE E (1990). Stimulation of pancreatic amylase release is associated with a parallel sustained increase of cytoplasmic calcium. *Regulatory Peptides*; 30:239-253.
- 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. I". Ed. Houslay, Milligan. pp: 15-30. John Wiley & Sons, Chichester.
- STENSON WF y LOBOS E (1982). Metabolism of arachidonic acid by pancreatic acini: relation to amylase secretion. *Am J Physiol*; 242:G493-G497.
- STERNBY B y BORGSTROM B (1979). Purification and characterization of human colipase. *Biochim Biophys Acta*; 572:235-243.
- STOSCHECK CM (1990). Increased uniformity in the response of the coomassie blue G protein assay to different proteins. *Anal Biochem*; 184(1):111-116.
- STREB H, BAYERDORFFER E, HASE W, IRVINE RF y SCHULZ I (1984). Effect of inositol-1,4,5-triphosphate on isolated subcellular fractions of rat pancreas. *J Membr Biol*; 81:241-253.

STREB HRF, IRVINE MJ, BERRIDGE MJ y SCHULZ I (1983). Release of calcium from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol 1,4,5-triphosphate. *Nature*; 306:67-69.

STRYER L (1981). Biochemistry, 2<sup>nd</sup> ed. W. H. Freeman and Company, San Francisco.

STÜBER W, KOSINA H y HEIMBURGER N (1988). Synthesis of a tripeptide with a C-terminal nitrile moiety and the inhibition of proteinases. *Int J Peptide Protein Res*; 31:63-70.

STUENKEL EL y HOOTMAN SR (1990). Secretagogue effects on intracellular calcium in pancreatic duct cells. *Pflügers Arch*; 416:652-658.

SUNG CK y WILLIAMS JA (1988). Role of calcium in pancreatic acinar cell secretion. *Mineral Electrolyte Metab*; 14:71-77.

SUNG CK y WILLIAMS JA (1989). Insulin and ribosomal protein S6 kinase in rat pancreatic acini. *Diabetes*; 38(5):544-549.

SUNG CK, HOOTMAN SR, STUENKEL EL, KUROIWA C y WILLIAMS JA (1988). Downregulation of protein kinase C in guinea pig pancreatic acini: effects on secretion. *Am J Physiol*; 254:G242-G248.

SUZUKI K, ONOE K y TAKAHIRA H (1992). Activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel and Cl<sup>-</sup> conductance in canine pancreatic acinar cells through acyclic AMP pathway. *Japanese J Physiol*; 42:276-281.

SVENDSEN L, BLOMBÄCK B, BLOMBÄCK M y OLSSON P (1972). Synthetic chromogenic substrates for determination of trypsin, thrombin and thrombin-like enzymes. *Thromb Res*; 1:267-278.

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.

SWANSON CH y SOLOMON AK (1975). Micropuncture analysis of the cellular mechanisms of electrolyte secretion by the in vitro rabbit pancreas. *J Gen Physiol*; 65:22-45.

TANKEL HI, LESTER LJ, RICHMAN A y HOLLANDER F (1957). A study of the pancreatic response to histamine in dogs with total gastrectomies. *Gastroenterology*; 32:642-650.

TAPIA JA, GONZALEZ A, GARCIA LJ y SALIDO GM (1995). Analysis of trypsinogen secretion from pancreatic segments by an on-line method. *J Physiol*; 493:154S.

TARTAKOFF AM, GREENE LJ y PALADE GE (1974b). Studies on the guinea pig pancreas. Fractionation and partial characterization of exocrine proteins. *J Biol Chem*; 249(23):7420-7431.

TARTAKOFF AM, GREENE LJ, JAMIESON JD y PALADE GE (1974a). Parallelism in the processing of pancreatic proteins. *Adv Cytopharmacol*; 2:177-194.

TARTAKOFF AM, JAMIESON JD, SCHEELE GA y PALADE GE (1975). Studies on the pancreas of the guinea pig. Parallel processing and discharge of exocrine proteins. *J Biol Chem*; 250: 2671-2677.

TEPIKIN AV, VORONINA SG, GALACHER DV y PETERSEN OH (1992). Pulsatile Ca<sup>2+</sup> extrusion from single mouse pancreatic acinar cells during acetylcholine-evoked cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> spiking. *J Physiol*; 115P.

THORN P, GERAMISENKO O y PETERSEN OH (1994). Cyclic ADP-ribose regulation of ryanodine receptors involved in agonist-evoked cytosolic  $Ca^{2+}$  oscillations in pancreatic acinar cells. *EMBO Journal*; 13:2038-2034.

THORN P, LAWRIE AM, SMITH PM, GALLACHER DV y PETERSEN OH (1993). Local and global cytosolic  $Ca^{2+}$  oscillations in exocrine cells evoked by agonist and inositol triphosphate. *Cell*; 74:661-668.

TOBITA T y FOLK JE (1967). Chymotrypsinogen C. Sequence of amino acids around an essential histidine residue. *Biochim Biophys Acta*; 147(1):15-25.

TOESCU EC (1995). Temporal and spatial heterogeneities of  $Ca^{2+}$  signaling: mechanism and physiological roles. *Am J Physiol*; 269:G173-G185.

TOESCU EC y PETERSEN OH (1995). Region-specific activity of the plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump and delayed activation of  $Ca^{2+}$  entry characterize the polarized, agonist-evoked  $Ca^{2+}$  signals in exocrine cells. *J Biol Chem*; 270:8528-8535.

TOURNUT R (1978). Physiologie du páncreas exocrine. *Rev Medecine*; 14:867-872.

TSIEN RW y TSIEN RY (1990). Calcium channels, stores and oscillations. *Annu Rev Cell Biol*; 6:715-760.

TSUNODA Y y OWYANG C (1993). 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.

VANDERMEERS A, VANDERMEERS-PIRET MC, RATHE J, DEHAYE JP, WINAND J y CHRISTOPHE J (1984). Phosphorylation of 3 particulate proteins in rat pancreatic acini in response to vasoactive intestinal peptide, secretin and cholecystokinin (CCK-8). *Peptides*; 5:359-365.

VANDERMEERS A, VANDERMEERS-PIRET MC, RATHE J, KUTZNER R, DELFORGE A y CHRISTOPHE J (1977). A calcium-dependent protein activator of guanosine-3'5'-monophosphate phosphodiesterase in bovine and rat pancreas. *Eur J Biochem*; 81:377-386.

VAYSSE N, BASTIC MJ, PASCAL JP, MARTINEL C, FOURTERINIER G y RIBET A (1977). Effect of catecholamines and their inhibitors on the isolated canine pancreas. *Gastroenterology*; 72:711.

VINAYEK R, MURAMAKI M, SHARP C, JENSEN RT y GARDNER JD (1990). Carbachol-induced down-regulation of receptors for pancreatic secretagogues. *Digestion*; 46:112-124.

VOLPE P, KARUSE KH, HASHIMOTO S, ZORZATO F, POZZAN T, MELDOLESI J y LEW DP (1988). "Calciosoma", a cytoplasmic organelle: the inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive  $Ca^{2+}$  store of nonmuscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 85:1091-1095.

WAKUI M, OSIPCHUK VY 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.

WALTZ B y BAUMANN O (1989). Calcium-sequestering cell organelles: in situ localization, morphological and functional characterization. En: "Progress in histochemistry and cytochemistry. Vol. XX". Ed. Verlag GF. Stuttgart. New York.

WARSHEL A, NARAY-SZABO G, SUSSMAN F y HWANG J-K (1989). How do serine proteases really work? *Biochemistry*; 28:3629-3637.

WIELOCH T, BORGSTROM B, PIERONI G, PATTUS F y VERGER R (1981). Porcine pancreatic procolipase and its trypsin-activated form: Lipid binding and lipase activation on monomolecular films. *FEBS Lett*; 128:217-220.

WILLEMS P, VAN DEN BROEK B, VAN OS C y DE PONT J (1989). Inhibition of inositol 1,4,5-triphosphat-induced  $Ca^{2+}$  release in permeabilized pancreatic acinar cells by hormonal and phorbol ester pretreatment. *J Biol Chem*; 264:9762-9767.

WILLEMS P, VAN NOOIJ J, HAENEN H y DE PONT J (1978). Phorbol ester inhibits cholecystokinin octapeptide-induced amylase secretion and calcium mobilization, but is without effect on secretagogue-induced hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate in rabbit pancreatic acini. *Biochim Biophys Acta*; 930:230-236.

WILLIAMS DA, FOGARTY KE, TSIEN RRY y FAY FS (1985). Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using fura-2. *Nature*; 318:558-561.

WISDOM DM, CAMELLO PJ, SALIDO GM y SINGH J (1994). Interaction between secretin and nerve-mediated amylase secretion in the isolated exocrine rat pancreas. *Exp Physiol*; 79:851-863.

WITT I (1991). Test systems with synthetic peptide substrates in haemostaseology. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*; 29:355-374.

WRENN RW (1983). Phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase and its endogenous substrate proteins in rat pancreatic acinar cells. *Life Sci*; 32:2385-2392.

WRENN RW (1984). Phosphorylation of a pancreatic zymogen granule membrane protein by endogenous calcium/phospholipid-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Acta*; 775:1-6.

YULE DI y WILLIAMS JA (1994). Stimulus-Secretion Coupling in the Pancreatic Acinus. En: "Physiology of the Gastrointestinal Tract. Vol. II". Third Edition. Ed. Johnson LR. pp 1447-1472. Raven Press, New York.

ZACHARY I, SINNETT-SMITH J y ROZENGURT E (1992). Bombesin, vasopressin, and endothelin stimulation of tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. Identification of a novel tyrosine kinase as a major substrate. *J Biol Chem*; 267(27):19031-19034.

ZACHARY I, SINNETT-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(29):22060-22065.

ZAJIC G y SCHACHT J (1983). Cytochemical demonstration of adenylate cyclase with strontium chloride in the rat pancreas. *J Histochem Cytochem*; 31:25-28.